

Université de Montréal

Restriction calorique et fonctions cognitives chez les rats vieillissant : approches
comportementale et biochimique

par

Elisabeth Bélanger

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Maître ès sciences (M.Sc.)
en nutrition

avril 2007

© Elisabeth Bélanger, 2007



QU

145

U58

2007

V.009

Direction des bibliothèques

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Restriction calorique et fonction cognitive chez les rats vieillissant : approches
comportementale et biochimique

présenté par :
Elisabeth Bélanger

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Victor Gavino
président rapporteur

Dr Guylaine Ferland
directeur de recherche

Dr Émile Levy
membre du jury

RÉSUMÉ FRANÇAIS

La restriction calorique (RC) constitue l'un des moyens les plus puissants permettant de retarder le déclin physiologique et l'apparition des maladies associées à la sénescence. En outre, des travaux antérieurs ont mis en évidence le rôle protecteur de la restriction calorique en regard des capacités d'apprentissage et de la motricité au cours du vieillissement. Parmi les structures pouvant moduler les effets bénéfiques de cette stratégie alimentaire se trouvent les sphingolipides, une famille de lipides présents en grande quantité dans le cerveau, notamment dans la gaine de myéline. En marge de leur rôle dans la conduction nerveuse, les sphingolipides sont maintenant reconnus pour participer à la prolifération, à la différenciation et à la survie neuronale. Or, à ce jour, aucune étude ne s'est penchée sur le lien potentiel entre l'amélioration des capacités sensorimotrices et cognitives et le profil en sphingolipides cérébraux des animaux soumis à la RC.

Afin de combler cette lacune, une étude a été réalisée chez des rats mâles Sprague-Dawley âgés de 21 mois, la moitié desquels ont été soumis à une RC de 40 % à l'âge de 8 mois, l'autre moitié à une alimentation ad libitum (AL) toute leur vie ; un groupe de rats âgés de 2 mois a servi de témoin. Les mesures comportementales étudiées ont inclus l'activité motrice et les capacités exploratoires (test de l'*open-field*), l'anxiété (test du labyrinthe en croix surélevée) ainsi que l'apprentissage et les capacités mnésiques (test de la piscine de Morris). Les sphingolipides, étudiés respectivement dans le cervelet, le bulbe pont, le mésencéphale, le cortex frontal, l'hypothalamus, le bulbe olfactif, le thalamus, l'hippocampe et le striatum, comprenaient la sphingomyéline, les cérébrosides, les sulfatides, les céramides et les gangliosides.

Au terme de l'étude, les rats ayant été soumis à la RC présentaient de meilleures capacités d'apprentissage (ANOVA (latence) groupe*jour; $8,245=6,288$, $p<0,001$) et exploratoires (ANOVA (distance parcourue) groupe*jour; $4,147=4,834$, $p<0,001$) que les animaux ayant reçu une alimentation AL toute leur vie. Aucun effet de la diète n'a été observé en regard de l'anxiété, toutefois cette composante diminuait en fonction

de l'âge. Par ailleurs, la restriction calorique a été associée à une réduction des concentrations de céramides dans le thalamus ($2,21=19,250$, $p<0,001$) et l'hypothalamus ($2,21=87,538$, $p<0,001$), deux régions riches en substances grises, à une augmentation des sulfatides dans le mésencéphale ($p<0,05$) et le cortex frontal ($p<0,05$), et à une augmentation des gangliosides dans le cortex frontal ($2,20=5,225$, $p=0,015$) et le bulbe olfactif ($2,19=9,278$, $p=0,015$). Considérant les effets délétères connus des céramides au niveau cellulaire i.e. apoptose, leurs taux plus faibles dans l'hypothalamus pourraient en partie expliquer les bienfaits de la restriction calorique en regard des capacités d'apprentissage. Par ailleurs, les concentrations relativement plus élevées de sulfatides et de gangliosides observées au niveau du cortex frontal et du mésencéphale, pourraient contribuer au maintien des fonctions motrices des animaux du groupe RC au grand âge.

MOTS-CLÉS :

Restriction calorique, vieillissement, apprentissage, mémoire, anxiété, motricité, sphingolipides, céramides, cérébrosides, sulfatides, sphingomyélines, gangliosides.

RÉSUMÉ ANGLAIS

Caloric restriction (CR), now referred to as a *successful aging* model, has been shown to retard age-related physiological decline and postpone the onset of pathologies seen in old age. In brain, a limited number of studies have shown CR to attenuate age-related cognitive decline including memory, and improve motor function. Among the entities that could support the beneficial effect of CR in brain, are the sphingolipids (SL), a class of complex lipids found in high concentrations in the white matter, notably the myelin sheath. In addition to their structural role in cell membranes, sphingolipids are now known to participate in a variety of important cellular events including cell differentiation, proliferation and survival.

In light of this, and because the potential association between behavioural performance and sphingolipid profile in the CR model, has, to our knowledge, never been explored, a study was conducted in 21 month old male Sprague-Dawley rats, half of whom had been fed ad libitum (AL) all their lives, the other half having been subjected to a 40% caloric restriction (CR) at the age of 8 months; a group of rats aged 2 months served as controls. Behavioural testing included motor abilities and exploratory behaviour (using the *open-field*), anxiety (elevated plus maze) and cognitive abilities and memory (using the Morris water maze). Sphingolipids were investigated in eight distinct brain regions namely cerebellum, pons medulla, midbrain, hippocampus, frontal cortex, striatum, olfactory bulb, thalamus and hypothalamus, and included the gangliosides, the cerebroside, the ceramides, the sphingomyelin and the sulfatides.

Rats subjected to caloric restriction had better learning abilities (latency; group*day, $8,245=6,288$, $p<0,001$) and higher exploratory behaviour (covered distance; group*day, $4,147=4,834$, $p<0,001$) compared to rats who had been fed ad libitum all their lives. Anxiety was not affected by CR but this component decreased significantly as a function of age. In parallel, caloric restriction was associated with decreased ceramide concentrations in the thalamus ($2,21=19,250$, $p<0,001$) and the

hypothalamus (2,21=87,538, $p<0,001$), two regions rich in grey matter; with an increase in sulfatides in the midbrain ($p<0,05$) and frontal cortex ($p<0,05$); and with increased gangliosides in the frontal cortex (2,20=5,225, $p=0,015$) and the olfactory bulb (2,19=9,278, $p=0,015$).

In light of the well established deleterious effects of ceramides in cells i.e apoptosis, their lower concentration in the hypothalamus could in part support the beneficial effects of CR in cognition. Similarly, the observed increased levels of sulfatides and gangliosides in the frontal cortex and midbrain could help sustain motor function in the CR rats during aging.

INDEXING KEY WORDS :

Caloric restriction, aging, cognition, memory, anxiety, motor abilities, sphingolipid, ceramide, cerebroside, sphingomyelin, sulfatide, ganglioside.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ FRANÇAIS	iii
RÉSUMÉ ANGLAIS	v
LISTE DES TABLEAUX	ix
LISTE DES FIGURES	x
LISTE DES ABRÉVIATIONS	xii
I. INTRODUCTION.....	1
REVUE CRITIQUE DE LA LITTÉRATURE	3
1. La restriction calorique.....	3
1.1 Les effets généraux de la restriction calorique.....	3
1.2 Les hypothèses proposées afin d'expliquer les bienfaits de la restriction calorique	5
1.2.1 La réduction du stress oxydatif	5
1.2.2 La limitation des dommages protéiques associés au vieillissement..	6
2. La restriction calorique et les fonctions cérébrales	7
2.1 Les effets de la restriction calorique sur la force musculaire et la motricité.....	7
2.2 Les effets de la restriction calorique sur la coordination.....	10
2.3 Les effets de la restriction calorique sur l'anxiété.....	13
2.4 Les effets de la restriction calorique sur l'apprentissage et les capacités mnésiques	16
2.4.1 Descriptions des tests de comportement	17
2.4.2 Les effets de la restriction calorique sur l'apprentissage et les capacités mnésiques	23
2.4.2.1 Les effets de la restriction lorsqu'implantée au sevrage	24
2.4.2.2 La restriction calorique implantée à l'âge adulte	26
2.4.2.3 L'influence de la souche de rongeurs.....	28
2.5 Les effets de la restriction calorique sur les systèmes neuronaux	31
2.5.1 Les systèmes dopaminergique et cholinergique	32
2.5.2 Le système glutaminergique.....	33

2.5.3	Le système GABAergique.....	35
2.5.4	L'apoptose et la neurogènèse	37
3.	Les sphingolipides.....	40
3.1	La synthèse des sphingolipides	40
3.2	Le métabolisme des céramides et des sphingomyélines	45
3.3	Le métabolisme des cérébrosides et des sulfatides	46
3.4	Le métabolisme des gangliosides.....	47
3.5	Les sphingolipides au cours du vieillissement normal.....	48
3.6	Les sphingolipides dans les maladies d'Alzheimer et de Parkinson	48
3.6.1	Le système céramide-sphingomyéline et la maladie d'Alzheimer..	49
3.6.2	Les sulfatides et la maladie d'Alzheimer	50
3.6.3	Les gangliosides et la maladie d'Alzheimer.....	51
3.6.4	Les sphingolipides et la maladie de Parkinson.....	52
4.	La restriction calorique et les sphingolipides.....	52
5.	Hypothèse de recherche et objectifs de l'étude	53
5.1	Formulation de l'hypothèse de recherche	53
5.2	Objectifs de l'étude	53
II.	ARTICLE	55
III.	DISCUSSION	92
IV.	CONCLUSION	96
VI.	RÉFÉRENCES.....	97

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 - Sommaire des études relatives à la restriction calorique en lien avec les capacités cognitives et sensori-motrices au cours du vieillissement normal.....	30
---	----

LISTE DES FIGURES

Figure A Test du fil d'acier	8
Figure B Test de la locomotion spontanée	8
Figure C Test de l'activité sur la roue	9
Figure D Pont plat de 2 cm de largeur.....	11
Figure E Pont plat de 6 cm de largeur	11
Figure F Pont cylindrique.....	11
Figure G Test du rotorod	12
Figure H Test de la boîte à trous	14
Figure I Vue aérienne du test de la boîte à trous	14
Figure J Labyrinthe en croix surélevée	15
Figure K Labyrinthe radial à 8 bras.....	18
Figure L Test de la piscine de Morris (vue latérale avec repères spatiaux)	19
Figure M Test de la piscine de Morris (vue aérienne de la plate-forme submergée)..	20
Figure N. Labyrinthe à huit bras dans l'eau (vue aérienne) – Évaluation de la mémoire spatiale.....	21
Figure O Labyrinthe à huit bras dans l'eau (vue aérienne) – Évaluation de la mémoire non spatiale.....	21
Figure P. Labyrinthe en T.....	22
Figure Q. Le test du pont avec appât.....	23
Figure R. Biosynthèse de céramide (Granner et al. 1995; Ohanian & Ohanian 2001)	41
Figure S. Biosynthèse des sphingomyélines et glycosphingolipides (Granner et al. 1995; Ohanian & Ohanian 2001)	42
Figure T. Famille des gangliosides (Granner et al. 1995; Fredman et al. 2003; Birklé et al. 2003).....	44

Figure 1 Latencies in Morris Water Maze.....	82
Figure 2 Covered distance in the Morris Water Maze: Day 1 and Day 2	83
Figure 3 Covered distance in the Open field.....	84
Figure 4 Elevated Plus Maze : Open time and First Open arm	85
Figure 5 Ceramide distribution in different brain regions.....	86
Figure 6 Sphingomyelin distribution in different brain regions.....	87
Figure 7 Cerebroside distribution in different brain regions.....	88
Figure 8 Sulfatide distribution in different brain regions.....	89
Figure 9 Ganglioside distribution in different brain regions.....	90
Figure 10 Ganglioside distribution in brain regions.....	91

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AL	Ad Libitum
RC	Restriction calorique
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i>
RPM	Rotation par minute
SMases	Sphingomyelinase
NMDA	N-méthyl-D-alanine
BDNF	<i>Brain derived neurotrophic factor</i>
CGT	Galactosyl-transferase

I. INTRODUCTION

À l'instar de l'ensemble des pays industrialisés, la population canadienne vieillit en raison de l'augmentation de la longévité et de l'espérance de vie des personnes. Parmi les facteurs de l'environnement susceptibles d'influencer le cours du vieillissement, la nutrition est considérée comme l'un des plus importants. Dans cette optique, de nombreux travaux ont mis en évidence le rôle déterminant de la nutrition dans le maintien de la santé au grand âge et sa capacité de prévenir ou du moins d'atténuer l'impact de certaines pathologies liées au vieillissement (Duffy et al. 1997). Étudié chez une variété d'espèces mammifères, un régime restreint en calories (40% par rapport à une alimentation à volonté) mais adéquat en vitamines et minéraux, permet d'augmenter de manière significative et reproductible les longévités moyenne et maximale tout en retardant le déclin d'une gamme de fonctions physiologiques (Mattson 2005). Pour ces raisons, le modèle de la restriction calorique (RC), développé dans les années 1930 par McCay et al. (McCay et al. 1935), est considéré comme un modèle de vieillissement réussi (Masoro 2003, Weindruch 1996).

Malgré le fait que cette stratégie alimentaire ait fait l'objet de nombreux travaux au cours des quarante dernières années, son impact sur la fonction cérébrale a été peu étudié comparativement aux autres composantes physiologiques (Weindruch, 2003). Or, tant chez l'humain que chez l'animal, le vieillissement s'accompagne d'une variété d'atteintes cognitives de nature plus ou moins sévère (Stewart et al. 1989, Idrobo et al. 1987, Dubey et al. 1996). Chez le rongeur, les capacités d'apprentissage, de mémorisation de même que les composantes sensorimotrices (équilibre, activité motrice spontanée et imposée) déclinent de manière significative après 12 mois d'âge (Bellush et al. 1996, Forster & Lal 1999). En revanche, les études réalisées à ce jour rapportent des effets bénéfiques de la restriction calorique en regard de l'apprentissage et des capacités mnésiques (Gould et al. 1995, Magnusson 2001), de même qu'un maintien de l'activité motrice (Markowska 1999, Means et al. 1993), de l'équilibre et de la coordination (Pitsikas et al. 1990, Dubey

1996) à un âge avancé. Aucun effet de la restriction calorique n'a été rapporté relativement à l'anxiété (Ingram et al. 1987, Pitsikas et al. 1990, Means et al. 1993, Torras-Garcia et al. 2005).

Parmi les structures pouvant moduler les effets bénéfiques de la restriction calorique au niveau du cerveau se trouvent les sphingolipides, une famille de lipides présents en grande quantité dans la substance blanche, plus particulièrement dans la gaine de myéline. En marge de leur rôle dans la conduction nerveuse, les sphingolipides sont maintenant reconnus pour participer à une gamme d'activités cellulaires, dont la prolifération, la différenciation et la survie neuronale (Futerman & Hannun 2004).

À la lumière de ceci, et parce qu'aucune étude n'a à ce jour exploré la possibilité d'un lien, nous avons entrepris de réaliser une étude dont le but était d'investiguer de manière concurrente, diverses mesures comportementales en lien avec les sphingolipides cérébraux d'animaux soumis à une restriction calorique à l'âge adulte.

REVUE CRITIQUE DE LA LITTÉRATURE

1. La restriction calorique

Dans sa version classique, le modèle de la restriction calorique implique une diminution de 40 % de l'apport énergétique provenant de tous les macronutriments, par rapport à une alimentation à volonté, tout en maintenant les micronutriments à un niveau normal, et ce, tout au long de la vie. Au moment où le modèle a été développé (McCay et al. 1935), la restriction calorique était implantée au sevrage. Toutefois, et malgré ses effets bénéfiques au grand âge, cette stratégie a pour conséquence de limiter la croissance des animaux, ces derniers présentant des ossatures plus petites que celles de rongeurs nourris ad libitum. Pour cette raison, le modèle a évolué et la restriction calorique a par la suite été implantée à l'âge adulte, avec des effets bénéfiques comparables (Masoro 2003, Wanagat et al. 1999). Une majorité des travaux publiés à ce jour ont toutefois été réalisés avec le modèle classique (sevrage).

1.1 Les effets généraux de la restriction calorique

La restriction calorique permet d'augmenter les longévités moyenne et maximale des rongeurs (Masoro 2005) et cette augmentation est fonction du degré de restriction (Sohal & Weindruch 1996, Wanagat et al. 1999, Weindruch 1996). Ceci a été bien démontré dans une étude de Duffy et al. (2001), où la longévité de rats nourris à volonté ou soumis à une restriction de 10%, 25% et 40% était, à 110 semaines, de 63%, 88%, 88% et 98%, respectivement.

Par ailleurs, plusieurs pathologies et changements physiologiques observés au grand âge sont retardés ou leurs effets débilissants diminués par la restriction calorique. Parmi les conditions ayant été largement étudiées chez le rongeur, mentionnons les néphropathies et les néoplasies, des conditions fréquemment rencontrées au grand âge. Par exemple, McCarter et al. (1997) rapportaient une incidence de néphropathie

de 2,5% chez des rats ayant été soumis à une restriction calorique comparativement à une incidence de 40% chez des rats nourris à volonté. De même, les incidences de tumeurs pituitaires étaient de 2,5% et 27% pour ces mêmes groupes, respectivement. Des résultats similaires ont été rapportés par les équipes de Maeda et al. (1985) et Weindruch (1989). De même, il a été démontré que la restriction calorique réduisait la prévalence de tumeurs mammaires. Par exemple, chez la souris, on rapportait une incidence de 6% pour le groupe RC et une incidence de 14% pour le groupe des animaux nourris à volonté (AL) (Weindruch 1989). De plus, chez les rongeurs soumis à la restriction calorique qui présentent des tumeurs, le nombre et le volume de celles-ci sont généralement diminués (Thompson et al. 2003).

Par ailleurs, étant donné le rôle du système immunitaire dans le processus de néoplasie, ce système a très tôt été ciblé pour expliquer l'effet protecteur de la RC en regard de la néoplasie (Masoro 2003, Wanagat et al. 1999). Or les travaux réalisés à ce jour indiquent que la restriction calorique améliore la défense spécifique notamment les lymphocytes-T, mais n'influence pas de manière significative l'efficacité et le nombre de macrophages (Jolly 2004). Dans une étude de Effros et al (1991), la restriction calorique a été associée à une atténuation du déclin du nombre de lymphocytes-T, d'antigènes et de la production d'anticorps chez la souris âgée inoculée avec le virus de l'influenza. En regard de ce dernier paramètre, les souris âgées ayant été soumises à la RC avaient une production d'anticorps comparable à celle des souris jeunes (1,5 de densité optique (DO) et 1,8 DO) alors que celle des souris âgées du groupe AL présentaient une production significativement réduite (0.75 OD). Des résultats similaires ont été observés pour les cellules présentatrices d'antigènes (jeunes : 25 CPM ($\times 10^3$), âgées AL : 17 CPM ($\times 10^3$), âgées RC : 22.5CPM ($\times 10^3$)) ($p=0.09$). Enfin, le nombre de lymphocytes-T des souris appartenant au groupe RC était, lui aussi, comparable à celui des jeunes.

Nous venons de présenter quelques-uns des effets bénéfiques associés à la restriction calorique. Or, il ne s'agit aucunement d'une liste exhaustive, mais plutôt d'exemples permettant d'apprécier son impact au plan systémique. À ce jour, les effets de la

restriction calorique ont été étudiés sur plus de 300 paramètres biologiques connus pour être altérés au cours du vieillissement et dans la très grande majorité des cas, cette stratégie alimentaire a été associée à un maintien et/ou à une amélioration des fonctions étudiées à un âge donné (Sohal & Weindruch 1996).

1.2 Les hypothèses proposées afin d'expliquer les bienfaits de la restriction calorique

Parmi les hypothèses proposées permettant d'expliquer les bienfaits de la restriction calorique dans l'organisme au cours du vieillissement, deux ont plus particulièrement retenu l'attention des chercheurs. Les dommages liés au stress oxydatif et ceux relatifs à l'intégrité des protéines. Nous les présentons brièvement ci-après.

1.2.1 La réduction du stress oxydatif

Cette première hypothèse stipule que la restriction calorique atténue les dommages oxydatifs liés au vieillissement. En effet, plusieurs conditions associées au grand âge sont de plus en plus associées aux dommages oxydatifs découlant de la production de radicaux libres. Ces molécules très réactives s'attaquent aux lipides, aux protéines et à l'ADN, altérant ainsi leur intégrité et perturbant l'homéostasie cellulaire (Lin & Beal 2003). Par exemple, Chipalkatti et al. (1983) ont observé que l'accumulation de lipofuscine, un marqueur du stress oxydatif, était significativement diminuée dans le cœur et le cerveau de souris soumises à une restriction calorique (350 unités de fluorescence (UF)/g de tissu) comparativement à celles nourries ad libitum (500 UF/g de tissu). De plus, le fait de restreindre l'apport calorique améliore l'activité des enzymes dites « antioxydantes » (Masoro 2003). En effet, une étude de Gomi & Matsuo (1998) a démontré que chez des rats âgés de 33 mois ayant été soumis à la restriction calorique, l'activité des enzymes superoxide dismutase, catalase et glutathion peroxidase était augmentée de manière statistiquement significative par rapport à celle de rats nourris à volonté. De plus, leur niveau d'acide thiobarbiturique (TBA), un marqueur de la peroxydation lipidique, était comparable à celui de rats

plus jeunes, contrairement aux rats de 33 mois nourris ad libitum chez qui les niveaux étaient augmentés. Il est intéressant de noter que chez la souris, les effets bénéfiques de la restriction calorique en regard du stress oxydatif sont particulièrement marqués dans le cerveau, le cœur et les muscles squelettiques, des tissus davantage ciblés par le stress oxydatif au cours du vieillissement (Sohal 1996).

1.2.2 La limitation des dommages protéiques associés au vieillissement

La seconde hypothèse fréquemment mise de l'avant pour expliquer les bienfaits de la restriction calorique pour l'organisme est à l'effet que cette stratégie alimentaire atténue la production de produits de glycation. Ces derniers sont produits lors de la condensation de sucres avec des groupes aminés via la réaction de Maillard. Or des données récentes montrent que certains de ces produits de glycation s'accumulent au cours du vieillissement et de façon accélérée dans certaines pathologies comme le diabète (Masoro 2005). Les protéines et les acides nucléiques sont particulièrement touchés par ces réactions, avec des conséquences néfastes sur leurs structures et leurs actions (Levi & Werman 1998).

Par ailleurs, on observe une augmentation des taux circulants de glucose et une diminution de la réponse insulinaire au cours du vieillissement, (Masoro 2005). En outre, un lien a été établi entre l'hyperglycémie et les produits de glycation. (Masoro 1992, Masoro 2000, Masoro 2003). Or, des travaux indépendants ont démontré une diminution du glucose plasmatique chez des animaux soumis à la RC (Wanagat et al. 1999). Dans une étude de Masoro (1992) réalisée chez des rats âgés de 31 mois, la restriction calorique était associée à une réduction des valeurs de glucose plasmatique de 15% (RC : 119-127 mg/dl, AL : 136-148 mg/dl). Des résultats similaires ont été observés dans d'autres travaux (Harris et al. 1994, Novelli et al. 1998). De plus, dans une étude de Davis et al. (1994), la réduction du glucose sanguin observée chez les animaux soumis à la restriction calorique était associée à une réduction systématique, [soit à 5 (p<0.01), 10 (p<0.01) et 24 mois (p<0.02)], des taux de protéines glyquées,

par comparaison aux animaux nourris ad libitum. Des résultats semblables ont été observés dans l'étude de Cefalu et al.1995).

2. La restriction calorique et les fonctions cérébrales

Chez le rongeur, les capacités d'apprentissage, de mémorisation de même que les composantes sensorimotrices (équilibre, activité motrice spontanée et imposée) déclinent de manière significative au cours du vieillissement. En revanche, les études réalisées à ce jour rapportent des effets bénéfiques de la restriction calorique en regard de l'apprentissage et des capacités mnésiques de même qu'un maintien de l'activité motrice de l'équilibre et de la coordination à un âge avancé. Aussi, ce chapitre présentera les principales études comportementales réalisées à ce jour ainsi que certains travaux portant sur des marqueurs biologiques associés.

2.1 Les effets de la restriction calorique sur la force musculaire et la motricité

Les travaux portant sur la force musculaire et la motricité ont fait appel à trois tests: le test du fil d'acier (traduction libre de *wire suspension test*), le test de la locomotion spontanée et le test de la roue (traduction libre de *run wheel activity test*).

Le test du fil d'acier.- Le test du fil permet d'évaluer la force musculaire du rongeur, ce dernier devant rester suspendu, par les pattes antérieures, à un fil d'acier le plus longtemps possible. Plus spécifiquement et tel qu'illustré à la Figure A, le dispositif physique consiste en un fil de 0,3 cm de diamètre tendu à deux structures verticales, au-dessus d'un tapis coussiné, sécuritaire. Le temps (en secondes) que met l'animal pour chuter est proportionnel à sa force musculaire, et constitue la variable dépendante. Le test est réalisé une seule fois.

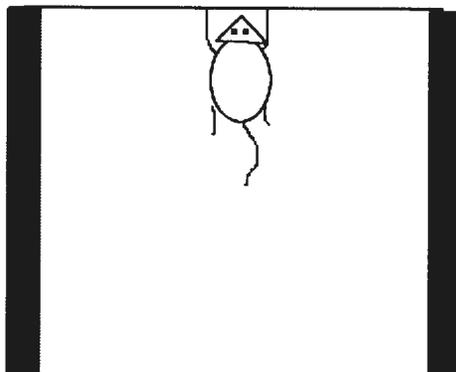


Figure A Test du fil d'acier

Le test de la locomotion spontanée et test de la roue à courir.- La motricité est habituellement évaluée dans le cadre de deux tests. Un premier, celui de la locomotion spontanée, consiste à déterminer la distance parcourue par un animal placé dans un espace de petite dimension (généralement de 40 x 40 x 30,5 cm) en un temps donné (4 minutes), des senseurs disposés au sol permettant de déterminer la distance parcourue par l'animal durant la période expérimentale (voir Figure B). Un deuxième test, celui de la roue (présenté à la Figure C) évalue la motricité en comptabilisant le nombre de révolutions effectuées par l'animal au cours d'une période de 72 heures. Pour l'un et l'autre test, la distance parcourue et le nombre de révolutions effectués reflètent les capacités motrices de l'animal, et constituent les variables dépendantes.

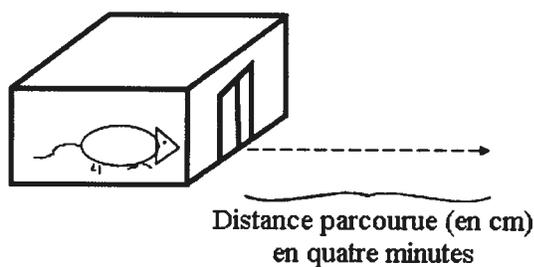


Figure B Test de la locomotion spontanée

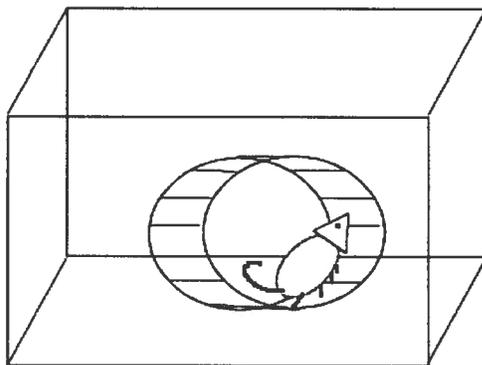


Figure C Test de l'activité sur la roue

Bien que limitées, les études réalisées à ce jour ont mis en évidence des effets de la restriction calorique sur la force musculaire et la motricité. En regard de la force musculaire, une étude de Markowska (1999) réalisée chez des rats Fischer-344 soumis à une restriction calorique de 40% à l'âge de 14 semaines, démontrait une plus grande force musculaire chez ces derniers lorsque comparés à des rats ayant été nourris ad libitum toute leur vie. Plus spécifiquement, les rats du groupe RC restaient agrippés au fil jusqu'à cinq fois plus longtemps que ceux du groupe AL, cet effet étant observé à 12 mois (40 vs 18 secondes, $p < 0,01$), à 18 mois (40 vs 10 secondes, $p < 0,01$) et à 24 mois (25 vs 5 secondes, $p < 0,01$).

Des résultats similaires ont aussi été observés chez la souris. Dans une étude faisant appel à ce même test, et réalisée chez des souris mâles de souche C57BL/6, on observait, à 22 mois, des temps de suspension de l'ordre de 17 secondes chez les souris ayant été soumises à la restriction calorique à l'âge de 14 mois d'âge comparativement à 6 secondes chez celles ayant été nourries à volonté ($p < 0,01$; Means et al. 1993)

De même, des travaux démontrent que la restriction calorique est bénéfique pour la motricité. Dans une étude de Ingram et al (1987), cette composante a été étudiée à l'aide du test de la roue, chez des souris de souche C3B10RF dont un groupe avait été

soumis à une restriction calorique de 40 % dès l'âge de 24 jours. Tant à 11-15 mois qu'à 31-35 mois, l'activité motrice des souris appartenant au groupe RC était statistiquement supérieure (51,2 et 49,5 x 1000 révolutions, respectivement) de celle des souris qui avaient été nourries à volonté (35,4 et 40,0 x 1000 révolutions; $p=0,03$). D'ailleurs, l'effet bénéfique de la restriction calorique sur le maintien de la motricité était confirmé dans une autre étude où l'activité motrice était, cette fois, étudiée par le test de la locomotion spontanée. Faisant appel à des souris de souche C57/BL6 soumises à la restriction calorique imposée à l'âge de 4 mois, Dubey et al. (1996) rapportaient qu'à 23 mois d'âge, les souris du groupe RC parcouraient, en 4 minutes, une distance de plus de 1250 cm alors que la distance parcourue par les souris du groupe AL était de l'ordre de 800 cm ($p<0,05$). En outre, lorsque les résultats observés à 6 mois et 23 mois d'âge étaient comparés, les souris du groupe AL voyaient leur performance passer de 1100 cm à 800 cm ($p<0,01$) alors qu'aucun changement n'était observé pour les souris du groupe RC.

2.2 Les effets de la restriction calorique sur la coordination

Tout comme la motricité et la force musculaire, la coordination a également fait l'objet de travaux. La coordination implique l'exécution de mouvements tout en se maintenant en équilibre, cette capacité diminuant naturellement au cours du vieillissement. Les travaux portant sur cette question ont généralement recours au test du pont (traduction libre de *bridges test*) et du rotorod.

Le test du pont.- Le but de ce test consiste à inciter l'animal à traverser un pont reliant deux plates-formes sécuritaires. Tel qu'illustré aux Figure D, E et F, les ponts peuvent être de longueur, de largeur (2 à 6 cm) et de formes variables (cylindrique ou plate, etc). Avant le début du test, l'animal est invité à se familiariser avec l'une des deux plates-formes pendant une dizaine de secondes. Le test débute ensuite en plaçant l'animal au milieu du pont, lequel doit être traversé pour parvenir à l'une des deux plates-formes, en un temps maximal de 120 secondes. Le temps (en secondes)

que met l'animal pour parvenir à la plate-forme, tout comme la survenue de chutes, constitue une variable dépendante. Un animal possédant une bonne coordination se rendra à la plate-forme rapidement, et sans chuter.



Figure D Pont plat de 2 cm de largeur



Figure E Pont plat de 6 cm de largeur



Figure F Pont cylindrique

Le test du rotorod.- Le test du rotorod évalue la capacité de l'animal à se maintenir le plus longtemps possible en équilibre sur un cylindre rotatif de diamètre variable (de 4,5 à 12,5 cm). Le test, qui existe en deux versions, fait appel à un cylindre fixé à deux structures verticales, situé au-dessus d'un tapis coussiné. Dans la première version du test, le cylindre accélère à raison de 0,5 rotation par minute (rpm)/seconde et la vitesse à laquelle le cylindre tourne au moment où l'animal chute, constitue la variable dépendante. Dans la deuxième version, le cylindre tourne à une vitesse constante de 16 rpm et le temps que met l'animal pour chuter (variable dépendante) est alors noté (Figure G). Ce test s'effectue à l'intérieur d'une même journée et

comporte d'un à six essais, espacés de 10 minutes chacun. Ainsi, plus la vitesse de rotation du cylindre et le temps que met l'animal avant de chuter sont élevés, meilleurs sont considérés sa coordination et son sens de l'équilibre.

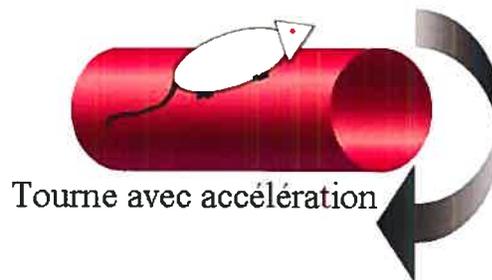


Figure G Test du rotorod

Tout comme les paramètres discutés jusqu'à présent, la restriction calorique permet d'améliorer la coordination. Ceci a notamment été confirmé dans une étude de Means et al (1993) où lorsque soumises au test du pont, des souris âgées de 22 à 25 mois ayant été soumises à la restriction calorique depuis l'âge de 14 mois, se maintenaient en équilibre entre 30 et 35 secondes avant de chuter contrairement à 11 secondes pour celles qui avaient été nourries à volonté toute leur vie ($p < 0,05$).

Des effets bénéfiques similaires en regard de la coordination et l'équilibre ont également été observés chez le rat. Dans une étude de Pitsikas et al (1990) réalisée chez des rats de souche CD-Cobs dont un groupe avait été soumis à une restriction calorique dès l'âge de 3 semaines, les rats du groupe RC se maintenaient en équilibre sur le pont plus longtemps que les rats nourris à volonté et ce tant à 12 mois (80 vs 63 secondes) qu'à 24 mois (60 sec vs 23 secondes) ($p < 0,05$). Ces résultats sont confirmés dans les travaux de Markowska (1999) où des rats de souche Fischer-344 soumis à une restriction calorique à 14 semaines d'âge présentaient de meilleures performances lorsque soumis au test du pont de 2 cm de largeur. Lorsqu'évalués à 18 et 24 mois, les rats du groupe RC mettaient en effet, en moyenne 50 et 90 secondes pour traverser le pont alors que les rats du groupe AL, mettaient, aux deux âges, 120 secondes ($p < 0,001$ à 18 mois; $p < 0,01$ 24 mois). De plus, les chutes survenaient plus

tardivement chez les rats du groupe RC que chez ceux du groupe AL (RC : 110 et 70 secondes et AL : 20 et 10 secondes, à 18 ($p < 0,001$) et 24 mois ($p < 0,001$) respectivement).

Tout comme les travaux précédents ayant fait appel au test du pont, la restriction calorique a été associée à une amélioration de la coordination lorsque testée avec le test du rotorod. Ainsi, dans une étude d'Ingram et al (1987) réalisée chez des souris C3B10RF1, celles qui avaient été soumises à une restriction calorique au moment du sevrage, présentaient, à 11-15 mois et 31- 35 mois, un sens de l'équilibre comparable avec, en moyenne, 1,4 et 1,7 chutes par essai. En revanche, chez les souris ayant été nourries à volonté toute leur vie, le nombre de chutes s'élevait, à ces mêmes âges, à 1,5 et 6,9 respectivement ($p = 0,02$), suggérant une perte du sens de l'équilibre au grand âge. De même pour les travaux de Pitsikas et al (1990), où lorsque testés au test du rotorod, des rats ayant été soumis à une restriction calorique au sevrage réussissaient à se maintenir en équilibre environ 2 fois plus longtemps que les rats ayant été nourris à volonté, l'effet bénéfique de la restriction calorique étant observé à l'âge 12 et 24 mois (à 12 mois $p < 0,05$).

Plus récemment, l'étude de Dubey et al (1996) a évalué l'effet de la restriction calorique sur la coordination en utilisant la version du test faisant appel au cylindre qui accélère. Lorsqu'étudiées à 16 et 22 mois d'âge, les souris qui avaient été soumises à une restriction calorique à partir de l'âge de 4 mois supportaient des vitesses de rotation supérieures que celles du groupe AL ($p < 0,05$), la vitesse du cylindre tout juste avant la chute étant de 24 rpm pour les souris du groupe RC et de 11 rpm pour celles du groupe AL.

2.3 Les effets de la restriction calorique sur l'anxiété

Contrairement aux composantes cognitives et motrices qui ont fait l'objet de nombreux travaux à ce jour, la restriction calorique a été peu étudiée en regard de

l'anxiété. Or cette dernière peut être évaluée à partir du test de *l'open field* figures H et I) ou du test du labyrinthe en croix surélevée (figure J).

Le test de l'open field.- Le but du test consiste à déterminer les capacités exploratoires d'un animal soumis à un nouvel environnement, durant une période de temps donnée. De manière opérationnelle, l'animal est placé dans une boîte d'environ un mètre carré et la trajectoire qu'il parcourt pendant cinq minutes (15 minutes dans certains travaux) correspond à ses capacités exploratoires. Le test est réalisé sur une période variant d'un à trois jours. Lors du test, une caméra surplombant la boîte, qui se divise virtuellement en 16 carrés, permet d'évaluer la distance parcourue (en cm) et le nombre de carrés traversés, ces deux paramètres constituant les variables dépendantes. Dans une autre version du test, représentée aux Figure H et I, les 16 carrés virtuels constituant la boîte, comprennent des trous de 2,5 cm. Lorsque cette version est utilisée, le temps passé dans la boîte est généralement de 15 minutes et le nombre de trous explorés constitue une troisième variable dépendante. Ainsi, plus le nombre de carrés traversés et la distance parcourue par l'animal sont grands et, dans la version modifiée du test, le nombre de trous explorés, meilleures sont ses capacités exploratoires et moins grand est son degré d'anxiété.

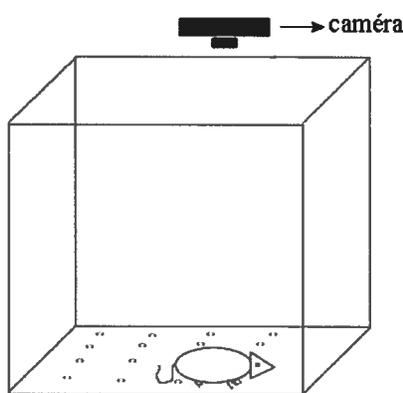


Figure H Test de la boîte à trous

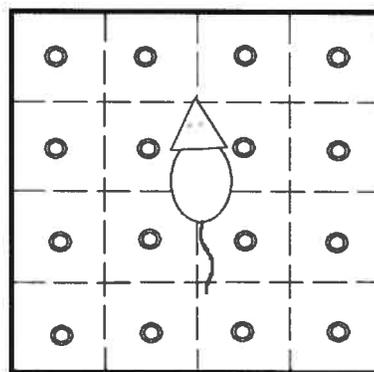


Figure I Vue aérienne du test de la boîte à trous

Le test du labyrinthe en croix surélevé.- Ce test a pour but d'évaluer à la fois les capacités exploratoires de l'animal et son niveau d'anxiété. Il fait appel à un labyrinthe composé de quatre bras formant une croix, et est surélevé à environ un mètre du sol (voir figure J). Des quatre bras, deux possèdent des parois et sont dits fermés alors que les deux autres, ouverts, ne possèdent pas de parois. Habituellement, ce test se déroule sur une période de trois jours à raison d'un essai par jour, bien que la fréquence peut varier. Ce test se présente sous deux versions. La première consiste à placer le rongeur au centre du labyrinthe et à le laisser explorer le labyrinthe pendant 5 minutes. Le nombre d'entrées et de sorties dans chacun des bras est noté ainsi que le temps passé dans les bras ouverts et fermés. Dans la seconde version, l'animal est déposé à l'extrémité d'un bras ouvert et le temps qu'il met pour entrer dans un bras fermé est noté ainsi que le temps passé dans ce dernier. Un rongeur calme ira explorer les bras ouverts et y restera plus longtemps qu'un rongeur anxieux, qui lui passera davantage de temps dans les bras fermés.

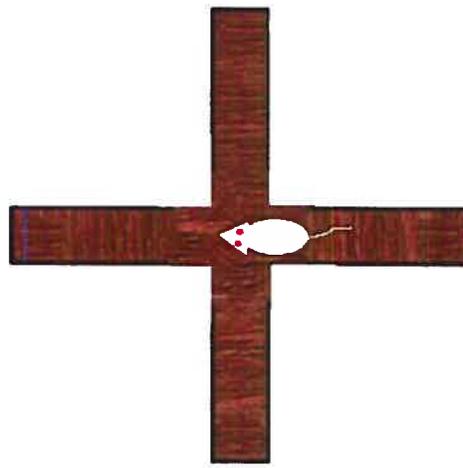


Figure J Labyrinthe en croix surélevée

Les travaux publiés à ce jour, ne dégagent pas d'effet de la restriction calorique sur cette composante. Dans une étude de Ingram et al (1987), les capacités exploratoires de souris ayant été nourries à volonté ou soumises à une restriction calorique au sevrage, n'étaient pas différentes lorsqu'évaluées à 11 et 31 mois dans le cadre du test

de l'open field (11 mois: 102,8 et 104,9 carrés traversés, 31 mois : 104,5 vs 103,4 carrés traversés à 31 mois pour les groupes RC et AL, respectivement).

Des résultats similaires ont aussi été observés dans les travaux de Pitsikas et al. (1990) utilisant la version de l'open field avec les trous. Dans cette étude, le nombre de carrés traversés n'était pas statistiquement différent entre les groupes (174 et 120 carrés traversés pour les groupe RC et AL respectivement) non plus qu'était le nombre de trous visités (4,4 et 4,8 pour les groupes RC et AL, respectivement). De même pour les résultats de l'étude de Means et al (1993), réalisée chez des souris de souche C57BL/6, dont un groupe avait été soumis à une restriction calorique de 40% à l'âge de 14 mois. Dans cette étude, les temps passés dans les bras ouverts du labyrinthe n'étaient pas différents statistiquement d'un groupe à l'autre ($p>0,05$).

Si la restriction calorique ne semble pas influencer l'anxiété de manière significative, une étude de Torras-Garcia et al (2005) suggère en revanche un effet modulateur de l'âge. Dans une étude réalisée chez des rats Wistar soumis au test du labyrinthe, les rats âgés de 24 mois passaient en moyenne 87,7 secondes dans les bras ouverts comparativement à 55,4 et 18,4 secondes pour les rats âgés de 17 mois et 3 mois ($p=0,002$).

2.4 Les effets de la restriction calorique sur l'apprentissage et les capacités mnésiques

L'apprentissage et le processus de mémorisation sont les composantes du comportement ayant été les plus étudiées. Bien que ces deux entités soient reliées, elles diffèrent dans leur définition. Ainsi, l'apprentissage réfère à l'acquisition de nouvelles informations et /ou connaissances et précède le processus de mémorisation. Au terme de l'apprentissage, ces informations sont stockées dans le cerveau et constituent la mémoire. On distingue deux types de mémoire : la mémoire de référence et la mémoire de travail. La première correspond aux informations

générales nécessaires à la résolution d'un problème. En revanche, la mémoire de travail réfère aux informations permettant de résoudre un problème spécifique à court terme. Par exemple, dans le test de la piscine de Morris qui sera décrit en détail plus loin, un animal introduit dans une piscine doit apprendre à repérer une plate-forme submergée en utilisant des repères spatiaux. Aussi, l'information relative au fait de devoir repérer une plate-forme sécuritaire dans la piscine représente la mémoire de référence alors que les informations ponctuelles lui permettant de repérer la plate-forme correspondent à la mémoire de travail. En outre, lorsque la mémoire de travail fait appel à des repères spatiaux on se réfère à elle comme à la mémoire spatiale. Toutefois, la mémoire de travail peut également faire référence à des repères sonores, numériques, etc. (Vander 1995, Pitsikas & Algeri 1992). La section suivante décrit les principaux tests permettant d'évaluer l'apprentissage et les capacités mnésiques.

2.4.1 Descriptions des tests de comportement

Le test du labyrinthe radial.- Parmi les tests fréquemment utilisés pour étudier les capacités d'apprentissage et les changements mnésiques liés au vieillissement se trouve le labyrinthe radial, une structure comprenant huit bras (à partir d'un octogone central) dont certains comportent des appâts (nourriture, eau, etc.) (figure K). Ainsi, ce test vise à évaluer les capacités de l'animal à repérer des appâts présents dans certains bras du labyrinthe en s'aidant de repères visuels. Typiquement, ces repères consistent en des carrés, des triangles ou des cercles collés au mur de la pièce où s'effectue le test. Celui-ci se déroule habituellement sur une période de trois jours consécutifs, bien que des variantes se déroulant sur des périodes aussi longues que 20 jours soient parfois utilisées. Ainsi, les animaux sont testés à raison d'un essai par jour, sur trois jours, ou d'un essai par jour jusqu'à ce que l'animal ait réussi consécutivement trois essais sans erreur jusqu'à un maximum de 20 essais. Dans certains travaux, ce test est exécuté un jour sur deux, sur une période de 15 jours. Après un temps d'adaptation de quelques minutes, l'animal dispose de 15 minutes (huit minutes dans certaines versions du test) pour explorer tous les bras du labyrinthe dont ceux contenant l'appât. Le nombre d'entrées dans les bras contenant les appâts

ainsi que le temps que prend l'animal pour les repérer constituent les variables dépendantes. Le comportement typique d'un rat au meilleur de ses capacités cognitives consiste à explorer le labyrinthe jusqu'à ce qu'il trouve les appâts. Avec de l'entraînement, il ne parcourt que les bras contenant les appâts et les trouve plus rapidement, négligeant ceux qui n'en contiennent pas. À l'inverse, un rat présentant un déficit cognitif explorera plusieurs fois les mêmes bras sans retenir son itinéraire. Ce test permet ainsi d'évaluer l'apprentissage et les mémoires de référence et de travail. (Idrobo et al. 1987, Stewart et al. 1989, Vander 1995).

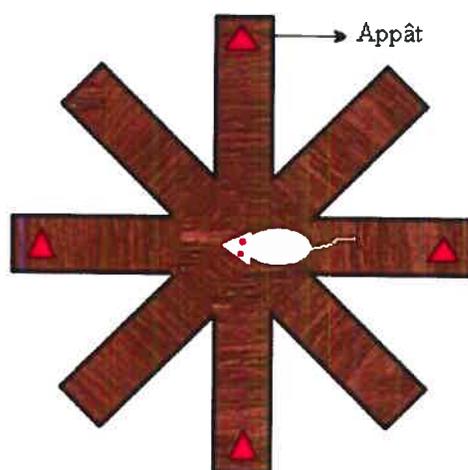


Figure K Labyrinthe radial à 8 bras

Le test de la piscine de Morris. - Tout comme le test du labyrinthe radial, le test de la piscine de Morris permet d'évaluer l'apprentissage et les capacités mnésiques d'un animal (figures L et M). Plus spécifiquement, il l'oblige à repérer une plate-forme submergée en s'aidant de repères visuels placés sur les murs de la pièce (carrés, cercles, triangles, etc.). Durant six jours consécutifs, le rat est ainsi introduit dans une piscine circulaire et tente, en s'aidant des repères visuels, de repérer l'endroit où se situe la plate-forme. Chaque jour du test, l'animal dispose de quatre essais d'une durée de deux minutes chacun pour y arriver, chacun correspondant à un point cardinal. Les variables dépendantes de ce test sont donc la latence, soit le temps en secondes que prend l'animal pour trouver la plate-forme, le temps passé dans chacun

des cadrans de la piscine (quatre cadrans au total) et la vitesse de nage (cm/s). Au jour 1 et plus particulièrement au cours du premier essai, le repérage de la plate-forme sera le fruit du hasard. Toutefois, aux essais et jours subséquents, l'animal repérera la cible grâce aux repères visuels qu'il aura intégrés (mémoire spatiale). Un rat sans atteinte cognitive repérera donc la plate-forme de plus en plus rapidement au fil des jours tandis qu'un rat souffrant de problèmes d'apprentissage et/ou mnésiques intégrera plus difficilement les repères spatiaux et son parcours sera davantage aléatoire. Dans sa version classique (celle que nous venons de décrire), l'emplacement de la plate-forme est stable et permet d'évaluer l'apprentissage et les mémoires de référence et de travail. Toutefois, il existe une autre version du test, permettant d'évaluer séparément les mémoires de référence et de travail. Ceci s'accomplit en changeant la position de la plate-forme chaque jour, obligeant l'animal à trouver d'autres stratégies que les repères visuels pour trouver la plate-forme (Morris 1982, Markowska 1999, Markowska & Savonenko 2002).

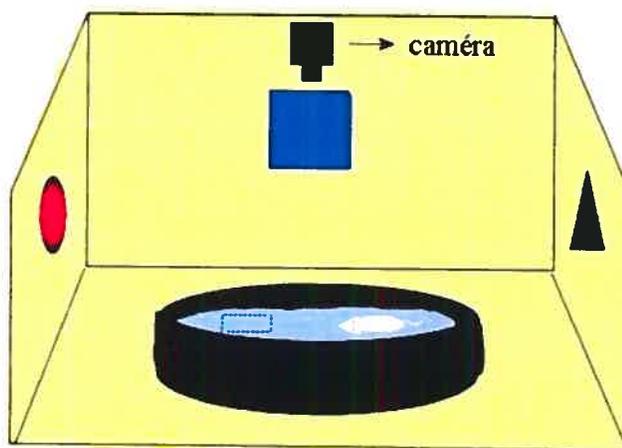


Figure L Test de la piscine de Morris (vue latérale avec repères spatiaux)

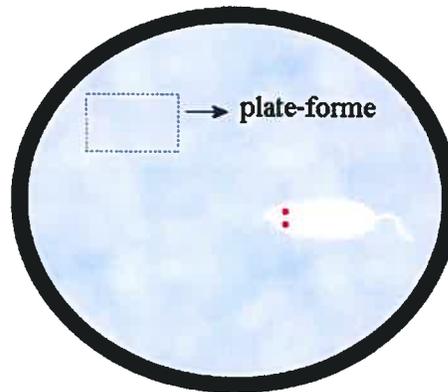


Figure M Test de la piscine de Morris (vue aérienne de la plate-forme submergée)

Le test du labyrinthe dans l'eau.- Les différentes composantes mnésiques peuvent également être étudiées en combinant les paramètres physiques du labyrinthe radial et à ceux de la piscine de Morris. Ainsi, un labyrinthe radial à huit bras est placé dans une piscine circulaire, le dispositif utilisé étant illustré aux figures N et O. Dans ce test, l'animal doit localiser une ou plusieurs plates-formes en s'aidant de repères visuels (mémoire spatiale) tel que décrit précédemment ou encore en utilisant d'autres stratégies. Des appâts peuvent par exemple être placés dans un bras sur deux, l'animal peut donc adapter sa stratégie en conséquence. Ce test se distingue des versions individuelles des tests par son degré de difficulté plus élevé; il est habituellement réalisé sur une période de dix jours consécutifs. Chaque jour, l'animal dispose de quatre essais pour repérer les plates-formes, ce repérage devant s'effectuer en cinq minutes ou moins. Lorsqu'une plate-forme est repérée par l'animal, celle-ci est immédiatement retirée de l'eau, ce dernier doit alors rechercher les plates-formes se trouvant dans les autres bras. Les variables dépendantes de ce test sont le nombre d'entrées dans les bras contenant les appâts, le nombre d'entrées dans les bras ne contenant pas d'appât (considéré comme des erreurs) et le temps (en secondes) que le rat met pour exécuter le test. Ainsi, un rat qui a appris correctement et a ensuite mémorisé l'objectif du test se rendra directement dans les bras contenant une plate-forme. Le test se termine une fois toutes les plates-formes repérées et/ou après une période de cinq minutes. Par sa complexité, ce test permet d'évaluer les mémoires de

référence et de travail de l'animal (spatiale ou non spatiale) (Buresova et al. 1986, Pitsikas & Allegri 1992).

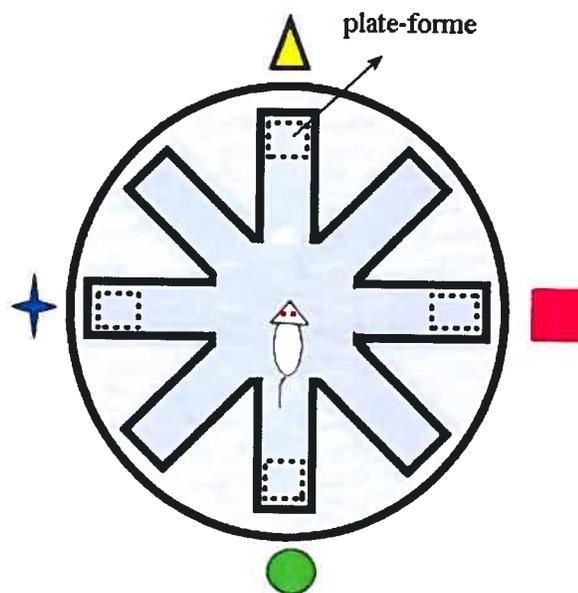


Figure N. Labyrinthe à huit bras dans l'eau (vue aérienne) – Évaluation de la mémoire spatiale

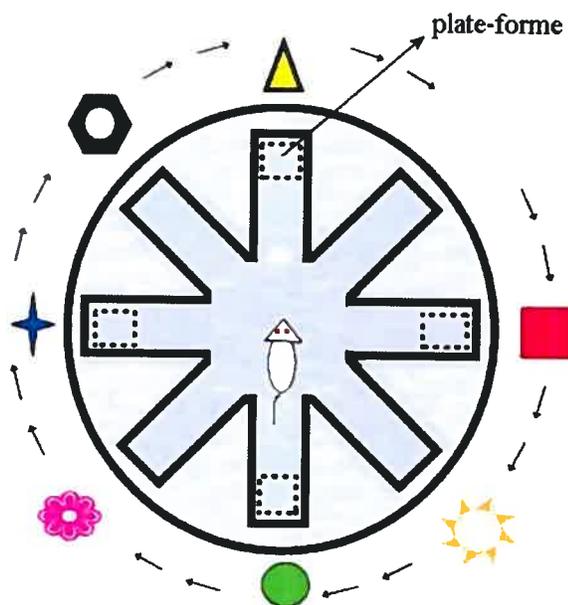


Figure O Labyrinthe à huit bras dans l'eau (vue aérienne) – Évaluation de la mémoire non spatiale

Le test du labyrinthe en « T ».- L'apprentissage et les capacités mnésiques de l'animal peuvent également être évalués à l'aide du test du labyrinthe en « T ». Dans ce test, le rat est introduit dans un labyrinthe en forme de « T » dans lequel il doit apprendre à emprunter le bras sécuritaire, l'autre bras étant associé à une décharge électrique (figure P). Dans ce test, la performance de l'animal peut s'évaluer de deux façons, soit en comptabilisant le nombre d'essais associés à une décharge électrique encouru lors de 20 essais, ou encore en comptabilisant le nombre total d'essais pour lesquels quatre des cinq derniers essais ne sont pas assortis d'une décharge électrique (nombre d'essais illimité). Dans chaque cas, l'animal dispose d'une minute de repos entre chaque essai, le test se déroulant habituellement sur une journée. Ainsi, un rat ayant de bonnes capacités d'apprentissage et mnésiques présentera un plus grand nombre d'essais sans décharge électrique qu'un rat présentant un déficit cognitif (Dubey et al. 1996).

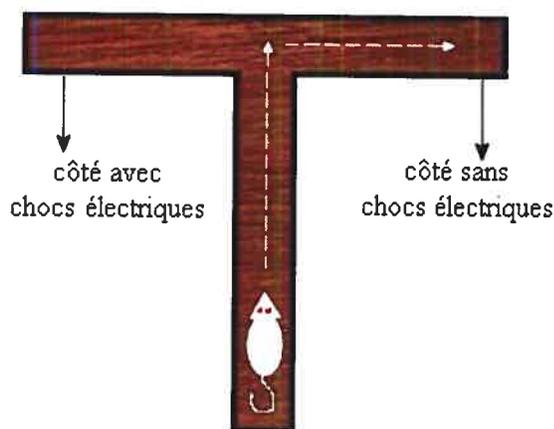


Figure P. Labyrinthe en T

Le test du pont avec appâts.- Les capacités d'apprentissage et les habiletés motrices de l'animal peuvent également être étudiées grâce au test du pont avec appâts. Dans ce test l'animal doit apprendre à rechercher des sources d'eau situées sur des plates-formes se trouvant aux extrémités d'un pont en forme d'échelle. Le dispositif de ce test est illustré à la figure Q. Plus spécifiquement, à chaque traversée, une petite quantité d'eau (0,3 mL) est versée dans un gobelet sur la plate-forme opposée à celle

où se situe le rat. L'animal ayant été temporairement privé d'eau pendant 12 heures avant le début du test, il est ainsi encouragé à effectuer un maximum de traversées pour s'abreuver. Le jour précédent le test, lequel se déroule sur une période de quatre jours consécutifs (un essai par jour), l'animal dispose d'une période d'entraînement lui permettant d'explorer le dispositif pendant 30 minutes. Le nombre de traversées réalisées en une période de temps donnée représente la variable dépendante. Un rat sans déficit cognitif et/ou moteur réalisera ainsi un plus grand nombre de traversées qu'un rat présentant des incapacités (Gould et al.1995).

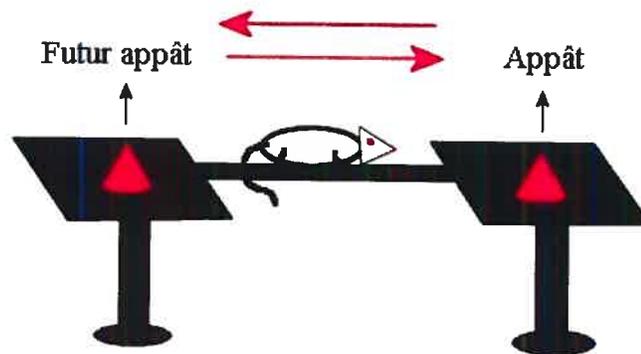


Figure Q. Le test du pont avec appât

Ces tests de comportement ont été utilisés afin de vérifier l'impact de la restriction calorique en regard de l'apprentissage et des capacités mnésiques au cours du vieillissement. La section qui suit présente et discute ces résultats.

2.4.2 Les effets de la restriction calorique sur l'apprentissage et les capacités mnésiques

L'impact de la restriction calorique sur les composantes cognitives et sensorimotrices a été étudié lorsque la RC a été implantée au sevrage et à l'âge adulte. Comme nous le verrons, des effets, largement bénéfiques, s'observent indistinctement.

2.4.2.1 Les effets de la restriction lorsqu'implantée au sevrage

Ingram et al. (1987) sont parmi les premiers à avoir étudié l'impact de la restriction calorique sur les capacités d'apprentissage chez le rongeur. Dans une étude réalisée chez des souris de souche C3B10RF1, parmi lesquelles certaines recevaient une diète de 55 kcal/semaine (équivalente à une restriction calorique de 40%), les autres recevant une diète de 95 kcal/semaine (équivalente à une alimentation légèrement inférieure à une alimentation à volonté) et chez lesquelles les capacités d'apprentissage étaient évaluées par le test du labyrinthe radial (version à 14 bras), la restriction calorique était associée au maintien de cette composante cognitive au grand âge. En effet, alors qu'à 11-15 mois d'âge, les deux groupes présentaient entre cinq et six erreurs par essai, on dénombrait 6 et 10 erreurs respectivement pour les groupes RC et AL à 31-35 mois ($p=0,0003$).

Par ailleurs, Stewart et al (1989) rapportaient des effets bénéfiques de la restriction calorique, cette fois, chez le rat. Dans cette étude réalisée chez des rats de souche Fischer-344 soumis au test de la piscine de Morris, les temps que mettaient les animaux pour atteindre la plate-forme submergée de même que leurs distances de parcours étaient plus courtes chez ceux qui avaient été soumis à une restriction calorique que chez ceux ayant été nourris à volonté toute leur vie. En effet, lorsque les temps de latence à 8, 16 et 24 mois étaient considérés (moyenne des trois âges) ceux-ci étaient de 34,5 secondes pour les rats du groupe RC comparativement à 46 secondes pour le groupe AL ($p<0,001$). De même, lorsque étudié à 24 mois d'âge, les rats du groupe RC parcouraient en moyenne 9,05 mètres pour atteindre la plate-forme comparativement à 10.56 mètres par les rats du groupe AL ($0,05<p<0,01$).

De même, Pitsikas et al. 1990 confirmait l'effet positif de la restriction calorique implantée dès les premières semaines de vie, dans une autre souche de rats, soit la souche CD-Cobs. Dans cette étude, les rats du groupe RC ont reçu une diète riche en fibres, correspondant à une restriction calorique de 35% alors que les autres étaient nourris à volonté tout au long de leur vie. Lorsque soumis au test de la piscine de

Morris, les rats du groupe RC présentaient déjà à 12 mois, des latences de 10 à 20 secondes inférieures à celles des rats du groupe AL. Ainsi, au jour 2, premier jour d'apprentissage, les rats du groupe RC parvenaient à la plate-forme en 32 secondes comparativement à 52 secondes pour les rats nourris à volonté ($p < 0,01$), une tendance qui s'est maintenue au jour 3 ($p < 0,01$) et aux jours 4 et 5 ($p < 0,05$). Cet effet bénéfique de la restriction calorique s'est également observé à l'âge de 24 mois où les temps de latence pour les groupes RC et AL étaient respectivement, de 35 et 45 secondes au jour 2, et 18 et 45 secondes au jour 3 ($p < 0,01$).

Dans une étude d'Algeri et al. (1991), les effets de la restriction calorique en regard de l'apprentissage chez les rats CD-Cobs ont été étudiés, cette fois, jusqu'à l'âge de 30 mois. Utilisant le même protocole que dans l'étude précédente (diète et test de la piscine de Morris), les auteurs rapportaient, au jour 2, des latences de 25 secondes au sein du groupe RC comparativement à 45 secondes dans le groupe AL ($p < 0,01$). Les résultats de cette étude ont ainsi permis de confirmer l'impact favorable de la restriction calorique en regard de la cognition, même à des âges très avancés.

En revanche, certaines études ne confirment pas les effets bénéfiques de la restriction calorique en regard de la cognition. Ceci est notamment le cas de l'étude de Bellush et al (1996) réalisée chez des souris C57/BL6 soumises au test de la piscine de Morris. Bien qu'un effet de l'âge ait été clairement observé entre les âges de 4 et 19 mois, les jeunes souris mettaient jusqu'à 15 secondes de moins que les souris âgées (RC et AL confondus) pour repérer la plate-forme. Les latences ainsi que les temps passés dans le cadran cible (cadran où se trouve la plate-forme) n'étaient pas statistiquement différents entre les groupes lorsqu'évalués à 19 mois.

De même, pour l'étude de Markowska (1999) discutée plus tôt, et dans laquelle la restriction calorique n'a pas non plus été associée à une amélioration des capacités d'apprentissage à 12, 18 et 24 mois lorsqu'étudiée chez des rats de souche Fischer 344. Mais comme nous le verrons un peu plus loin, il se peut que l'impact de cette stratégie alimentaire varie en fonction de la souche de rongeur étudiée. Une étude

réalisée par cette même équipe quelques années plus tard (Markowska 1992) tend à le suggérer.

2.4.2.2 La restriction calorique implantée à l'âge adulte

Bien que les résultats des études discutées jusqu'à présent aient été obtenus alors que les animaux étaient soumis à la restriction calorique dès le sevrage, des effets bénéfiques de cette stratégie alimentaire sont également observés lorsque celle-ci est implantée à l'âge adulte. Par exemple, Idrobo et al (1987) ont observé des effets bénéfiques de la restriction alimentaire lorsqu'implantée à l'âge de 3 mois. Dans cette étude, les capacités d'apprentissage ont été évaluées à l'âge de 15 mois chez les souris C57BL/6 à l'aide du test du labyrinthe à huit bras. Les souris soumises à la restriction calorique présentaient un nombre significativement plus élevé de bon choix que leurs consœurs ayant été nourries à volonté toute leur vie, soit 7,1 et 6,1 respectivement ($p < 0,001$).

Les bienfaits de la restriction calorique implantée à l'âge adulte en regard des capacités d'apprentissage ont également été observés plus tard dans la vie, soit à 22 mois, dans une étude de Dubey et al (1996). Ici, des souris C57BL/6N ont été soumises à une restriction calorique de 40% à l'âge de 4 mois puis ont été testées à l'aide du labyrinthe en forme de « T » à l'âge de 6, 16 et 22 mois. À 6 mois, les auteurs ne rapportent aucun effet de la diète. Toutefois, à partir de 16 mois, le nombre total d'essais pour lesquels quatre des cinq derniers essais n'étaient pas assortis de décharges électriques était de 8 pour le groupe RC comparativement à 16 pour le groupe nourri à volonté ($p < 0,05$). Cette différence entre les groupes s'est d'ailleurs maintenue jusqu'à 22 mois, où relativement à cette même tâche, les souris du groupe RC ont requis un total de 13 essais comparativement à 19 pour celles du groupe AL ($p < 0,05$).

Des effets bénéfiques similaires ont également été observés chez des souris de cette même souche soumises au test de la piscine de Morris (Magnusson 2001). Dans

cette étude, les souris ont été étudiées à 3, 15 et 26 mois en fonction de divers paramètres du test de la piscine de Morris à savoir, la direction que l'animal choisit au début du test pour se rendre à la plate-forme, le temps qu'il met pour s'y rendre lequel est fonction de la vitesse de nage, ainsi que la trajectoire qu'il emprunte pour atteindre la plate-forme. Ces paramètres ont ensuite été regroupés en un index appelé « proximité cumulative » où un score élevé (unités arbitraires) représente une piètre performance d'apprentissage, et inversement. Utilisant ce score, les souris des groupes AL et RC présentaient, à 3 mois et 15 mois, des scores de l'ordre de 20.000 unités arbitraires. Toutefois, à 26 mois, alors que les souris du groupe AL présentaient des scores 40,000 unités arbitraires, les scores de celles du groupe RC étaient de 25,000 unités arbitraires ($p < 0,001$) confirmant le maintien des capacités mnésiques jusqu'à tard dans la vie.

L'impact de la restriction calorique implantée à l'âge adulte a également été démontré chez le rat dans le cadre du test du pont avec appât (Gould et al. 1995). Dans ces travaux, la restriction calorique était imposée à l'âge de 4 mois chez des rats mâles de souche Fischer-344. Étudiés à 14 et 22 mois, les effets de cette stratégie alimentaire ont été évalués par deux paramètres : le premier, basé sur les performances individuelles de l'animal, évaluait les capacités d'apprentissage à partir d'une courbe exponentielle du modèle de Hirs alors que le deuxième paramètre évaluait l'apprentissage en se basant sur les performances du groupe. Relativement aux performances individuelles, la restriction calorique n'a pas eu d'effet à 14 mois, toutefois, à 22 mois, les rats du groupe RC présentaient de meilleures capacités d'apprentissage que ceux du groupe AL ($p < 0,02$). Quant aux performances de groupe, le pourcentage de rats ayant effectué plus de 10 traversées pour s'abreuver aux jours 1, 2 et 3 du test étaient de 0%, 25% et 65% pour le groupe AL, comparativement à 100%, à tous les jours du test, pour les rats du groupe RC ($p < 0,001$).

En marge des travaux présentés jusqu'à présent, une étude de Pitsikas et al (1992) s'est attachée à vérifier de manière plus pointue l'impact de la restriction calorique en

regard des mémoires de référence (stockage à long terme de l'information) et de travail (stockage en vue de la résolution de problèmes à court terme). Dans cette étude, réalisée chez des rats CD-Cobs soumis au test du labyrinthe radial à huit bras dans l'eau (durée totale du test : 10 jours), il a été démontré que les mémoires de référence et de travail étaient significativement moins altérées au cours du vieillissement chez les rats âgés ayant été soumis à la restriction calorique. En regard de la mémoire de référence, laquelle a été évaluée à 25 mois, les rats du groupe RC âgés ne commettaient aucune erreur au 10^e jour du test, comparativement aux rats nourris à volonté, qui eux, présentaient une moyenne de 3 erreurs ($p < 0,01$); cette performance du groupe RC à 25 mois étant comparable à celle de rats de 3 et 11 mois nourris à volonté. Par ailleurs, la restriction calorique a aussi permis de maintenir la mémoire de travail à des niveaux comparables à ceux de rats plus jeunes. En effet, lorsqu'étudiés à 25 mois, les rats du groupe RC parvenaient, dès le 6^e jour du test, à trouver la plate-forme sans revisiter les bras déjà parcourus (moins d'une erreur par essai), une stratégie adoptée par les rats plus jeunes. Au contraire, les rats du groupe AL ont revisité certains bras du labyrinthe tout au long du test (deux erreurs par essai) démontrant ainsi une moins bonne mémoire de travail ($p < 0,01$).

2.4.2.3 L'influence de la souche de rongeurs

À la lumière du fait que les effets bénéfiques de la restriction n'ont pu être confirmés dans certaines études, Markowska & Sanonenko (2002) ont entrepris de vérifier dans quelle mesure la souche de rongeur utilisée pouvait constituer un facteur de variation. Dans une étude faisant appel à des rats Brown Norway et F-344/Brown Norway, issus d'un croisement entre des rats Fischer-344 et Brown Norway, l'impact de la restriction calorique a été étudié en lien avec la cognition à l'aide du test de la piscine de Morris à 8, 18 et 30 mois. [Rappelons que cette même équipe n'avait pas observé d'effet protecteur de la restriction calorique dans une étude impliquant des rats Fischer-344.] Ainsi, au terme de la présente étude, un effet de la diète a été noté chez les rats issus du croisement F-344/Brown Norway âgés de 30 mois. En effet, alors qu'à 18 mois les rats des deux groupes présentaient des performances comparables

aux jours 2 et 4 du test (latences : 14 et 8 secondes), à 30 mois les latences à ces mêmes deux jours, étaient respectivement de 40 et 18 secondes pour les rats du groupe AL alors qu'elles étaient de 14 et 8 secondes pour ceux du groupe RC, soit les mêmes résultats qu'à 18 mois ($p < 0,001$). De plus, le temps passé dans le cadran où se trouvait la plate-forme (considéré comme un reflet de l'apprentissage) était plus élevé dans le groupe RC. En effet, à 30 mois, ces derniers passaient en moyenne 52% du temps dans le cadran cible aux jours 2 et 4 du test, comparativement à 28% et 40% respectivement pour les animaux du groupe AL ($p < 0,001$). Bien que préliminaires, ces résultats, jumelés à ceux de l'étude antérieure de cette équipe qui n'avait pas observé d'effet de la restriction calorique en regard de la cognition, laissent penser que la souche peut constituer un facteur de variation quant à l'impact de cette stratégie alimentaire en regard de la cognition.

En résumé, malgré quelques exceptions, l'ensemble de la littérature dégage un effet bénéfique de la restriction calorique en regard des capacités sensori-motrices et cognitives au cours du vieillissement, et ce, tant lorsqu'elle est implantée au sevrage qu'à l'âge adulte. Les résultats des études comportementales et cognitives sous l'influence de la restriction calorique sont résumés au Tableau 1. La prochaine section présente quelques travaux portant sur les aspects biologiques de cette stratégie alimentaire au niveau cérébral.

Tableau 1 - Sommaire des études relatives à la restriction calorique en lien avec les capacités cognitives et sensori-motrices au cours du vieillissement normal.

Variables étudiées	Articles	Souches	Implantation RC	Tests utilisés	Effets
Force musculaire	Markowska (1990)	Rats F-344	14 sem.	Fil d'acier	Positif
	Means et al. (1993)	Souris C57BL/6	14 mois	Fil d'acier	Positif
Motricité	Ingram et al. (1987)	Souris C3B10RF	24 jours	Roue	Positif
	Dubey et al. (1996)	Souris C57BL/6	4 mois	Locomotion spontanée	Positif
Coordination et équilibre	Means et al. 1993)	Souris C57BL/6	14 mois	Pont	Positif
	Pitsikas et al. (1990)	Rats CD-Cobs	3 sem.	Pont, Rotorod	Positif
	Markowska (1999)	Rats F-344	14 sem.	Pont	Positif
	Ingram et al. (1987)	Souris C3B10RF1	24 jours	Rotorod	Positif
	Dubey et al. (1996)	Souris C57BL/6	4 mois	Cylindre qui accélère	Positif
Anxiété	Ingram et al. (1987)	Souris C3B10RF1	24 jours	Open field	Aucun
	Pitsikas et al. (1990)	Rats CD-Cobs	3 sem.	Open field avec trous	Aucun
	Means et al. (1993)	Souris C57BL/6	14 mois	Labyrinthe en croix	Aucun
	Torras-Garcia (2005)	Rats Wistar	-	Labyrinthe en croix	Aucun
Apprentissage	Ingram et al. (1987)	Souris C3B10RF1	24 jours	Labyrinthe radial à 14 bras	Positif
	Stewart et al. (1989)	Rats F-344	Sevrage	Piscine de Morris	Positif
	Pitsikas et al. (1990)	Rats CD-Cobs	3 sem.	Piscine de Morris	Positif
	Algeri et al. (1991)	Rats CD-Cobs	3 sem.	Piscine de Morris	Positif
	Bellush et al. (1996)	Souris C57/BL6	Sevrage	Piscine de Morris	Aucune
	Markowska (1999)	Rats F-344	14 sem.	Piscine de Morris	Aucun
	Idrobo et al. (1987)	Souris C57BL/6	3 mois	Labyrinthe radial 8 bras	Positif
	Dubey et al. (1996)	Souris C57BL/6N	4 mois	Labyrinthe en « T »	Positif
	Magnusson (2001)	Souris C57BL/6N	3 mois	Piscine de Morris	Positif
	Gould et al. (1995)	Rats F-344	4 mois	Pont avec appât	Positif
	Pitsikas et al. (1992)	Rats CD-Cobs	3 sem.	Labyrinthe radial 8 bras	Positif (mémoires de référence et travail)
	Markowska et Sanonenko (2002)	Rats F-344/Brown Norway	14 sem.	Piscine de Morris	Positif (selon la souche)

Effet positif : performances améliorées par rapport à celles des animaux nourris ad libitum

Aucun effet : performances statistiquement comparables à celles des animaux nourris ad libitum

La prochaine section présente quelques travaux portant sur les aspects biologiques de cette stratégie alimentaire au niveau cérébral.

2.5 Les effets de la restriction calorique sur les systèmes neuronaux

La transmission d'information au niveau cérébral s'exécute chez les mammifères par le concept de synapse chimique, utilisant des messagers chimiques ou neurotransmetteurs pour véhiculer l'information. Ces neurotransmetteurs sont stockés dans les vésicules des terminaisons nerveuses de l'axone. Chaque fois qu'un potentiel d'action c'est-à-dire un courant électrique traverse le neurone, ces petites vésicules libèrent les neurotransmetteurs qui se dirigent dans l'espace synaptique à la recherche de récepteurs complémentaires. Ces derniers se situent sur les dendrites postsynaptiques d'un autre neurone qui, à son tour, transmettra le message au neurone suivant. Le couplage du neurotransmetteur au récepteur active une cascade de réactions dont participent les seconds messagers. Lorsque la transmission du message est terminée, les neurotransmetteurs sont détruits afin de permettre l'arrivée d'un nouveau potentiel d'action et une réactivation des récepteurs. Il existe plusieurs neurotransmetteurs: l'acétylcholine (ACh), la noradrénaline, le glutamate et le GABA. C'est par ces derniers que l'on nomme le système pour lequel ils sont utilisés. Par exemple, le neurotransmetteur glutamate fait partie du système glutaminergique, tandis que le neurotransmetteur GABA s'intègre au système GABAergique. Plus il y a de neurotransmetteurs et de récepteurs fonctionnels, meilleure est la transmission du message. (Marieb 1992, Bear 1996)

Plusieurs effets bénéfiques de la restriction calorique en regard du comportement des animaux vieillissants ont été démontrés et ont fait l'objet de la section précédente. Afin d'en identifier les mécanismes d'action, le volet biochimique sera discuté dans cette section. Il y sera question des différents systèmes collaborant à la transmission de l'influx nerveux, soit les systèmes dopaminergique, cholinergique, GABAergique et glutaminergique. À l'intérieur de chacun de ces systèmes, l'impact de la restriction

calorique visant à contrer le déclin normal observé lors du vieillissement au niveau du fonctionnement des récepteurs, des neurotransmetteurs et des neurones sera discuté.

2.5.1 Les systèmes dopaminergique et cholinergique

L'effet de la restriction calorique sur les systèmes dopaminergiques et cholinergiques permet le maintien d'une plus grande concentration de récepteurs actifs jusqu'à tard dans la vie alors que normalement, l'efficacité de ces systèmes décline avec l'âge. Une première étude ayant démontré un effet de la restriction calorique implantée au sevrage sur le système dopaminergique est celle de Levin et al (1981). Des rats de souches Wistar étaient nourris un jour sur deux (correspondant à une restriction alimentaire de 40%) ou nourris à volonté. La concentration de récepteurs dopaminergiques a été comptabilisée à 3-6, 12 et 24 mois. Ainsi, les rats soumis à la restriction calorique âgés de 24 mois ont présenté des concentrations de récepteurs de la dopamine comparables à ceux des rats âgés entre 3 et 6 mois. Toutefois, la concentration de ces récepteurs chez les rats du même âge nourris à volonté était de 132 fmole/mg de protéine comparativement à 197 fmole/mg de protéine pour le groupe RC ($p < 0,001$).

Suite à ces résultats, l'effet de la restriction calorique implantée à l'âge adulte sur les systèmes dopaminergique et cholinergique a été démontré dans les travaux de Undie et al (1993). Des rats mâles Fischer-344 ont été soumis à une restriction calorique de 40% à l'âge de 14 semaines ou nourris à volonté. Les concentrations des récepteurs au niveau des régions du striatum et du cortex frontal ont été comptabilisées à 6 et 24 mois d'âge. Ainsi, il a été démontré que dans ces deux régions étudiées, la restriction calorique permet un maintien des concentrations de récepteurs dopaminergiques correspondant à 14,5 et 20,5 DPM/ug de protéine, résultats comparables à celui des jeunes rats pour le striatum et le cortex frontal respectivement. Toutefois, la concentration de récepteurs dopaminergiques des rats âgés de 24 mois nourris à volonté a diminué avec l'âge dans le striatum (9 DPM/ug de protéine) et dans le cortex frontal (13 DPM/ug de protéine) ($p < 0,01$). De plus, les concentrations de

récepteurs cholinergiques du striatum étaient de 24 DPM/ug de protéine chez les rats âgés de 6 mois et les rats du groupe RC âgés de 24 mois comparativement à 16 DPM/ug de protéine pour les rats du même âge nourris à volonté ($p < 0,01$). En outre, les concentrations de récepteurs cholinergiques du cortex frontal étaient de 41 DPM/ug de protéine chez les rats âgés de 24 mois du groupe RC, résultats encore une fois comparables à ceux des jeunes rats. Toutefois, chez ceux nourris à volonté une concentration plus faible de récepteurs de 24 DPM/microgramme de protéine a été observée ($p < 0,01$).

2.5.2 Le système glutaminergique

L'effet bénéfique de la restriction calorique sur les systèmes neuronaux a également été démontré dans celui sollicitant les neurotransmetteurs de glutamate. En effet, dans le système glutaminergique, le principal neurotransmetteur, le glutamate se lie habituellement au récepteur NMDA (N-méthyl-D-alanine). Pendant le vieillissement, ce système devient moins efficace pour la transmission de l'information en diminuant la concentration de récepteurs actifs. La restriction calorique permet, tout comme dans le cas des systèmes dopaminergique et cholinergique, le maintien d'une concentration de ces récepteurs actifs comparables à celle d'animaux plus jeunes (Bear 1996, Eckles-Smith 2000, Magnusson 2001).

Étudié chez la souris, l'effet de la restriction calorique sur le système glutaminergique a été démontré dans des régions spécifiques du cerveau. L'une des études l'ayant démontré est celle de Magnusson (2001) où l'effet de cette stratégie alimentaire a permis d'observer le maintien des concentrations des récepteurs NMDA dans certaines régions du cerveau (tel que discuté plus loin). En effet, des souris de souche C57B1/6N ont été soumises dès le sevrage à la restriction calorique ou nourries à volonté. La densité des récepteurs a été mesurée à 3, 15 et 27 mois dans les régions corticales, l'hippocampe et les régions sous-corticales. Ainsi, afin de déterminer l'efficacité de la restriction calorique sur les récepteurs NMDA, la concentration de sous-unités protéiques du récepteur ($\lambda 1$, $\epsilon 1$ et $\epsilon 2$) ainsi que la

concentration de ligand (glutamate) ont été mesurés. Tout d'abord, l'effet de la restriction calorique sur la densité de sous-unités a été observé dans une minorité de régions (3 sur 16 régions) dont les trois régions corticales (cingulat, frontal 4-5, frontal 2-3). Chez ces dernières, un maintien de la densité de la sous-unité NR-1 chez les souris du groupe RC a été observé contrairement à celles nourries à volonté. En effet, le groupe RC présentait une densité variant de 286 à 295 cpms/mg de tissu comparativement à 268 à 274 cpms/mg de tissu du groupe AL ($p < 0,05$). Un second effet de la diète a été observé au niveau de la sous-unité NR2B dans une région corticale (cingulat). Les souris du groupe RC ont obtenu une densité de 217 cpms/mg de tissu comparativement à 192 cpms/mg de tissu chez celles nourries à volonté ($p < 0,05$). Toutefois, une plus faible densité de sous-unité NR2B a été observée dans les hippocampes des souris soumises à la restriction calorique soit 643 cpms/mg de tissu par rapport à 664 cpms/mg de tissu chez celles nourries AL ($p < 0,05$). Dans les autres régions étudiées par l'auteur, il n'y a pas eu d'effet de la diète. En revanche, la concentration de ligand glutamate (neurotransmetteur) s'est maintenue jusqu'à 26 mois chez les souris soumises à la restriction calorique contrairement à leurs consœurs nourries à volonté où cette concentration a diminué. En effet, dans pratiquement toutes les régions sous-corticales, les souris soumises à une restriction calorique présentaient une plus grande densité de ligand du neurotransmetteur glutamate que celles du même âge nourries à volonté. Dans le premier cas, la densité variait de 2194 à 3503 cpms/mg de tissu à travers les régions comparativement à un intervalle de 1912 à 2945 cpms/mg de tissu ($p < 0,05$). Un effet de la diète a aussi été observé dans une région de l'hippocampe (CA1) où les souris du groupe RC âgées de 26 mois présentaient des densités comparables à celles des jeunes (4524 cpms/mg de tissu), alors que chez celles nourries à volonté, leur densité avait décliné à 4232 cpms/mg de tissu ($p < 0,05$).

Bien que dans l'étude précédente portant sur la souris, la restriction calorique n'avait pas toujours un effet positif dans certaines régions du cerveau, d'autres travaux ont permis de démontrer que chez le rat, l'effet de cette stratégie alimentaire est bénéfique (Eckles-Smith 2000). En effet, des rats de souche Fischer-344 ont été

nourris soit à volonté ou soumis à une restriction calorique de 40% dès le sevrage. Afin d'évaluer l'efficacité des récepteurs NMDA, les hippocampes ont été prélevés à 3-6 et 24-26 mois. L'implantation de la restriction calorique a permis un maintien des concentrations de récepteurs NMDA actifs jusqu'à l'âge avancé. En effet, dans la région de l'hippocampe, la concentration des récepteurs NMDA (sous-unité NR-1) du groupe âgé RC étaient de 83% comparativement à 41% pour le groupe âgé AL ($p=0,002$). Chez les jeunes rats, le pourcentage de sous-unités fonctionnelles de NR1 était de 71%.

L'effet bénéfique de la restriction calorique en regard des récepteurs NMDA du système glutaminergique a aussi été observé chez le rat issu cette fois de la souche Wistar (Monti 2003). En effet, les hippocampes des rats soumis à la restriction calorique ou nourris à volonté ont été prélevés à 4 et 24 mois. Comme dans l'étude précédente, on a observé que les jeunes rats ainsi que ceux âgés de 24 mois soumis à la restriction calorique présentaient des concentrations de la sous-unité NR-1 (du récepteur NMDA) de 800 NR1/actin comparativement à ceux nourris à volonté 550 NR1/actine ($p<0,01$).

2.5.3 Le système GABAergique

L'effet de la restriction calorique au vieil âge permet dans la majorité des travaux un maintien des concentrations de récepteurs fonctionnels conçus pour transmettre l'information. Avec tous ces systèmes de transmission de messages que l'on nomme excitateurs tels que ceux cholinergique, dopaminergique et glutaminergique, il en existe un servant de tampon, le système GABAergique permettant de modérer les réactions neuronales produites par ces derniers en jouant le rôle d'inhibiteur. La restriction calorique a aussi un effet bénéfique sur ce système lorsqu'elle est implantée avant l'âge adulte (Mhatre 1998). Ainsi, des rats mâles de souche Fischer-344 ont été soumis à une restriction calorique de 40% ou nourris à volonté. Pour quantifier le nombre de récepteurs GABA(a), l'auteur a utilisé un ligand endogène, c'est-à-dire un produit chimique qui se lie aux sites de certains types de médicaments

comme les benzodiazépines et les barbituriques de manière à régulariser l'inhibition, soit le TBPS. Dans cette étude, le nombre de récepteurs GABA(a) diminue avec l'âge, de 6 à 24 mois, entraînant une baisse du degré d'inhibition. Or, au niveau du cervelet, cet effet est contré par la restriction calorique. À l'âge de 6 mois, la concentration de ligands de TBPS dans le cervelet était de 94 fmol/mg protéine alors qu'elle est de 104 fmol/mg protéine pour le groupe RC. Les rats nourris à volonté âgés de 24 mois ont présenté des concentrations nettement inférieures, soit 27 fmol/mg protéine ($p < 0,005$). Au contraire, dans la région du cortex cérébral, les rats âgés de 6 mois ont présenté des concentrations de 304 fmol/mg protéine comparativement à 234 et 237 fmol/mg de protéine pour les rats âgés des groupes RC et AL ($p < 0,005$). Par ailleurs, cette stratégie alimentaire a eu un effet similaire concernant le couplage du neurotransmetteur GABA au récepteur GABA(a). Dans le cervelet, la densité de récepteurs GABA(a) activés observée chez les rats des groupes jeunes et RC âgés de 24 mois étaient similaires soit 1,0 et 1,18 unités relatives respectivement alors que la densité moyenne des rats âgés nourris à volonté était de 0,57 unités relatives ($p < 0,05$). Cette différence n'a pas été démontrée dans le cortex cérébral indiquant que l'effet de la restriction calorique varie selon la région du cerveau de l'animal.

L'effet bénéfique de la restriction calorique au niveau du cervelet sur le système GABAergique a également été démontré, mais cette fois-ci lorsque la diète était imposée à l'âge adulte (Gould 1995). De plus, dans cette étude, l'auteur a comparé l'effet bénéfique de cette stratégie alimentaire entre les sexes. En effet, chez des rats de même souche soumis à une restriction calorique de 40% ou nourris à volonté, la concentration des récepteurs GABA(a) a été observée à l'âge de 14 et 24 mois chez les mâles et à 24 mois chez les femelles. Pour ce faire, un ligand nommé ISO (agissant similairement au ligand TBPS discuté précédemment) a été utilisé de pair avec le neurotransmetteur GABA pour démontrer l'effet d'inhibition des cellules de Purkinje du cervelet. Il a été observé que chez les mâles soumis à la restriction calorique, les pourcentages d'inhibition étaient de 62,3% et 61,47% à 14 et 24 mois respectivement comparativement à 36,20% ($p < 0,0005$) et 48,34% ($p < 0,01$) chez ceux

nourris à volonté. Chez les femelles testées seulement à 24 mois, celles soumises à la restriction calorique présentaient un pourcentage d'inhibition de 69,58% comparativement à 50,01% chez celles nourries à volonté ($p < 0,0005$).

Ainsi, l'effet de la restriction calorique semble variable selon les régions du cerveau. Toutefois, autant chez les mâles que chez les femelles, cette stratégie alimentaire démontre des effets similaires.

2.5.4 L'apoptose et la neurogénèse

Au cours du vieillissement, on observe une diminution de la concentration de neurones au niveau des régions cérébrales, phénomène qui pourrait participer au déclin cognitif relié à l'âge (Shelke 2003). La restriction calorique semble contribuer à une augmentation de la durée de vie de certains neurones, notamment ceux du cortex frontal, en diminuant l'apoptose (mort cellulaire). En effet, l'augmentation du nombre de récepteurs ARC (apoptosis repressor with CARD) permet de bloquer la cascade de réactions des récepteurs TNF-alpha (TNF) et des caspases, tous deux impliqués dans l'apoptose. De façon normale, les cascades de réactions comprenant les récepteurs TNF et caspase augmentent avec l'âge, ce qui contribue à une augmentation de l'apoptose, pouvant expliquer le déclin cognitif expliqué précédemment. Il a été démontré dans les travaux de Shelke et al (2003) que la restriction calorique ralentit l'apoptose via l'action des récepteurs ARC. En effet, les rats mâles Fischer-344 soumis à la restriction calorique ou nourris à volonté étaient âgés de 12 et de 26 mois lors du prélèvement de leur cerveau. Les résultats ont démontré que l'index d'apoptose était de 1,3 et 0,9 densité optique (OD)/mg de protéine pour le groupe RC âgés de 26 mois et le groupe AL âgés de 12 mois respectivement alors que les rats âgés de 26 mois nourris à volonté présentaient un index d'apoptose de 2,0 ($p < 0,0001$). De plus, le niveau d'ARC était plus élevé chez les rats du groupe RC âgés de 26 mois que chez ceux nourris à volonté soit 140% par rapport à 50% d'efficacité de l'ARC ($p < 0,0001$). Rappelons que l'augmentation de

l'expression d'ARC permet d'atténuer la susceptibilité des récepteurs liés à l'apoptose comme dans le cas des récepteurs de TNF-alpha.

Dans le même ordre d'idées, une seconde étude a permis de démontrer que l'effet de la restriction calorique au niveau du système cognitif agit davantage sur l'augmentation de la durée de vie des neurones de l'hippocampe que sur la neurogénèse (Bondolfi 2004). En effet, des souris de souche C57BL/6 âgées de 2 et 24 mois étaient soumises à une restriction calorique de 40% à partir de la 16^e semaine ou nourries à volonté. Afin d'identifier la concentration de nouvelles cellules neuronales créées, les chercheurs ont utilisé des injections de bromodéoxyuridine (BrdU) permettant l'étiquetage de ces nouvelles cellules créées. Ces dernières ont été comptabilisées en provenance de deux régions de l'hippocampe nommées dentate gyrus (GCL) et hilus. Ainsi, au sujet de la survie des cellules neuronales chez les souris de 24 mois, un effet de la diète a été démontré dans la région de l'hilus de l'hippocampe, soit une survie de 260 BrdU-cellules positives/hilus par rapport à 160 BrdU-cellules positives/hilus pour le groupe nourri à volonté ($p < 0,05$). Toutefois, dans les deux régions étudiées, il n'y a pas eu de prolifération cellulaire plus élevée chez les souris soumises à la restriction calorique âgées de 24 mois ainsi que chez celles nourries à volonté du même âge, soit 500 BrdU-cellules positives/GCL et 220 BrdU-cellules positives/Hilus.

Outre l'effet bénéfique de la restriction calorique au sujet de l'apoptose, cette stratégie alimentaire contribue à la prévention du déclin habituel relié à l'âge des « potentiels à long terme » (LTP) (Eckles-Smith 2000). Ces potentiels sont une forme de synapse qui stimulent le neurone, un effet qui peut persister pendant plusieurs jours. Cette stimulation soutenue est essentielle à l'apprentissage et à la mémorisation de l'information, car plusieurs ont démontré qu'une fois bloquée, aucune mémorisation de l'information n'est possible. Ainsi, des rats de souche Fischer-344 ont été soumis à une restriction calorique de 40% dès le sevrage ou nourris à volonté. À l'âge de 26 mois, les rats du groupe RC ont présenté un pourcentage de potentialisation de 64% comparativement à 20% pour le groupe de

rats du même âge nourris à volonté ($p < 0,05$). Ce pourcentage de potentialisation chez le groupe soumis à la restriction calorique était comparable à celui des jeunes rats âgés de 3 à 6 mois, soit 52%.

Par ailleurs, en plus des effets bénéfiques de la restriction calorique que l'on connaît sur les capacités de cognition pendant le vieillissement, la motricité, quant à elle, est également améliorée, tel qu'il a été discuté dans la section précédente. Cette amélioration de la motricité peut s'expliquer par le fait que la restriction calorique maintient un nombre de motoneurones (neurones reliés à la motricité) constant à travers la vie d'un animal alors que normalement, ce nombre décroît avec l'âge. En effet, une étude a démontré que le nombre de motoneurones chez les rats diminue avec l'âge et cet effet est contré par une restriction calorique (Kanda 2002). Ainsi, des rats de souche Fischer-344/DuCrj ont été nourris à volonté ou soumis à une restriction calorique dès l'âge de 4 semaines leur permettant de se nourrir 3 jours semaine. Les prélèvements au niveau du muscle gastrocnémus ont permis de faire le décompte des motoneurones lorsque les rats étaient âgés de 16 et de 28 mois. Les rats du groupe RC âgés de 28 mois ont présenté un maintien de leur densité motoneuronale comparable à la densité des rats âgés de 16 mois, soit 124,3 motoneurones comparativement à 117 motoneurones pour le groupe de rat nourris à volonté ($p < 0,05$). Aucun effet de la diète n'a été noté entre la densité motoneuronale des rats âgés de 16 mois. Par ailleurs, pour contrer ce manque de motoneurones chez les rats âgés nourris à volonté, il a été démontré, dans la même étude, qu'au vieil âge, le nombre de fibres musculaires augmentent. Chez les rats âgés de 28 mois nourris à volonté, on a dénombré 1630,3 fibres musculaires provenant du gastrocnémus comparativement à 1135,8 et 1178,0 fibres musculaires chez les rats du groupe RC et chez les rats âgés de 16 mois ($p < 0,05$ entre le groupe AL 28 mois et les deux autres groupes). Selon l'auteur, lorsqu'il y a moins de cellules neuronales motrices, comme c'est le cas lors du vieillissement, il y a une formation de fibres musculaires permettant une nouvelle réinnervation avec ce qu'il reste de motoneurones fonctionnels.

La restriction calorique engendre des effets bénéfiques en regard des paramètres biochimiques reliés aux systèmes dopaminergique, cholinergique, GABAergique et glutaminergique tant au sevrage qu'à l'âge adulte. Il est possible de relier l'amélioration des capacités d'apprentissage, mnésiques et moteurs lors des tests de comportement chez les animaux soumis à une telle stratégie alimentaire et le maintien du nombre de récepteurs et autres paramètres biochimiques discutés précédemment. Toutefois, davantage de travaux sont requis afin de permettre d'obtenir une idée plus précise de l'effet de la restriction calorique sur ces paramètres.

3. Les sphingolipides

Parmi les structures au cœur de l'activité cérébrale se trouvent les sphingolipides, une famille de lipides présente dans toutes les régions du cerveau et plus particulièrement en grande quantité dans les régions riches en myéline. En marge de leur rôle dans la conduction nerveuse via la myéline, les sphingolipides participent à la prolifération, la différenciation et la survie des cellules nerveuses (Stoffel & Bosio 1997). Certains d'entre eux sont partie intégrante des radeaux lipidiques, microdomaines des membranes cellulaires et interviennent dans la signalisation et le trafic membranaire (Cinque et al. 2003, Bouillon & Mourad 2003, Hakomory 2005).

3.1 La synthèse des sphingolipides

Les principaux sphingolipides présents dans le cerveau sont les céramides, les sphingomyélines, les cérébrosides, les sulfatides et les gangliosides (Ohanian & Ohanian 2001). La synthèse des sphingolipides débute par la combinaison de molécules de sérine et de palmitoyl CoA par l'action de la coenzyme pyridoxal phosphate (B6), lesquels forment la 3-cetosphinganine après une perte de CO₂ (voir figure R). Par la suite, deux autres étapes de réduction se succèdent utilisant la NADPH et la flavoprotéine comme donneurs d'hydrogène, réaction d'où résulte la

sphingosine. Le céramide est formé par la combinaison de la sphingosine avec un acide gras libre (acyl-CoA) par l'introduction d'un double lien en position trans 4-5.

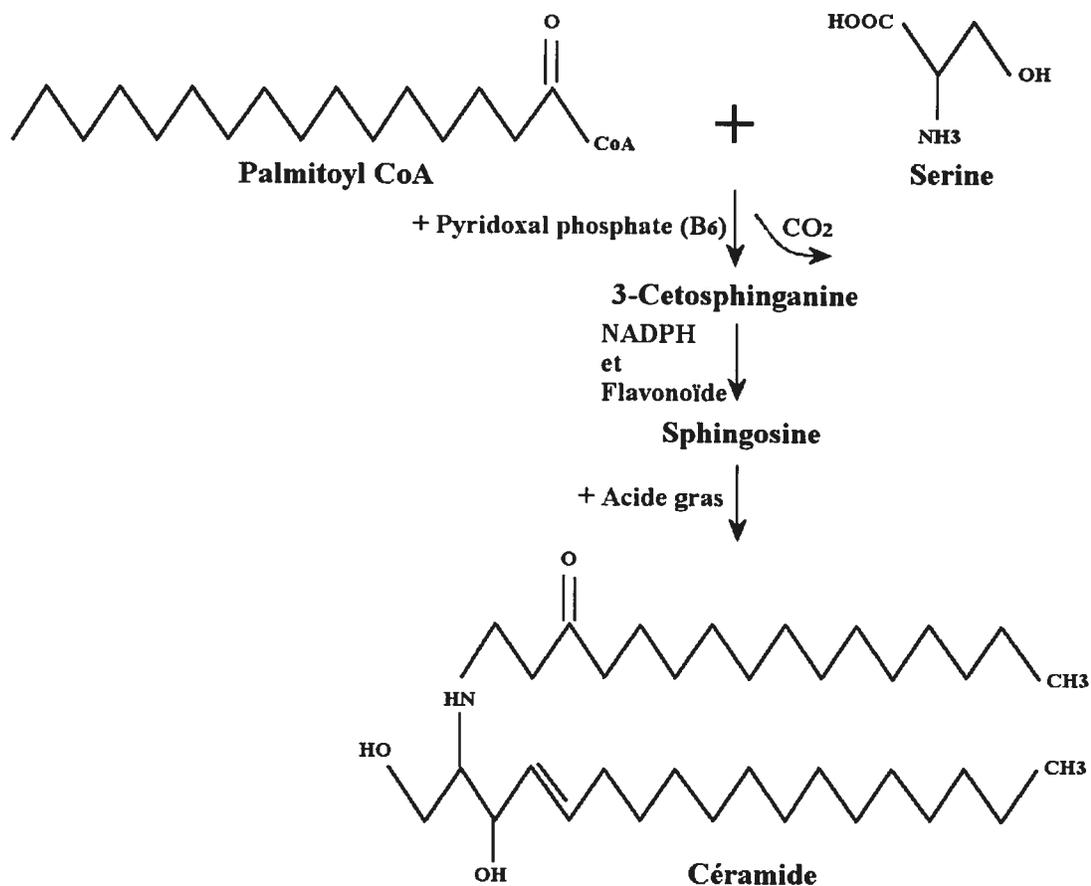


Figure R. Biosynthèse de céramide (Granner et al. 1995; Ohanian & Ohanian 2001)

À cette étape, le céramide, précurseur de tous les sphingolipides, peut se transformer selon trois options majeures. Il peut donner lieu à la sphingomyéline après réaction avec la phosphatidylcholine, ou encore aux gangliosides par l'addition successive de glucides activés et d'un acide sialique. Il peut également former des cérébrosides par la réaction entre le céramide et le UDP-galactosylcéramide ou galactosyltransférase, suivie par l'activation d'un sulfate par la phosphoadénosine-5-phosphosulfate (ou sulfotransférase) afin de synthétiser des sulfatides (figure S).

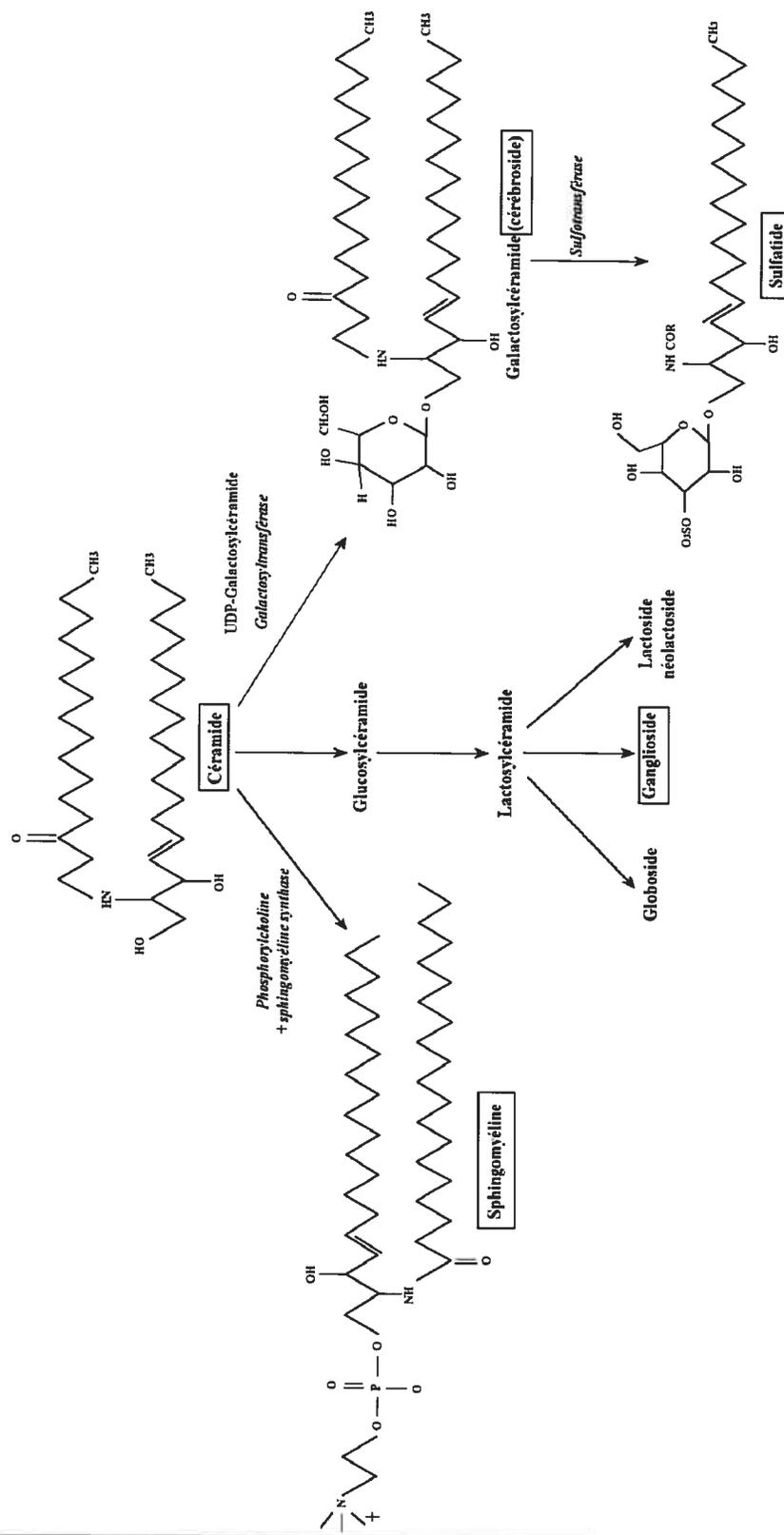


Figure S. Biosynthèse des sphingomyélines et glycosphingolipides (Granner et al. 1995; Ohanian & Ohanian 2001)

Les gangliosides se subdivisent en deux groupes majeurs : la série A contenant un acide sialique lié au galactose, et la série B qui en comprend deux (figure T). Pour chacune de ces séries, un nouveau ganglioside est formé par un ajout de galactosamine (GalNAc), de galactose ou d'acide sialique. Le lactosyl céramide réagit avec la sialyltransférase pour former GM3 de la série A, une molécule composée d'un groupement de galactose-acide sialique-glucose-céramide. À partir de ce ganglioside, une seconde réaction avec la sialyltransférase rajoute un acide sialique et forme GD3 de la série B. Par la suite, l'enzyme N-acétyl-galactosaminyltransférase permet l'ajout d'un groupement GalNAc, d'où la formation de GM2 à partir du GM3 pour la série A et de GD2 à partir de GD3 pour la série B. La galactosyltransférase combine un galactose au GM2, formant le GM1 (série A), ainsi qu'au GD2, formant le GD1b (série B). De même, un nouvel ajout d'acide sialique par la liaison de la sialyltransférase forme le GM1 en GD1a (série A) ainsi que le GD1b en GT1b (série B). Dans la nomenclature, la lettre G représente le ganglioside, tandis que les lettres M, D ou T sont les espèces renfermant un (ou deux ou trois) acide sialique. Le chiffre, quant à lui, correspond à un indice attribué en fonction de la migration chromatographique (Granner et al. 1995)

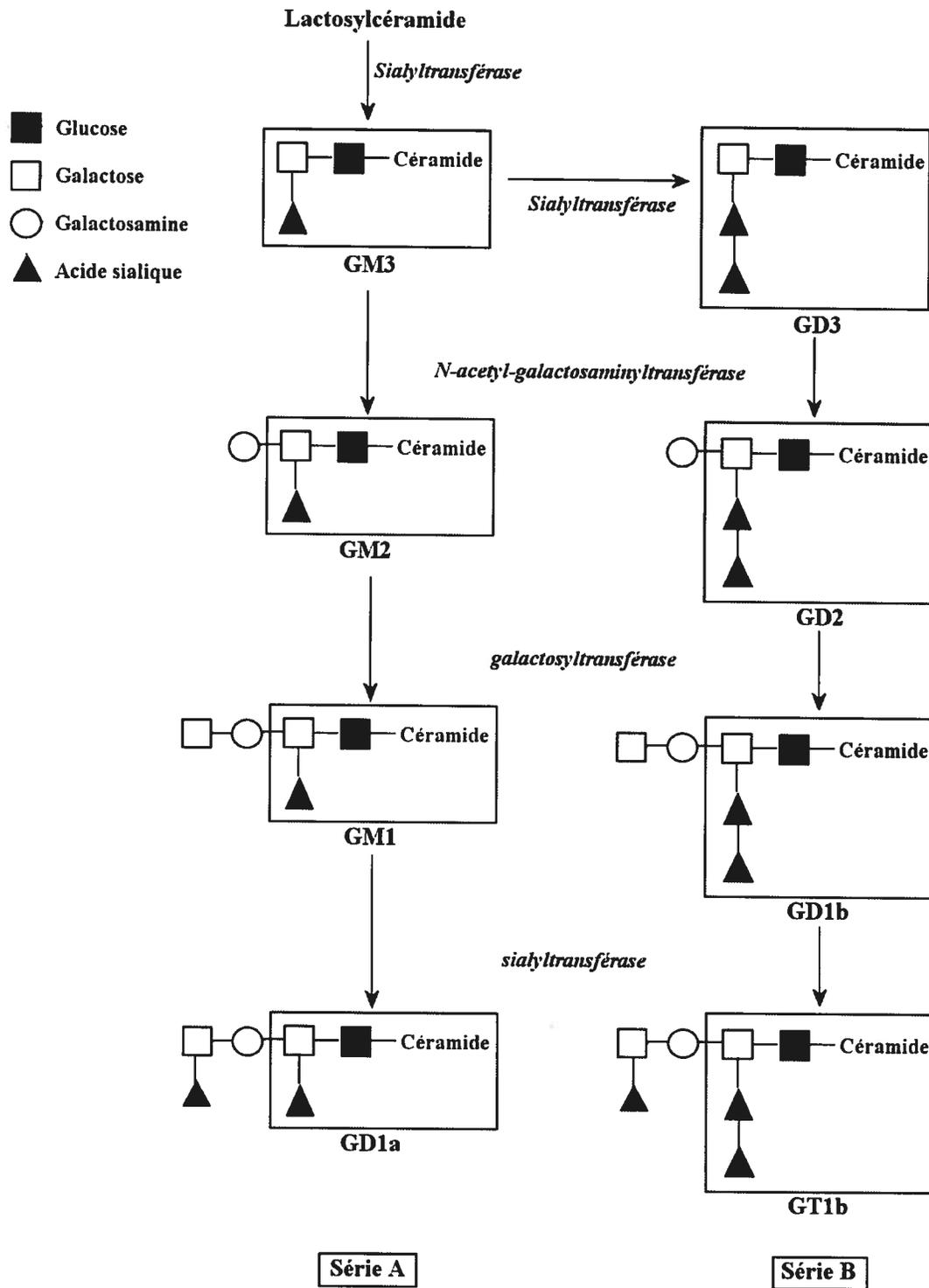


Figure T. Famille des gangliosides (Granner et al. 1995; Fredman et al. 2003; Birklé et al. 2003)

Comme on peut le constater, les sphingolipides forment une vaste famille constituée de plusieurs molécules (plus de 300). De plus, comparativement aux autres organes, le cerveau en est particulièrement riche, variant de concentrations selon les régions (Ohanian & Ohanian 2001, Han et al. 2002). Ainsi, les **sphingomyélines**, les **cérébrosides** ainsi que les **sulfatides** se situent principalement dans les structures riches en substance blanche telle que la gaine de myéline (Cutler & Mattson 2001, Han et al. 2002, Buccoliero & Futerman 2003). Les **céramides** et les **gangliosides**, sont quant à eux, fortement regroupés dans les régions riches en substance grise, contenant le corps cellulaire des neurones. Au niveau cellulaire, tous ces sphingolipides sont particulièrement présents dans les membranes plasmiques, l'appareil de Golgi et les lysosomes (Ohanian & Ohanian 2001).

3.2 Le métabolisme des céramides et des sphingomyélines

Les céramides et les sphingomyélines jouent des rôles prépondérants dans le métabolisme cellulaire. En effet, alors que les sphingomyélines sont majoritairement associées à la survie cellulaire, les céramides, sont quant à eux principalement liés au phénomène d'apoptose (mort cellulaire programmée) (Ohanian & Ohanian 2001, Cutler & Mattson 2001, Buccoliero & Futerman 2003). Lorsqu'étudiée dans des cerveaux d'embryons de rats, l'accumulation de céramides était en effet associée à la production de signaux antimittotiques alors que l'effet inverse était observé pour les sphingomyélines (Ariga et al. 1998). Selon les connaissances actuelles, l'accumulation de céramides au niveau cellulaire découlerait de leur migration de la membrane (couche bilipidique) à l'intérieur de la cellule (Macchia et al. 2002) et/ou de leur production accélérée à partir des sphingomyélines (sous l'action de la sphingomyélinase (SMase), laquelle serait stimulée par divers stimuli de nature pro-apoptotique tels le facteur tumoral nécrosant-alpha (TNF-a) et l'antigène Fas (Cutler et al. 2001, Cuvillier 2002, Bektas & Spiegel 2004).

3.3 Le métabolisme des cérébrosides et des sulfatides

Les cérébrosides et les sulfatides participent quant à eux à la conduction nerveuse. Présents en grande quantité dans la gaine de myéline, leur rôle à cet égard a notamment été démontré chez des souris chez qui le gène codant pour la galactosyltransférase, une enzyme essentielle à la synthèse des cérébrosides et des sulfatides, avait été éliminé (Coetzee et al. 1996, Bosio et al. 1998). Chez ces souris, des désordres du comportement tels que tremblements et ataxie (difficulté de coordination des mouvements volontaires) ont été observés et étaient associés à des défauts de myélinisation conduisant à une conduction nerveuse inefficace (Coetzee et al. 1996). Des résultats qui ont été confirmés dans l'étude de Dupree et al (1998) où des cerveaux de souris où le gène codant pour le céramide galactosyl-transférase (CGT) était absent (-/-), on observait des altérations anatomiques telles que la présence de cavités dans le cytoplasme, de myéline non-compacte et/ou superflue; les données se rapportant aux souris normales et -/- étant 1,3% et 10,9% pour les cavités cytoplasmiques ($p < 0.01$); 3,2% et 35,5% pour la myéline non compacte ($p < 0.01$); 0,8% et 5,2% pour la myéline superflue ($p < 0.05$).

De plus, étant donné le rôle primordial des cérébrosides et des sulfatides dans la conduction nerveuse, leur carence engendre chez la souris une mort prématurée surtout si les enzymes CGT et UDP galactose-céramide sont absentes concurremment. Ainsi, dans l'étude de Ezoe et al (2000), les souris ne possédant pas le gène codant pour les enzymes CGT et/ou de UDP galactose-céramide avaient une durée de vie plus courte que celles possédant des enzymes fonctionnels. Ainsi, la longévité moyenne des souris *cgt* -/- // *galc* ++ était de 100 jours alors que celles des souris *cgt* - // *galc* -/- était de 65 jours ($p < 0,05$).

3.4 Le métabolisme des gangliosides

Tout comme les céramides et les sphingomyélines, les gangliosides jouent un rôle important au niveau de l'intégrité cellulaire (Buccoliero & Futerman 2003, Fredman et al. 2003). Les actions des gangliosides ont notamment été démontrées dans un modèle de rats ischémiques chez qui une carence en gangliosides a induit une diminution de la myélinisation ainsi qu'une dégénérescence axonale (Yamagishi et al. 2003).

Tel qu'illustré dans la Figure T, il existe une variété de gangliosides dont certains sont connus pour induire l'apoptose, alors que d'autres sont associés à la croissance cellulaire. Relativement à la première catégorie, il a été démontré que GM3 inhibe la prolifération cellulaire (Bektas & Spiegel 2004), et qu'une augmentation de GM2 et de GD3 favorise la formation de dendrites ectopiques et/ou de géométrie anormale (Birké et al. 2003). De plus, une carence en GM2 chez la souris a été associée à une diminution de la croissance axonale et dendritique au niveau de l'hippocampe (Buccoliero & Futerman 2003).

Par ailleurs, il existe de l'évidence à l'effet que les gangliosides GM1 et GD1a sont impliqués dans la dendritogénèse et la protection cellulaire (Buccoliero & Futerman 2003), une action qui passe par l'activation d'un facteur de croissance qui engendre la formation de sphingosine-1-phosphate impliquée dans la survie cellulaire (Bektas & Spiegel 2004). D'ailleurs, leur rôle protecteur a été démontré dans une étude de Goettl et al (1999), où l'administration de GM1 à des rats de souche Sprague-Dawley a permis de diminuer le déclin des fonctions dopaminergiques habituellement associé au vieillissement. En effet, le traitement de ce ganglioside pendant 30 jours a réduit le déclin de l'activité de la tyrosine hydroxylase et des niveaux de dopamine dans le striatum et le mésencéphale, les niveaux observés à 21 mois se comparant à ceux de 3 mois. En outre, les concentrations de tyrosine hydroxylase des rats âgés non traités au GM1 étaient inférieures à celles des rats traités (mésencéphale : 0,42 vs 0,7; striatum : 1,8 vs 2,7 nmol/mg de protéine).

À la lumière des résultats bénéfiques observés dans la précédente étude, Goettl et al (2001) ont réalisé une seconde étude afin de vérifier si un traitement au GM1 permettait d'améliorer la locomotion, la capacité exploratoire, la force musculaire et la coordination, des composantes connues pour se détériorer au cours du vieillissement. Réalisée chez rats de souche Sprague-Dawley, l'administration de GM1 n'a pas été associée à des différences significatives de ces paramètres, entre 3 et 21 mois.

3.5 Les sphingolipides au cours du vieillissement normal

Bien que les sphingolipides aient été peu étudiés au cours du vieillissement normal, on tend à observer une diminution des sphingomyélines et une augmentation parallèle des céramides dans les structures sénescents. Ces changements semblent notamment associés à une diminution des enzymes SMase-neutre (qui favorise la dégradation des sphingomyélines), et à une augmentation de l'enzyme glucocérébrosidase et à une diminution de l'enzyme glucosylcéramide synthase (qui favorise la production de céramides) (Venable et al. 2006). Dans une étude réalisée chez la souris, Cutler et al (2004) rapportaient une diminution de 40% des concentrations de sphingomyélines et une augmentation de 80% des céramides cérébraux entre 6 et 25 mois ($p < 0,01$). Précisons que ces changements étaient associés à une augmentation de l'activité de l'enzyme SMase et à une diminution de l'enzyme sphingomyéline synthase ($p < 0,05$).

D'ailleurs, de tels changements enzymatiques ont aussi été associés à l'augmentation des taux de céramides observés au cours du vieillissement au niveau hépatique (Lightle et al. 2000). Lorsque des rats mâles Fischer 344 âgés de 4 et 24 mois étaient étudiés, une accumulation de 40% des céramides était observée dans les foies du groupe âgé.

3.6 Les sphingolipides dans les maladies d'Alzheimer et de Parkinson

Des études récentes portant majoritairement chez l'humain ont permis d'établir un lien entre les altérations du métabolisme des sphingolipides et le développement de certaines maladies neurodégénératives liées au vieillissement telles les maladies d'Alzheimer et de Parkinson.

3.6.1 Le système céramide-sphingomyéline et la maladie d'Alzheimer

La maladie d'Alzheimer (MA) se distingue par le déclin progressif des fonctions supérieures et des troubles de la mémoire. Au plan anatomique, cette maladie du grand âge se caractérise par la présence d'enchevêtrements neurofibrillaires et de plaques de protéine Beta-amyloïde. Ces plaques sont associées à la neurotoxicité cellulaire et contribuent à la dégénérescence neuronale.

En regard des sphingolipides, la MA a surtout été associée à une diminution des sphingomyélines et à une augmentation des céramides dans diverses régions du cerveau (Ariga et al. 1998, Cutler & Mattson 2001, Han et al. 2002). Des travaux ont notamment mis en évidence des taux plus élevés de ces derniers dans l'hippocampe, une région cérébrale particulièrement touchée dans cette maladie. Lorsqu'étudiée chez des patients atteints de MA (Satoi et al. 2005), la concentration de céramides était de 53 nM/ml comparativement à 30,2 nM/ml chez les patients non atteints ($p < 0,01$). De plus, dans d'autres travaux, le lien entre l'augmentation de céramides et la MA a été associé à la sévérité de la maladie. Dans une étude de Cutler et al (2004) qui incluait des patients à divers stades de la maladie (léger, modéré et sévère), la concentration de céramides cérébraux était plus élevée chez ceux dont la maladie était plus avancée ($p < 0,001$).

De même, la diminution des sphingomyélines était démontrée dans une étude de Söderberg et al (1992). Lorsqu'évaluées chez des patients âgés entre 67 et 91 ans, les concentrations de sphingomyélines étaient plus faibles dans les régions riches en substance blanche, l'hippocampe, le bulbe pont et la médulla oblongata, chez les patients souffrant de MA que chez ceux non atteints ($p < 0,05$).

Par ailleurs, il existe de l'évidence à l'effet que certains sphingolipides dont les GM1 et les céramides formeraient des complexes délétères avec les protéines - Beta-amyloïdes. En effet, malgré le fait que les GM1 soient généralement considérés comme bénéfiques en conditions normales, stimulant la synthèse neuronale, leur métabolisme semble altéré dans la MA (Yanagisawa 2002). De même, des complexes céramides — protéines-Beta-amyloïdes ont été observés dans la MA (Mattson 2005). Toutefois, d'autres travaux sont nécessaires afin de préciser la signification clinique de ces complexes, car *in vitro*, une certaine forme de céramide, le C2, s'est avérée protectrice en regard de l'apoptose (Goodman & Mattson 1996).

3.6.2 Les sulfatides et la maladie d'Alzheimer

Le métabolisme des sulfatides semble aussi perturbé dans la MA, ses concentrations déclinant tant dans les régions riches en substance grise que celles riches en substance blanche. Dans une étude de Irizarry (2003) réalisée chez les patients souffrant de MA, les sulfatides étaient réduits de 90% dans les régions riches en substance grise et de 50% dans les régions riches en substance blanche, cette diminution survenant indépendamment du degré de la maladie. Des résultats qui ont été confirmés dans les travaux de Han et al (2002). De plus, dans cette étude, la teneur en sulfatides du liquide céphalo-rachidien était aussi diminuée chez les patients atteints d'Alzheimer, les concentrations de sulfatides chez ces derniers étant de 33,5 pmol/ml de comparativement à 54,3 pmol/ml chez les sujets normaux ($p < 0,0001$).

3.6.3 Les gangliosides et la maladie d'Alzheimer

Tout comme pour les céramides, les sphingomyélines et les sulfatides, le métabolisme des gangliosides ainsi que leur distribution semblent altérés dans la MA (Cutler & Mattson 2001). À ce propos, une étude de Gottfries et al (1996), rapportait une diminution de la teneur en gangliosides totaux dans certaines régions du cerveau de patients atteints de MA. Ainsi, dans les régions riches en substance grise, les concentrations de gangliosides étaient de 2,02 et 2,92 micromole/g dans le cortex frontal ($p < 0,001$) et de 1,61 et 2,42 micromole/g dans l'hippocampe ($p < 0,01$) des patients atteints et non atteints de MA, respectivement.

Selon d'autres travaux, la MA serait associée à des changements dans les concentrations des différents gangliosides (Joseph 2000). En effet, chez ces patients, les gangliosides considérés bénéfiques pour l'organisme (GM1 et GD1a) tendent à diminuer alors que ceux impliqués dans l'apoptose (GM2 et GM3) augmentent. Dans une étude de Kracun et al (1992), les concentrations de GM1 et GD1a au niveau du cortex frontal étaient respectivement de 745 et 1008 nmol LBSA/mg ADN dans le groupe témoin alors qu'elles étaient de 175 et 156 nmol LBSA/mg ADN dans le groupe atteint de MA ($p < 0,05$). Parallèlement, les concentrations de GM2 étaient de 9 nmol LBSA/mg ADN dans le groupe témoin comparativement à 34 nmol LBSA/mg ADN dans le groupe de patients atteints de MA ($p < 0,05$). Dans les travaux de Pitto et al (2005), il a en outre été démontré que davantage de gangliosides GM1 sont transformés en GM2 et GM3 chez les patients atteints de la MA que chez ceux non atteints par la maladie. Rappelons que ces deux gangliosides sont connus pour être liés à l'apoptose. Ainsi, chez des patients atteints de la maladie, les ratios de GM2/GM1 étaient 42% plus élevés par comparaison à ceux du groupe contrôle ($p = 0,001$), alors que les ratios GM3/GM1+GM2 étaient 43% plus élevés que ce qui était observé dans le groupe contrôle ($p = 0,035$).

3.6.4 Les sphingolipides et la maladie de Parkinson

Les travaux portant sur les sphingolipides dans la maladie de Parkinson sont très limités. Toutefois, dans une étude de Zappia et al. (2002) réalisée auprès de 147 sujets atteints de la maladie et 186 témoins appariés pour l'âge, 40 patients (27.2%) répondaient positivement à l'anticorps anti-GM1 contrairement à 5 sujets (2.7%) du groupe témoin ($P < 0.0001$). Par ailleurs, une étude de Tayebi et al. (2003) mettait en évidence une diminution de l'activité de l'enzyme glucocérébrosidase chez les patients atteints de Parkinson (Tayebi 2003). Les travaux relativement au rôle des sphingolipides dans la maladie de Parkinson, se poursuivent.

4. La restriction calorique et les sphingolipides

Contrairement à d'autres tissus tels que le foie où le rôle de la restriction calorique a été étudié (Eiam-Ong & Sabatini 1999, Cha & Jones 2000) seulement deux études ont porté sur le cerveau.

Dans une première étude réalisée chez des rats de souche CD-COBS soumis à une restriction calorique dès le sevrage, Tacconi et al (1990) rapportaient un maintien des concentrations de sphingolipides cérébraux au grand âge chez les animaux soumis à la restriction calorique. Ainsi, les ratios de sphingolipides/phosphatidylcholine étaient de 0,215 à 32 mois chez les animaux du groupe AL, alors qu'ils étaient de 0,167 chez ceux ayant été soumis à la restriction calorique ($p < 0,05$). Or, le ratio observé chez les jeunes rats se situait à 0,157, semblable au groupe âgé du groupe RC.

Dans une deuxième étude, Denny et al (2006) ont montré que la restriction calorique n'améliore pas les concentrations du ganglioside – GM2 dans les cas de la maladie de Sandhoff, une maladie neurodégénérative associée à une accumulation de GM2 dans le cerveau qui mène à la mort cellulaire.

En conclusion, le métabolisme des sphingolipides pourrait être altéré au cours du vieillissement notamment dans certaines maladies neurodégénératives associées au grand âge. Par ailleurs, le rôle de la restriction calorique a été peu étudié en lien avec les sphingolipides. À la lumière de ceci, une étude a été menée dont le but était d'investiguer de manière concurrente, diverses mesures comportementales et le profil des sphingolipides cérébraux d'animaux soumis à une restriction calorique à l'âge adulte.

5. Hypothèse de recherche et objectifs de l'étude

5.1 Formulation de l'hypothèse de recherche

Une restriction calorique implantée à l'âge adulte et maintenue tout au long de la vie, est associée au maintien des capacités cognitives et sensori-motrices au cours du vieillissement, ces dernières étant liées aux concentrations de sphingolipides dans les différentes régions du cerveau.

5.2 Objectifs de l'étude

Les principaux objectifs de cette étude sont les suivants :

- Étudier les effets de la restriction calorique sur diverses mesures comportementales (apprentissage, motricité et anxiété)
- Étudier le profil en sphingolipides des différentes régions du cerveau en lien avec la restriction calorique

- Déterminer si les mesures comportementales sont associées au profil en sphingolipides

II. ARTICLE

Contribution de la candidate.

Dans le cadre du présent mémoire et de l'article qui en découle, Mme Bélanger a été responsable à 100%:

- du maintien de la colonie d'animaux jusqu'au moment des autopsies;
- de l'administration des tests de comportement;
- des dosages de sphingolipides;
- de l'analyse des données et de leur interprétation;
- de la rédaction de l'article et du présent mémoire.

En marge de ceci, Mme Bélanger a participé, avec les autres membres du laboratoire, aux autopsies des rats.

Caloric restriction and cognitive function in aged Sprague-Dawley rats : potential links with sphingolipid profiles

Élisabeth Bélanger, Joseph Rochford, Pierrette Gaudreau et Guylaine Ferland

Département de nutrition, Université de Montréal, Montréal (Qué)
Canada, H3C 3J7

To whom reprint requests should be addressed. Dr Ferland, Ph.D., Département de Nutrition, Université de Montréal, C.P. 6128, Succ. Centre-ville, Montréal (Qué), Canada, H3C 3J7. Tel : (514) 343-7167, Fax : (514) 343-7395, E-mail : Guylaine.Ferland@umontreal.ca

Supported by a grant from the *Réseau québécois de recherche sur le vieillissement* (RQRV).

The authors' contributions were as follows—EB: conducted the behavioural testing and sphingolipid analyses and wrote the manuscript; JR: supervised the behavioural testing; PG: provided access to the animals; GF: conceived the present study, assisted with the interpretation of the data and contributed critical revision of the manuscript. None of the authors have any personal or financial conflicts of interest.

Abbreviations used : **CR**, caloric restriction; **AL**, ad libitum; **TNF**, tumor necrosis factor; **NMDA**, N-methy-D-alanine; **BDNF**, brain derived neurotrophic factor; **CB**, cerebellum; **PM**, pons medulla; **MB**, mid brain; **HPP**, hippocampus; **FC**, frontal cortex; **STR**, striatum; **OB**, olfactory bulb; **THA**, thalamus; **HT**, hypothalamus

ABSTRACT

Caloric restriction (CR), now referred to a *successful aging* model, has been shown to retard age-related physiological decline and postpone the onset of pathologies seen in old age. In brain, a limited number of studies have shown CR to attenuate age-related cognitive decline including memory, and improve motor function. Among the entities that could support the beneficial effect of CR in brain, are the sphingolipids (SL), a class of complex lipids found in high concentrations in the white matter, notably the myelin sheath. In addition to their structural role in cell membranes, sphingolipids are now known to participate in a variety of important cellular events including cell differentiation, proliferation and survival. In light of this, and because the potential association between behavioural performance and sphingolipid profile in the RC model, has, to our knowledge, never been explored, a study was conducted in 21 month old male Sprague-Dawley rats, half of whom had been fed ad libitum (AL) all their lives, the other half having been subjected to a 40% caloric restriction (RC) at the age of 8 months; a group of rats aged 2 months served as controls. Behavioural testing included motor abilities and exploratory behaviour (using the *open-field*), anxiety (elevated plus maze) and cognitive abilities and memory (using the Morris water maze). Sphingolipids were investigated in eight distinct brain regions namely cerebellum, pons medulla, midbrain, hippocampus, frontal cortex, striatum, olfactory bulb, thalamus and hypothalamus, and included the gangliosides, the cerebroside, the ceramides, the sphingomyelin and the sulfatides. Rats subjected to caloric restriction had better learning abilities (latency; group*day, $8,245=6,288$, $p<0,001$) and higher exploratory behaviour (covered distance; group*day, $4,147=4,834$, $p<0,001$) compared to rats who had been fed ad libitum all their lives. Anxiety was not affected by CR but this component decreased significantly as a function of age. In parallel, caloric restriction was associated with decreased ceramide concentrations in the thalamus ($2,21=19,250$, $p<0,001$) and the hypothalamus ($2,21=87,538$, $p<0,001$), two regions rich in grey matter; with an increase in sulfatides in the midbrain ($p<0,05$) and frontal cortex ($p<0,05$); and with increased gangliosides in the frontal cortex ($2,20=5,225$, $p=0,015$) and the olfactory bulb ($2,19=9,278$, $p=0,015$). In light

of the well established deleterious effects of ceramides in cells i.e apoptosis, their lower concentration in the hypothalamus could in part support the beneficial effects of CR in cognition. Similarly, the observed increased levels of sulfatides and gangliosides in the frontal cortex and midbrain could help sustain motor function in the RC rats during aging.

INDEXING KEY WORDS

Caloric restriction, aging, sphingolipids, ceramide, cerebroside, sphingomyelin, sulfatide, ganglioside, cognition, memory, anxiety, motor functions.

INTRODUCTION

Caloric restriction is now considered a successful ageing model as it has been found to increase longevity and retard age-related physiological decline and a number of pathological conditions associated with aging (Sohal 1996). Relative to systemic functions, the role of caloric restriction in brain and the nervous system are limited (Weindruch 2003). Yet, aging is associated with a variety of cognitive changes that include decline in memory, processing speed and executive function (Idrobo 1987, Stewart 1989, Dubey 1996). Furthermore, conditions such as Alzheimer's and Parkinson's disease are much more common in old age.

Studies that have been conducted to date using the caloric restriction regimen have shown beneficial effects with respect to learning abilities (Stewart 1989, Algeri 1991, Gould 1995, Bellush 1996, Magnusson 2001), motor activities (Ingram 1987, Means 1993, Markowska 1999) and balance and coordination (Pitsikas 1990, Dubey 1996).

Of the brain components that could support the beneficial effects of caloric restriction with respect to sensori-motor functions and cognition during aging, are the sphingolipids, an important class of lipids found in large concentrations in the brain, notably in the white matter area. Data collected in the last decade, indicate that in addition to their role as structural components of cell membranes, sphingolipids participate in important cellular events such as cell differentiation, proliferation and survival (Stoffel 1997). Important sphingolipids found in brain include ceramides, sphingomyelins, cerebroside, sulfatides and gangliosides (Ohanian 2001). While sphingomyelins are mainly associated with cell survival and proliferation, ceramides have been linked to apoptosis (Ohanian 2001, Buccoliero 2003). Cerebroside and sulfatides participate in neuronal conduction as components of the myelin sheath while gangliosides, which form a family of compounds, are involved in cell survival growth and apoptosis (Buccoliero 2003, Birké 2003, Betkas 2004).

In light of this, and because the potential association between behavioural performance and sphingolipid profile in the RC model, has, to our knowledge, never been explored, a study was conducted in which various behavioural components and sphingolipid profile were investigated in rats subjected to caloric restriction during adulthood.

MATERIALS AND METHODS

Animals and diets

Fifty Sprague-Dawley male rats were obtained from Charles River, St-Constant, Quebec. At 8 months of age, half the rats were subjected to a 40% caloric restriction (CR) while the other half were fed an ad libitum (AL) diet throughout their lives. Animals from the AL group were fed the AIN-93 diet while those from the CR group received an AIN-93-based diet enriched with vitamins and minerals so that micronutrient levels were equivalent. The AIN-93 diet is made of 20% casein, 20% sucrose, 29.5% corn starch, 14% maltodextrine, 5.5% corn oil, 5% cellulose, 3.5% AIN-93G vitamin mix, 0.3% methionine, 0.3% choline bitartrate and 0.001% tertiary butylhydroquinone (Harland, Teklad, Madison, WI). All rats were housed individually in a plexiglass cage and kept on a 12/12 light/dark cycle from 6h to 18h. Light illumination did not exceed 45 lux. Rats were handled 2-3 times per week (2-4 minutes each time) throughout their lives. At 3 and 22 months of age, animals were subjected to behavioral testing (below) after which they were anesthetized with pentobarbital and killed by bleeding from the abdominal aorta. Brain regions including cerebellum, pons medulla, mid brain, frontal cortex, olfactory bulb, thalamus, hypothalamus, hippocampus and striatum were dissected on ice, frozen in liquid nitrogen and stored in a -80°C freezer for future analysis.

Behavioral tests

Behavioral testing aiming to assess memory and learning (Morris water maze), motor ability (open field) and anxiety (elevated plus maze) were conducted in all animals at 3 and 21 months of age.

Morris Water maze

A four foot diameter metal black pool was filled with water (19-21°C) in the center of a room with subdued light. A platform submerged 1 cm under water surface was placed in the center of one quadrant. Spatial cues included geometric forms on the walls of the room, as well as other items (the lights in the room, the experimenter). Each rat was allowed 4 trials each day to locate the platform, each trial starting at a different cardinal point; north, south, west and east respectively. At each trial, the animal had a maximum of 120 seconds to find the platform. If the animal failed to locate the platform during the allowed time, he was placed on the platform and left there for 30 seconds to figure out the platform's location. The test was conducted over 5 consecutive days. Rats' performances were captured using the HVS tracker system and processed by HVS Water 2020 software, Hampton, UK.

Probe & Cue test

On day 6, the Probe and Cue tests were conducted. For the Probe test, the platform is removed and rats have two-30 sec trials to search and swim in the quadrant where the platform was. The path and the time spent in each quadrant are recorded; a greater time spent in the quadrant where the platform was is indicative of better learning. The Cue test is run to evaluate the visual acuity of the animals; this is accomplished by decreasing the water level of the pool and making the platform visible. As for the Probe test, the animal has two-30 sec trials to find the platform; animals without visual impairments find the platform in very little time.

Open field

The open field consists of a 1m² black box where the animal is placed in the center and the path covered is captured by a camera HVS tracker system above the box. Because rats are curious by nature, they tend wander around rats when put in a new environment. Rats showing motor or cognitive impairments are not so active and

limit the extent of their exploration. The test is conducted over three consecutive days, each rat being allowed one trial per day, each lasting 5 minutes.

Elevated Plus Maze

The Elevated Plus Maze made of wood, painted grey, consisted of four arms (90 x 8cm) shaped in the form of a cross and elevated 100 cm from the floor. Two opposite arms were enclosed by side and end walls (15cm height), the latter two arms were open. The connecting center area measured 10x10cm. The maze was placed in the center of a room. Each rat had one trial per day of 300 seconds to explore the maze during three consecutive days. Entries and time spent in each arms was captured.

Sphingolipids analysis

Sphingolipids were isolated from total lipids according to the method of Bodennek (2000). Gangliosides, ceramides, cerebroside, sphingomyelin and sulfatides were purified by solid-phase extraction. Lipids were extracted from the brain regions using chloroform:methanol (2:1, v/v) and partitioned according to the method of Folch (1957). Gangliosides contained in the upper phase, were eluted and filtered with C-18 silica column according to the method of Williams & McCluer (1980). After evaporation, gangliosides were suspended in chloroform:methanol (2:1, v/v). Total gangliosides were measured by the quantification of free sialic acids according to the method of Jourdian (1971) using periodate-resorcinol. The Folch lower phase, containing ceramides, cerebroside, sphingomyelin and sulfatides was evaporated and resuspended in 500 μ L of chloroform and lased onto 500mg LC-NH₂ columns (Supelco, Oakville, ON) preconditioned with 2 mL of hexane. The cartridges were washed with 2 mL of ethyl ether. Ceramides were eluted with 3 mL of chloroform:methanol (23:1, v/v). Columns were then washed with 2 mL of diisopropyl ether: acetic acid (98:5, v/v). Cerebroside were eluted with 4 mL of acetone:methanol (9:1.35, v/v). Sphingomyelin was eluted with 3 mL of chloroform:methanol (2:1, v/v). Finally, sulfatides were obtained by washing with 4

mL of methanol containing 0,2 mol/L aqueous ammonium acetate. This fraction was then applied to a C-18 silica column preconditioned with 3 mL of PBS:methanol (1:1, v/v). The eluted fraction was reapplied and washed with 3 mL of H₂O. Sulfatides were eluted with 2 mL of methanol and 2 mL of chloroform:methanol (1:1, v/v). Each fraction was evaporated and suspended in chloroform:methanol (2:1, v/v). Ceramides, cerebroside and sphingomyelin were quantified by determination of sphingosine with fluorescamine according to the method of Naoi (1974) and sulfatides with azure A according to the method of Kean (1968) using UV absorbance detection. All solvents were analytical graded and were purchased from Fischer Scientific Canada (Nepean, ON). Sphingoid bases used as standards (cerebroside sulfate, sialic acid and sphingosine) were from Sigma (St Louis, MO).

Gangliosides separation by thin layer chromatography

After separation of gangliosides on C-18 silica column, samples are deposited on HPTLC plates (10 × 10 cm) precoated with Silica Gel 60 (glass or aluminium backing) (E. Merck, Darmstadt, Germany). The samples were separated in chloroform/methanol/0.2% CaCl₂ (v/v/v, 55/45/10). The gangliosides were spotted onto the plates using Linomat (CAMAG Scientific, Wilmington, NC). The plates were pre-run in chloroform to eliminate neutral lipid and other contaminants that may interfere with the mobility of gangliosides. Gangliosides were visualized by heating at 150 °C after spraying with resorcinol-HCl reagent (10 ml of 2% resorcinol in water, 40 ml concentrated HCl, and 0.125 ml of 0.1 M copper sulfate). All solvents were analytical graded (Fischer Scientific Canada; Nepean, ON) and standards were from Sigma (St Louis, MO).

Statistical analysis

Statistical analyses were conducted using Sigma Stat 2.0 software (SPSS, Chicago, IL). Data are the mean ± SEM. Performances in the Morris Water maze were evaluated by Two-Way and One-Way ANOVAs using Tuckey's test. Sphingolipid

data were analysed by One-Way ANOVA (Tuckey's test) and t-test; $P < 0,05$ was considered statically significant.

RESULTS

Caloric restriction and behavior

The impact of caloric restriction on learning, motor ability, and anxiety was determined in 3 and 22-month old rats, half of the latter having been subjected to caloric restriction at adulthood or fed ad libitum throughout their lives.

Morris Water Maze:

Over the five days of experimentation, all animals learned to locate the platform and improved their performances over time (figure 1). Furthermore, caloric restriction was associated with better learning abilities in old age as indicated by the ANOVA conducted on the latency scores which yielded a significant group x day interaction ($F_{(8,245)}=6,288$, $p<0,001$). In fact latencies of CR rats were comparable to those of younger rats at day 2; results on day 2 are especially reflective of the animals' learning abilities. The positive impact of CR was also observed with respect to the distance swum ($F_{(2,49)}=6,106$; $p=0,004$), with rats from the CR group presenting distances at day 2, similar to those of young animals (figure 2).

Finally, the cue test (test with visible platform), confirmed the absence of visual impairment and comparable motor abilities across groups.

Open Field:

Caloric restriction was also associated with beneficial effect in motor activity as indicated by the ANOVA analyses which yielded a significant group x day interaction with respect to the distance covered ($F_{(4,147)}=4,834$; $p<0,001$) (figure 3). On the first day of the test, the covered distance by young and rats from the CR group were significantly greater than those of the old AL rats. Furthermore, the exploratory capacity of CR rats was statistically higher than that of the AL rats over the three trials.

Elevated Plus Maze:

Overall, young animals were more anxious than the old ones. Time spent before entering in an open arm was less than 25 seconds in the old animals compared to 150 seconds for the young animals ($2,35=11,566$; $p<0,001$) (figure 4). Time spent in the open arms ($2,35=21,741$; $p<0,001$) as well as total entries ($2,35=41,261$; $p<0,001$) also revealed higher anxiety in the younger rats. Finally, higher anxiety level in the young group was also indirectly obtained in the open field test where the young rats spent less time in the center of the maze and spent more time wandering alongside the walls of the box (age/diet; $2,147=64,739$; $p<0,001$; group x day; $4,147=0,500$; $p=0,736$).

Caloric restriction and sphingolipid profile

Sphingolipids distribution varied across brain regions (gangliosides; 8,72=29,318, $p<0,001$: sulfatides; 8,72=53,660, $p<0,001$: sphingomyelin; 8,72=136,264, $p<0,001$: cerebrosides; 8,74=32,969, $p<0,001$: ceramides; 8,65=35,872, $p<0,001$) (figures 5 to 9). Sphingomyelin concentrations were highest in regions rich in white matter namely the pons medulla and the midbrain, although sphingomyelin concentrations were also high in the cerebellum. Cerebroside and sulfatide concentrations were lower in regions rich in grey matter notably the frontal cortex and the hippocampus. Ceramide and ganglioside concentrations were highest in regions rich in grey matter especially the hippocampus, striatum, frontal cortex, olfactory bulb, thalamus and hypothalamus.

Sphingomyelin and sulfatide concentrations increased with age in the majority of brain regions while cerebrosides remained stable in every regions except the frontal cortex ($p<0,05$). Gangliosides decreased during aging but caloric restriction was associated with levels comparable to those seen in young rats in frontal cortex and olfactory bulb (frontal cortex; 2,20=5,225, $p=0,015$: olfactory bulb; 2,19=9,278, $p=0,015$). The effect of age on ceramides varied according to regions but caloric restriction decreased ceramide concentrations in regions rich in grey matter (thalamus; 2,21=19,250, $p<0,001$: hypothalamus; 2,21=87,538, $p<0,001$).

Caloric restriction and HPTLC gangliosides fractions

The different gangliosides assessed on thin layer chromatography were GD1a, GT1b, GD1b and GM1. Preliminary results of the ganglioside distribution in brain regions among different groups are shown in figure 10. Differential distribution of gangliosides in brain regions is observed. In the majority of brain regions, there is more GT1b while GD1b, GD1a and GM1 concentrations fluctuate between regions. GT1b is found in lower concentrations in pons medulla, cerebellum, striatum and frontal cortex of the RC group, while in the other regions, GT1b concentrations are

comparable. The GD1b ganglioside is particularly found in white matter regions. Moreover, in those regions, a diet effect is observed; there is more GD1b in RC group than in the AL group. Concentrations of GD1a are comparable across regions and between groups while GM1 is found in highest concentrations in pons medulla, midbrain, striatum, thalamus and hypothalamus. In these regions, GM1 concentrations are higher in the RC group than in the AL group.

DISCUSSION

The aim of the present study was to investigate the potential link between behavioral components and brain sphingolipid profile in rats subjected to caloric restriction during adulthood.

As reported in the literature (Stewart 1989, Bellush 1996), cognitive and motor abilities decreased significantly during aging in the present study, performances of old rats on the Morris Water Maze and Open Field test being statistically inferior to those of young rats. In contrast, anxiety level as assessed with the Elevated Plus Maze was higher in young than in old animals, in agreement with the study of Torras-Garcia (2005).

Caloric restriction introduced at 8 months of age was associated with improved learning abilities in old age (22 months), confirming previously published results (Idrobo 1987, Pitsikas 1992, Gould 1995, Dubey 1996, Magnusson 2001). It also resulted in increased exploratory activity with CR rats showing statistically higher covered distance compared to AL rats. Whether this latter finding is linked to the fact that animals undergoing caloric restriction diet are more likely to be looking for food, or is independent of this, requires further investigation. To our knowledge, only one other study, conducted in mice, investigated exploratory activity in this dietary restriction paradigm using the Open field test (Ingram 1987). In contrast to the present study, no diet effect were observed. Finally, although anxiety was significantly lower in old animals, it was not affected by diet.

Learning abilities, exploratory activity and anxiety are generally associated with specific brain regions (Mhatre 1998, Cutler 2001, Zappia 2002 Alessandro 2004, Sato 2005). Specifically, the hippocampus is especially important with respect to working and spatial memory (Pitsikas 1992) while the thalamus and the hypothalamus have wide ranging actions, participating in learning and memory processes, anxiety control and exploratory activity. These actions are linked to their

involvement in the GABAergic and dopaminergic systems. Finally, the frontal cortex is especially important with respect to working and sensory memories.

In the present study, sphingomyelin and sulfatide concentrations tended to increase in certain brain regions during aging while those of ganglioside decreased; the effect of age on ceramides varied according to regions. To our knowledge, only two studies investigated the effect of caloric restriction on sphingolipid concentrations in the brain during aging. In those studies, total sphingolipid concentrations decreased with age, a trend that was largely prevented by caloric restriction (Tacconi 1990). In the present study, caloric restriction especially influenced ceramide, sulfatide and ganglioside concentrations (figures 5, 8 and 9). Specifically, CR decreased ceramides in the thalamus and hypothalamus and to a lesser extent in the hippocampus. Given the physiological role of these brain regions, these results could, in part, explain the superior learning abilities and exploratory activity observed in rats subjected to caloric restriction .

Similarly, the diet-induced decrease in ceramide observed in the thalamus and hypothalamus could contribute to the better learning and exploratory behaviour of the CR rats. Ceramides have indeed been shown to decrease brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels, especially in the thalamus (Lu 2006). Available data suggest that BDNF is highly involved in neuroprotection and neurogenesis and its decrease has led to learning deficits in mice. Similarly, increased levels of BDNF has been associated to lower cell death in the hippocampus (Lu 2006). Hence, results from the present study suggest that caloric restriction could improve learning abilities and exploratory activity by favourably altering the ceramide profile specifically in the thalamus, hypothalamus and the hippocampus.

In the present study, caloric restriction was associated with increased sulfatide concentrations in some regions, notably the frontal cortex. Studies conducted in the last 30 years have shown sulfatides to contribute to the serotonergic system with them notably enhancing the efficiency of the serotonin binding sites (Tamir 1980).

Serotonergic activities are important with respect to learning and memory processes especially in the frontal cortex and hippocampus (Burrell 2001, Garcia-Alloza 2006). In light of this, the diet-induced changes in sulfatides and gangliosides observed in the present study could contribute to the better cognitive abilities of the CR rats in old age.

With respect to the gangliosides, GM1 and GD1a have been associated with cell protection and dendriogenesis while GM2, GM3 and GD3 have been linked to cell death and abnormal dendrite formation (Buccoliero 2003). In the present study, CR was associated with an increase in total ganglioside concentrations in the frontal cortex. Furthermore, based on our preliminary results, this was also accompanied by higher GM1 concentrations in regions such as the thalamus and hypothalamus. This particular ganglioside, has been shown to play a role in the activation of the extracellular-regulated protein kinases (ERK) in the frontal cortex and in the hippocampus in male Sprague-Dawley rats (Mo 2005); these proteins kinases being important for neuronal function. In humans, GM1 and GD1a concentrations have been shown to decrease between the ages of 20 and 100 years, and those of GM3 and GD3, to increase, in the frontal cortex (Svennerholm 1994). If confirmed, an increase in the concentration of GM1 in the thalamus and hypothalamus could, through activation of the ERK system, contribute to the maintenance of the neuronal connections required during learning and in part explain the better cognitive abilities of rats under caloric restriction.

To our knowledge, this study is the first one to explore the link between behaviours and sphingolipid profile. Our preliminary results suggest potential links between the maintenance of the learning abilities observed in CR rats and their sphingolipid profile. However further studies need to be conducted to confirm and specify the role of the individual sphingolipids in this dietary paradigm.

REFERENCES

- Alessandro, A.V., Bugrova, A.E. et Dudnik, L.B. (2004) Connection of lipid peroxide oxidation with the sphingomyelin pathway in the development of Alzheimer's disease. *Biochemical Society transactions*. 42(1) : 144-146.
- Algeri, S., Biagini, L., Manfredi, A. et Pitsikas, N. (1991) Age-related ability of rats kept on a life-long hypocaloric diet in a spatial memory test. Longitudinal observations. *Neurobiology of Aging*. 12 : 277-282.
- Bellush, L.L., Wright, A.M., Walker J.P., Kopchick, J. et Colvin, R.A. (1996) Caloric restriction and spatial learning in old mice. *Physiology & behavior*. 60(2) : 541-547.
- Bektas, M. et Spiegel, S. (2004) Glycosphingolipids and cell death. *Glycoconjugate journal*. 20 : 39-47.
- Birké, S., Zeng, G., Gao, L., Yu, R.K. et Aubry, J. (2003) Role of tumor-associated gangliosides in cancer progression. *Biochimie*. 85 : 455-463.
- Bodennec, J., Koul, O., Aguado, I., Brichon, G., Zwingelstein, G., Portoukalian, J. (2000) A procedure for fractionation of sphingolipid classes by solid-phase extraction on aminopropyl cartridges. *Journal of lipid research*. 41(9) : 1524-1531.
- Bosio, A., Binczek, E., Haupt, W.F. et Stoffel, W. (1998) Composition and biophysical properties of myelin lipids define the neurological defects in galactocerebroside and sulfatide deficient mice. *Journal of neurochemistry*. 70 : 308-315.

- Buccoliero, R. et Futerman, A.H. (2003) The roles of ceramide and complex sphingolipids in neuronal cell function. *Pharmacological research : the official journal of the Italian Pharmacological Society.* 47 : 409-419.
- Burrell, BD. et Sahley, CL. (2001) Learning in simple systems. *Current opinion in neurobiology.* 11(6) : 757-764.
- Carr, K.D., Kim, G.Y. et Cabeza de Vaca, S. (2001) Rewarding and locomotor-activating effects of direct dopamine receptor agonists are augmented by chronic food restriction in rats. *Psychopharmacology.* 154 : 420-428.
- Coetzee, T., Fujita, N., Dupree, J., Shi, R., Blight, A., Suzuki, K., Suzuki, K. et Popko, B. (1996) Myelination in the absence of galactocerebroside and sulfatide : Normal Structure with abnormal function and regional instability. *Cell.* 86 : 209-219.
- Cutler, R.G. et Mattson, M.P. (2001) Sphingomyelin and ceramide as regulators of development and lifespan. *Mechanisms of ageing and development.* 122 : 895-908.
- Davis, L.J., Hakim, G., Masiello, P., Novelli, M., Bergamini, E. et Licastro, F. (1994) Plasma protein's glycation is decreased in Sprague-Dawley rats under caloric restriction. *Archives of gerontology and geriatrics.* 19 : 295-301.
- Denny, C.A., Kasperzyk, J.L., Gorham, K.N., Bronson, R.T. et Seyfried, T.N. (2006) Influence of caloric restriction on motor behavior, longevity and brain lipid composition in Sandhoff disease mice. *Journal of neuroscience research.* 83 : 1028-1038.
- Dubey, A., Forster, M.J., Lal, H. et Sohal, R.S. (1996) Effect of age and caloric intake on protein oxidation in different brain regions and on behavioral functions of the mouse. *Archives of biochemistry and biophysics.* 333(1) : 189-197.

- Engelmann, M., Ebner, K., Landgraf, R., Wotjak, CT. (2006) Effects of Morris water maze testing on the neuroendocrine stress response and intrahypothalamic release of vasopressin and oxytocin in the rat. *Hormones and behavior*. 50(3) : 496-501.
- Folch, J., Lees, M., Sloane Stanley, GH. (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *The Journal of biological chemistry*. 226(1) : 497-509.
- Fredman, P., Hedberg, K. et Brezicka, T. (2003) Gangliosides as therapeutic targets for cancer. *BioDrugs : clinical immunotherapeutics, biopharmaceuticals and gene therapy*. 17(3) : 155-167.
- Garcia-Alloza, M., Zaldua, N., Diez-Ariza, M., Marcos, B., Lasheras, B., Javier Gil-Bea, F., Ramirez, MJ. (2006) Effect of selective cholinergic denervation on the serotonergic system: implications for learning and memory. *Journal of neuropathology and experimental neurology*. 65(11) : 1074-1081.
- Giusto, N.M., Roque, M.E. et Ilincheta de Boschero, M.G. (1992) Effects of aging on the content, composition and synthesis of sphingomyelin in the central nervous system. *Lipids*. 27(11) : 835-839.
- Gomi, F. et Matsuo, M. (1998) Effects of aging and food restriction on the antioxidant enzyme activity of rat livers. *The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences*. 53(3) : B161-167.
- Gottfries, C., Karlsson, I. et Svennerholm, L. (1996) Membrane components separate early-onset Alzheimer's disease from senile dementia of the Alzheimer type. *International psychogeriatrics / IPA*. 8(3) : 365-372.

Gould, T.J., Bowerkamp, K.E., Larson, G., Zahniser, N.R. et Bickford, P.C. (1995) Effects of dietary restriction on motor learning and cerebellar noradrenergic dysfunction in aged F344 rats. *Brain research.* 684 : 150-158.

Han, X., Holtzman, D.M., McKeel Jr., D.W., Kelley, J. et Morris, J.C. (2002) Substantial sulfatide deficiency and ceramide elevation in very early Alzheimer's disease : potential role in disease pathogenesis. *Journal of neurochemistry.* 82 : 809-818.

Herr, I., Martin-Villalba, A., Kurz, E., Roncaioli, P., Schenkel, J., Cifone, MG., Debatin, KM. (1999) FK506 prevents stroke-induced generation of ceramide and apoptosis signaling. *Brain research.* 826(2) : 210-219.

Idrobo, F., Nandy, K., Mostofsky, D.I., Blatt, L. et Nandy, L. (1987) Dietary restriction : effects on radial maze learning and lipofuscin pigment deposition in the hippocampus and frontal cortex. *Archives of gerontology and geriatrics.* 6 : 355-362.

Ikeno, Y., Bertrand, H.A. et Herlihy, J.T. (1997) Effets of dietary restriction and exercise on the age-related pathology of the rat. *Age.* 20 : 107-118.

Ingram, D.K., Weindruch, R., Spangler, E.L., Freeman, J.R., Walford, R.L. (1987) Dietary restriction benefits learning and motor performance of aged mice. *Journal of gerontology.* 42(1) : 78-81.

Irizarry, M.C. (2003) A turn of the sulfatide in Alzheimer's disease. *Annals of neurology.* 54(1) : 7-8.

Jourdan, GW., Dean, L., Roseman, S. (1971) The sialic acids. XI. A periodate-resorcinol method for the quantitative estimation of free sialic acids and their glycosides. *The Journal of biological chemistry.* 246(2) : 430-435.

Kean, EL. (1968) Rapid, sensitive spectrophotometric method for quantitative determination of sulfatides. *Journal of lipid research.* 9(3) : 319-327.

Kozawa, O., Yamamoto, T., Tanabe, K., Akamatsu, S., Dohi, S., Uematsu, T. (2000) Enhancements by sphingosine 1-phosphate in vasopressin-induced phosphoinositide hydrolysis in aortic smooth-muscle cells: involvement of p38 MAP kinase. *Journal of cellular biochemistry.* 80(1) : 46-52.

Levi, B. et Werman, M.J. (1998) Long-term fructose consumption accelerates glycation and several age-related variables in male rats. *The Journal of nutrition.* 128 : 1442-1449.

Lightle, S.A., Oakley, J.I. et Nikolova-Karakashian, M.N. (2000) Activation of sphingolipid turnover and chronic generation of ceramide and sphingosine in liver during aging. *Mechanisms of ageing and development.* 120 : 112-125.

Lin, M.T. et Beal, M.F. (2003) The oxidative damage theory of aging. *Clinical neuroscience research.* 2 : 305-315.

Lu, LX., Yon, JH., Carter, LB., Jevtovic-Todorovic, V. (2006) General anesthesia activates BDNF-dependent neuroapoptosis in the developing rat brain. *Apoptosis: an international journal on programmed cell death.* 11(9) : 1603-1615.

Magnusson, K.R. (2001) Influence of diet restriction on NMDA receptor subunits and learning during aging. *Neurobiology of Aging.* 22 : 613-627.

Markowska, A.L. (1999) Life-long diet restriction failed to retard cognitive aging in Fischer-344 rats. *Neurobiology of Aging.* 20 : 177-189.

Masoro, E.J. (2003) Subfield history : caloric restriction, slowing aging and extending life. Sage Ke. sageke.sciencemag.org/cgi/content/full/sageke;2003/8/re2.

Means, L.W., Higgins, J.L. et Fernandez, T.J. (1993) Mid-life onset of dietary restriction extends life and prolongs cognitive functioning. *Physiology & behavior*. 54 : 503-508.

Mhatre, M.C. et Ticku, M.K. (1998) Caloric restriction retards the aging associated changes in γ -aminobutyric acid^A receptor gene expression in rat cerebellum. *Brain research. Molecular brain research*. 54 : 270-275.

Mo, L., Ren, Q., Duchemin, AM., Neff, NH., Hadjiconstantinou, M. (2005) GM1 and ERK signaling in the aged brain. *Brain research*. 1054(2) : 125-134.

Naai, M., Lee, YC., Roseman, S. (1974) Rapid and sensitive determination of sphingosine bases and sphingolipids with fluorescamine. *Analytical biochemistry*. 58(2) : 571-577.

Nicolas, A., Lanzmann-Petithory, D. et Vellas, B. (1999) Caloric restriction and aging. *The Journal of nutrition*. 3(2) : 77-83.

Ohanian, J. et Ohanian, V. (2001) Sphingolipids in mammalian cell signalling. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 58 : 2053-2068.

Pitsikas, N., Carli, M., Fidecka, S. et Algeri, S. (1990) Effect of life-long hypocaloric diet on age-related changes in motor and cognitive behavior in a rat population. *Neurobiology of Aging*. 11 : 417-423.

Satoi, H., Tomimoto, H., Ohtani, R., Kitano, T., Kondo, T., Watanabe, M., Oka, N., Akiguchi, I., Furuya, S. Hirabayashi, Y. et Okazaki, T. (2005) Astroglial expression

of ceramide in Alzheimer's disease brains : A role during neuronal apoptosis. *Neuroscience*. 130 : 657-666.

Söderberg, M., Edlund, C., Alafuzoff, I., Kristensson, K. et Dallner, G. (1992) Lipid composition in different regions of the brain in Alzheimer's disease/senile dementia of Alzheimer's type. *Journal of neurochemistry*. 59 : 1646-1653.

Sohal, R.S. et Weindruch, R. (1996) Oxidative stress, caloric restriction and aging. *Science*. 273 : 59-63.

Stewart, J., Mitchell, J. et Kalant, N. (1989) The effects of life-long food restriction on spatial memory in young and aged fischer 344 rats measured in the eight-arm radial and the morris water mazes. *Neurobiology of Aging*. 10 : 669-675.

Stoffel, W. et Bosio, A. (1997) Myelin glycolipids and their functions. *Current opinion in neurobiology*. 7 : 654-661.

Svennerholm, L. (1994) Gangliosides; a new therapeutic agent against stroke and Alzheimer's disease. *Life sciences*. 55 (25-26) : 2125-2134.

Tacconi, M.T., LLigona, L., Salmona, M., Pitsikas, N. et Algeri, S. (1991) Aging and food restriction : Effect on lipids of cerebral cortex. *Neurobiology of Aging*. 12 : 55-59.

Tamir, H., Bebirian, R., Muller, F., Casper, D. (1980) Differences between intracellular platelet and brain proteins that bind serotonin. *Journal of neurochemistry*. 35(5) : 1033-1044.

Torras-Garcia, M., Costa-Miserachs, D., Coll-Andreu, M. et Potell-Cortés, I. (2005) Decreased anxiety levels related to aging. *Experimental brain research*. 164 : 177-184.

Venable, M.E., Webb-Froehlich, L.M., Sloan, E.F. et Thomley, J.E. (2006) Shift in sphingolipid metabolism leads to an accumulation of ceramide in senescence. *Mechanisms of ageing and development*. 127 : 473-480.

Wanagat, J., Allison, D.B. et Weindruch, R. (1999) Caloric intake and aging : Mechanisms in rodents and a study in nonhuman primates. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*. 52(Supp) : 35-40.

Weindruch, R. (2003) Caloric restriction : life span extension and retardation of brain aging. *Clinical neuroscience research*. 2 : 279-284.

Williams, MA., McCluer, RH. (1980) The use of Sep-Pak C18 cartridges during the isolation of gangliosides. *Journal of neurochemistry*. 35(1) : 266-269.

Yamagishi, K., Mishima, K., Ohgami, Y., Iwasaki, K., Jimbo, M., Masuda, H., Igarashi, W., Inokuchi, J. et Fujiwara, M. (2003) A synthetic ceramide analog ameliorates spatial cognition deficit and stimulates biosynthesis of brain gangliosides in rats with cerebral ischemia. *European journal of pharmacology*. 462 : 53-60.

Zappia, M., Crescibon, L., Bosco, D, Arabia, G., Nicoletti, G., Bagala, A., Bastone, L, Napoli, I.D., Caracciolo, M., Bonavita, S., Di Costanzo, A., Ganbardella, A. et Quattrone, A. (2002) Anti-GM1 ganglioside antibodies in Parkinson's disease. *Acta Neurologica Scandinavica*. 106(1) :54-57.

FIGURE LEGENDS

- Figure 1. Latencies in Morris Water Maze
- Figure 2. Covered distance in the Morris Water Maze : Day 1 and Day 2
- Figure 3. Covered distance in the Open field
- Figure 4. Elevated Plus Maze : Open time and First open arm
- Figure 5. Ceramide distribution in different brain regions
- Figure 6. Sphingomyelin distribution in the different brain regions
- Figure 7. Cerebroside distribution in the different brain regions
- Figure 8. Sulfatide distribution in the different brain regions
- Figure 9. Ganglioside distribution in the different brain regions
- Figure 10. Ganglioside distribution in the brain regions

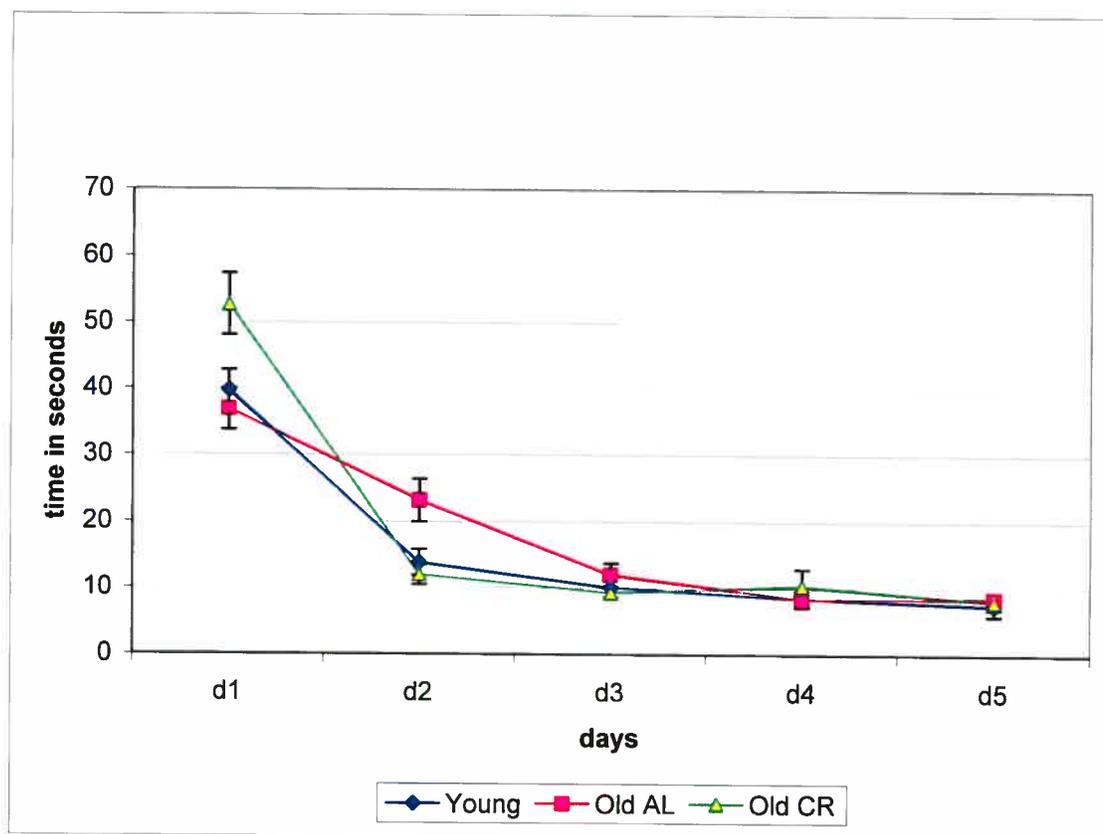


Figure 1 Latencies in Morris Water Maze

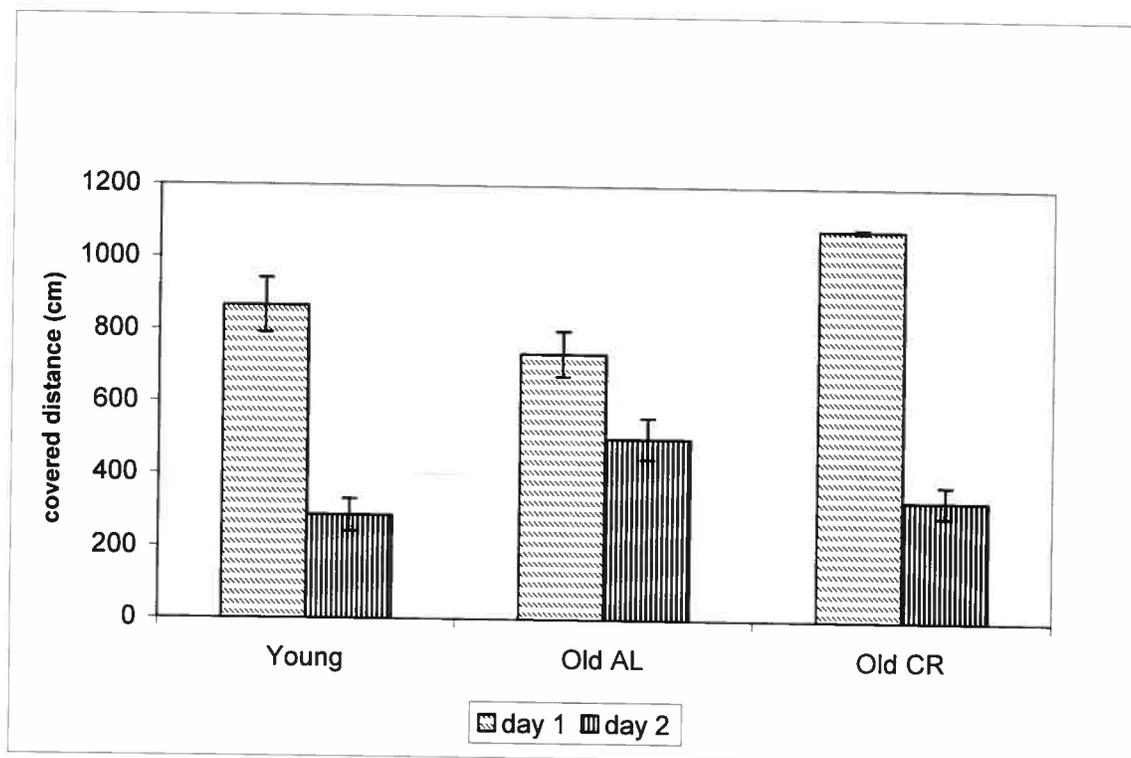


Figure 2 Covered distance in the Morris Water Maze: Day 1 and Day 2

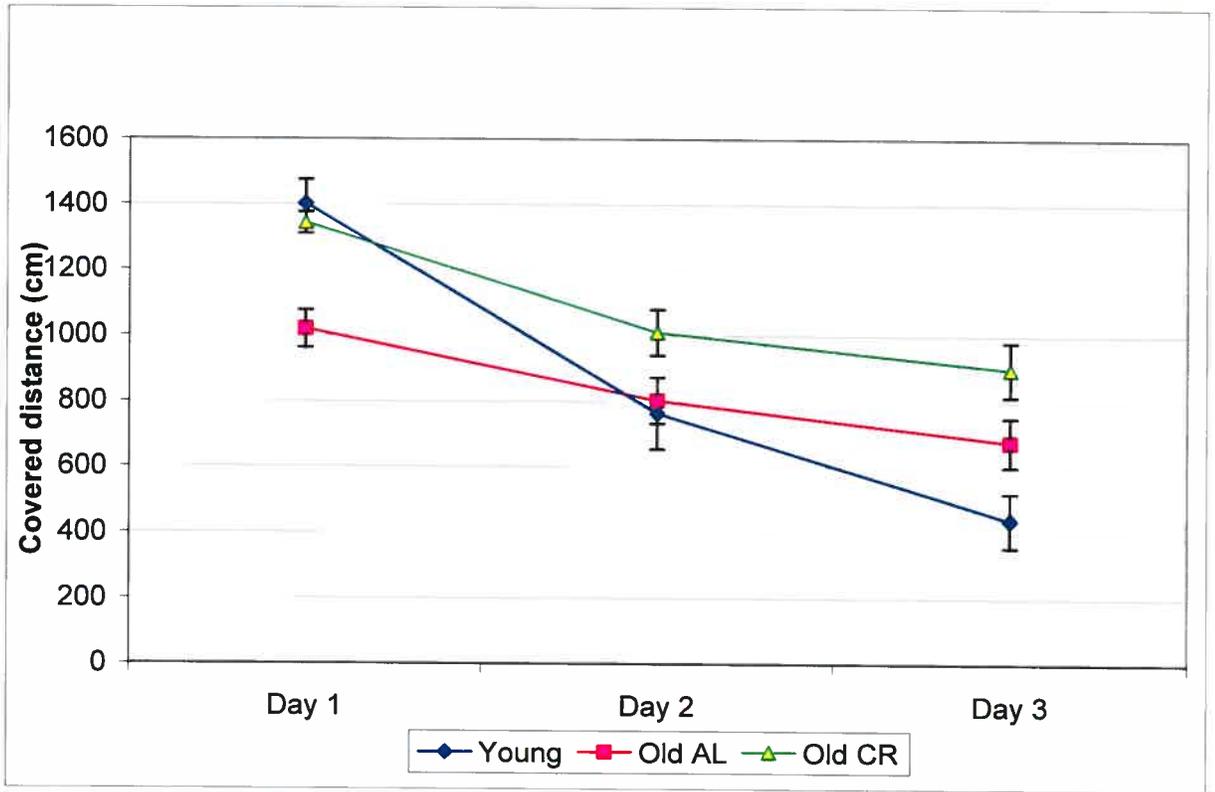


Figure 3 Covered distance in the Open field

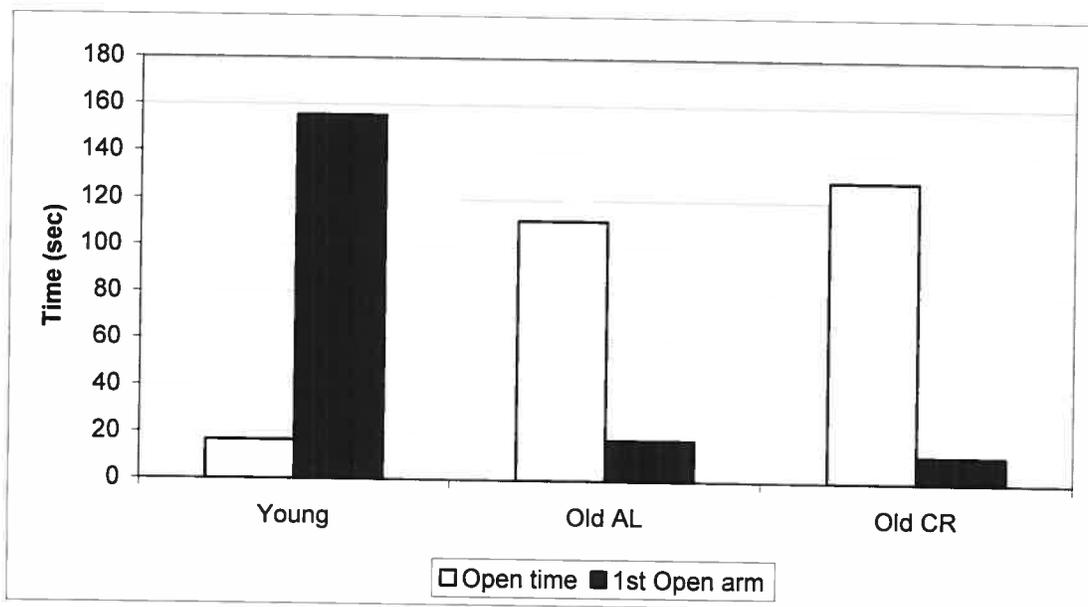


Figure 4 Elevated Plus Maze : Open time and First Open arm

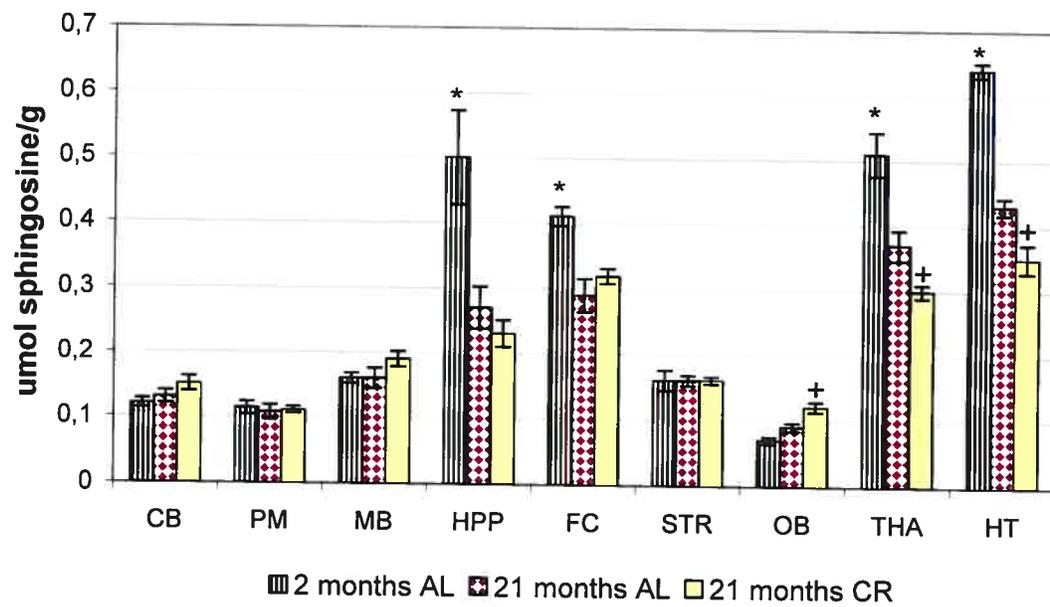


Figure 5 Ceramide distribution in different brain regions

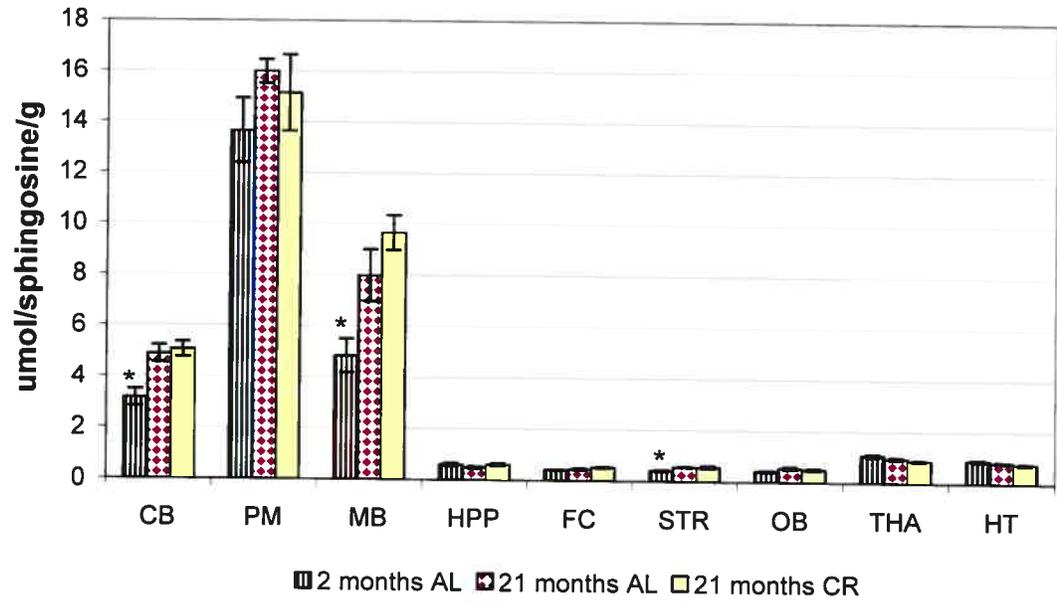


Figure 6 Spingomyelin distribution in different brain regions

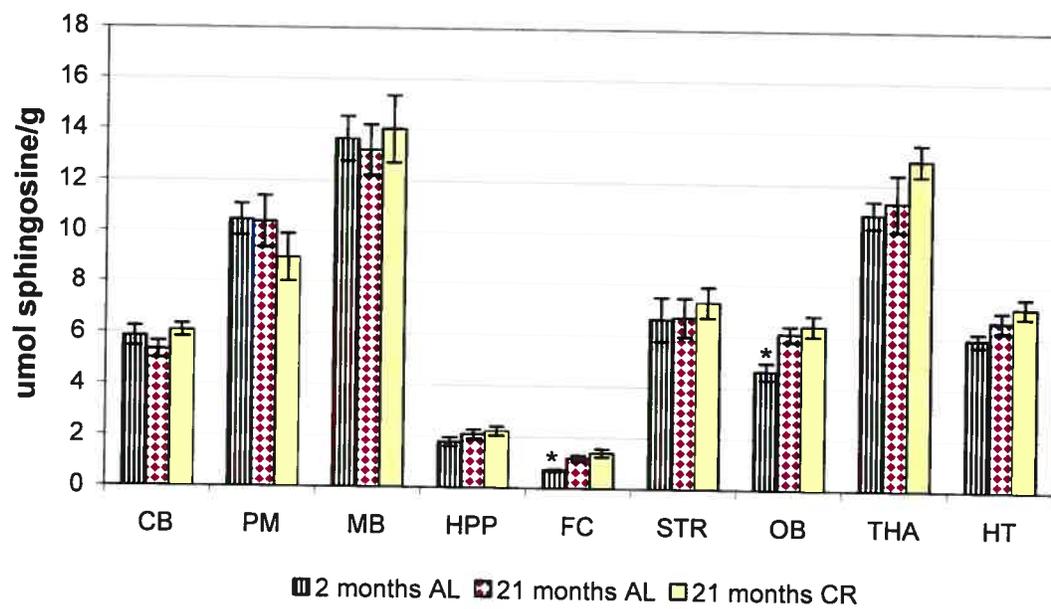


Figure 7 Cerebroside distribution in different brain regions

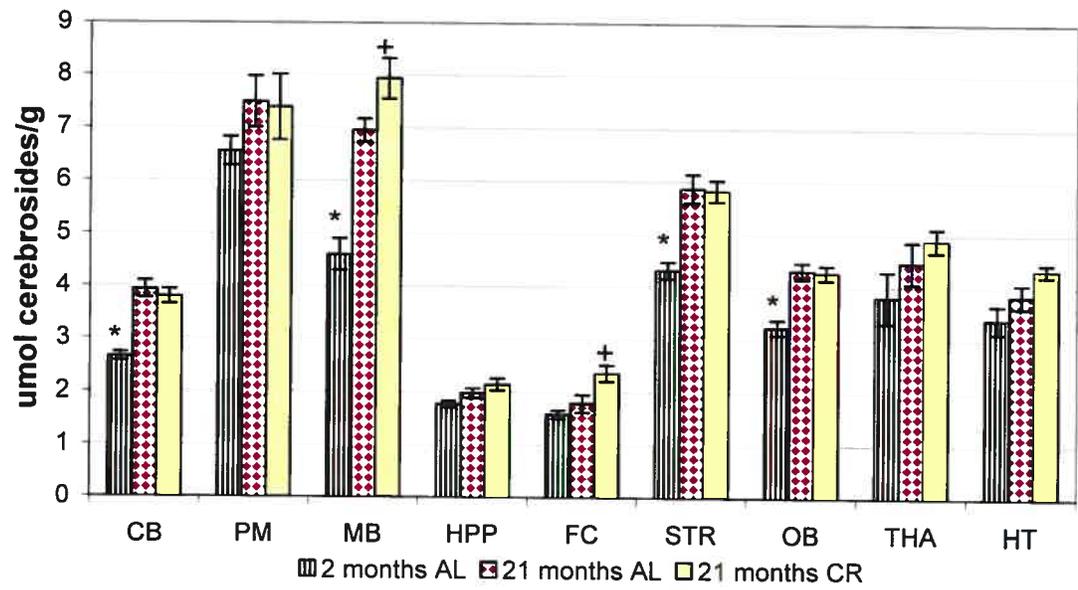


Figure 8 Sulfatide distribution in different brain regions

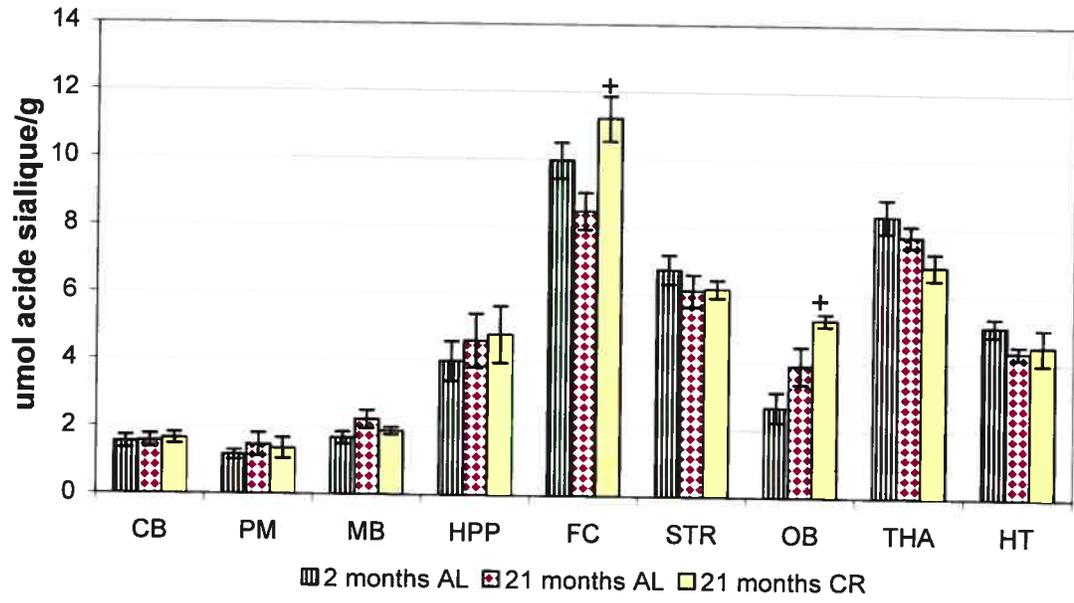


Figure 9 Ganglioside distribution in different brain regions

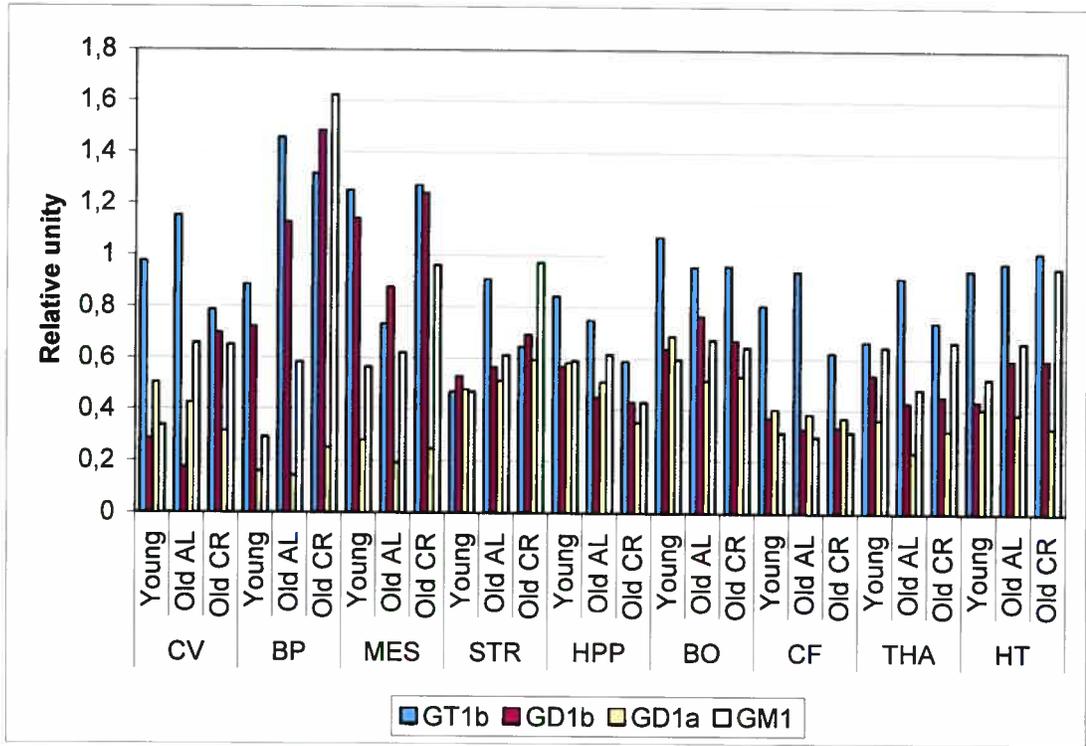


Figure 10 Ganglioside distribution in brain regions

III. DISCUSSION

Bien que limités, les travaux portant sur la restriction calorique en regard du système nerveux, suggèrent une amélioration des capacités d'apprentissage et de la motricité au cours du vieillissement (Dubey 1996, Bellush 1996, Markowska 1999). Parmi les structures pouvant moduler les effets bénéfiques de la restriction au niveau du cerveau se trouvent les sphingolipides, une famille de lipides présents en grande quantité dans la substance blanche, plus particulièrement dans la gaine de myéline. En marge de leur rôle dans la conduction nerveuse, les sphingolipides sont maintenant reconnus pour participer à une gamme d'activités cellulaires, dont la prolifération, la différenciation et la survie neuronale (Futerman & Hannun 2004). À la lumière de ceci, et parce qu'aucune étude n'a à ce jour exploré la possibilité d'un lien, nous avons entrepris de réaliser une étude dont le but était d'investiguer de manière concurrente, diverses mesures comportementales en association avec les sphingolipides cérébraux d'animaux soumis à une restriction calorique à l'âge adulte.

Au cours du vieillissement, les capacités d'apprentissage et la motricité diminuent (Stewart 1989, Bellush 1996). Dans la présente étude, un effet de l'âge a été observé en regard de l'apprentissage, des capacités exploratoires et de l'anxiété. L'apprentissage (test de la piscine de Morris) et les capacités exploratoires (test de l'*Open field*) diminuaient au cours de l'âge alors que l'anxiété était statistiquement plus élevée chez les jeunes rats que chez les rats âgés (test du labyrinthe en croix surélevée). Par ailleurs, la restriction calorique introduite à l'âge de 8 mois et maintenue jusqu'à 24 mois était associée à de meilleures capacités cognitives au cours du vieillissement, des résultats en accord avec la littérature (Idrobo 1987, Pitsikas 1992, Gould 1995, Dubey 1996, Magnusson 2001). En effet, les rats soumis à la RC présentent des latences inférieures à celles des rats du même âge nourris à volonté (Figure 1 ; ANOVA : groupe*jour; $8,245=6,288$, $P<0,001$). De même pour les distances parcourues qui étaient inférieures chez les rats du groupe RC (Figure 2; ANOVA; $2,49=6,106$; $p=0,004$). Enfin, le test effectué au jour 6 avec la plateforme

visible a permis de confirmer l'absence de problèmes visuels ou moteurs chez les animaux testés.

En outre, la restriction calorique a également été associée à une augmentation de la capacité exploratoire chez les rats du groupe RC comparativement à ceux nourris à volonté (figure 3; ANOVA groupe*jour (distance parcourue) $4,147=4,834$; $p<0,001$). Il se peut que ce dernier résultat soit lié au fait que les animaux soumis à la restriction calorique ont tendance à rechercher de la nourriture à tout moment, mais ceci reste à confirmer. À notre connaissance, une seule autre étude s'est penchée sur le lien entre la restriction calorique et les capacités exploratoires tel qu'évalué par le test de l'*Open field*; cette étude portait sur la souris (Ingram 1987). Dans cette étude, et contrairement à nos résultats, aucun effet de la diète n'a été observé.

La restriction calorique n'a pas eu d'effet sur l'anxiété chez les rats âgés, résultats en accord avec ceux de Torras-Garcia et al (2005). Toutefois, un effet statistiquement significatif de l'âge a été noté, les jeunes rats mettant plus de temps avant d'entrer dans un bras ouvert (150 secondes) que les rats âgés (moins de 15 secondes) (figure 4) (ANOVA; $2,35=11,566$; $p<0,001$). Ce haut niveau d'anxiété chez les jeunes rats a d'ailleurs été indirectement confirmé dans le test de l'*Open field* où les jeunes rats longeaient davantage les murs et passaient moins de temps au centre de la boîte (ANOVA; âge*diète; $2,147=63,739$; $p<0,001$; groupe*jour; $4,147=0,500$; $p=0,736$).

L'apprentissage, l'activité exploratoire et l'anxiété sont généralement associés à des régions spécifiques du cerveau (Mhatre 1998, Cutler 2001, Zappia 2002, Alessandro 2004, Sato 2005). Plus spécifiquement, l'hippocampe est particulièrement impliqué dans les processus relatifs à la mémoire spatiale ainsi qu'à la mémoire travail (Pitsikas 1992) alors que le thalamus et l'hypothalamus participent à l'apprentissage, au contrôle de l'anxiété et à l'activité exploratoire. Ces actions sont liées au fait que ces régions sont au centre des systèmes GABAergique et dopaminergique. Enfin, le cortex frontal est impliqué dans les mémoires de travail et sensorielle.

Dans la présente étude, les concentrations de sphingomyéline et de sulfatides avaient tendance à augmenter au cours du vieillissement alors que celles relatives aux gangliosides diminuaient; l'effet de l'âge en regard des céramides variait selon les régions étudiées. Dans la littérature, seulement deux études ont tenté d'établir un lien entre l'effet de la restriction calorique et la concentration de sphingolipides dans le cerveau. Dans ces études, la concentration totale de sphingolipides diminuait avec l'âge, un effet contrecarré par la restriction calorique (Tacconi 1990). Dans la présente étude, la restriction calorique a eu des effets particulièrement marqués en regard des céramides, des sulfatides et des gangliosides (voir figures 5, 8 et 9). Plus spécifiquement, la restriction calorique était associée à une diminution des concentrations de céramides dans le thalamus ($2,21=19,250$, $p<0,001$) et l'hypothalamus ($2,21=87,538$, $p<0,001$), les résultats dans l'hippocampe n'atteignant pas tout à fait le degré de significativité. Étant donné les rôles physiologiques de ces régions cérébrales, nos données pourraient expliquer les meilleures performances d'apprentissage et d'activité exploratoire des rats soumis à la restriction calorique.

De même, les changements induits par la RC en regard des céramides dans le thalamus et l'hypothalamus pourraient contribuer aux meilleures capacités d'apprentissage des rats du groupe RC. Il a été démontré que les céramides réduisent les concentrations de BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*) spécialement dans le thalamus (Lu 2006). Par ailleurs, le BDNF a une action de neuroprotection et stimule la neurogénèse, et sa diminution conduit à un déficit d'apprentissage chez la souris. De même, des taux élevés de BDNF ont été associés à une diminution de la mort cellulaire dans l'hippocampe (Lu 2006). Ainsi, sur la base des résultats de la présente étude, la restriction calorique pourrait améliorer les capacités d'apprentissage et l'activité exploratoire des animaux en limitant l'accumulation des céramides dans le thalamus, l'hypothalamus et l'hippocampe.

Dans la présente étude, la restriction calorique s'est accompagnée d'une augmentation des concentrations de sulfatides notamment dans le cortex frontal. Or il a été démontré que les sulfatides participent à l'efficacité du système

sérotoninergique, notamment en augmentant les sites de liaisons de la sérotonine (Tamir 1980). Les activités sérotoninergiques sont connues pour être impliquées dans les processus d'apprentissage et de mémoire, et ce, notamment au niveau du cortex frontal et de l'hippocampe (Burrell 2001, Garcia-Alloza 2006). À la lumière de ceci, les changements induits par la restriction calorique au niveau des sulfatides et ses gangliosides pourraient contribuer aux meilleures habiletés cognitives des animaux soumis à la RC.

Parmi la famille des gangliosides, les GM1 et GD1a sont davantage associés à la protection cellulaire et à la dendritogénèse alors que GM2, GM3 et GD3 sont liés à la mort cellulaire et à la formation anormale de dendrites (Buccoliero 2003). Dans la présente étude, la restriction calorique a été associée à une augmentation des gangliosides totaux dans le cortex frontal. De plus, nos résultats préliminaires indiquent que la diète était aussi associée à une augmentation des GM1 dans le thalamus et l'hypothalamus. Or ce ganglioside est impliqué dans l'activation des protéines kinases (pERK) dans le cortex frontal et dans l'hippocampe chez les rats Sprague-Dawley (Mo 2005); ces protéines kinases étant importantes dans la fonction neuronale. Chez les humains, GM1 et GD1a diminuent entre 20 et 100 ans alors qu'à l'inverse, GM3 et GD3 augmentent dans le cortex frontal (Svennerholm 1994). Ainsi, si l'augmentation de GM1 dans le thalamus et l'hypothalamus est éventuellement confirmée, ces derniers pourraient, via une activation du système pERK, contribuer aux activités neuronales requises lors du processus d'apprentissage, et pourraient en partie expliquer les meilleures performances des animaux soumis à la restriction calorique.

IV. CONCLUSION

À notre connaissance, cette étude est la première qui s'est penchée sur les liens potentiels entre les fonctions sensori-motrices et cognitives et les sphingolipides chez des animaux ayant été soumis à une restriction calorique. Sur la base de nos résultats, certains changements au niveau des sphingolipides pourraient contribuer au maintien des capacités cognitives des animaux soumis à la restriction calorique au cours du vieillissement.

Parmi les sphingolipides ciblés, les céramides, les sulfatides et certains gangliosides, notamment le GM1 pourraient s'avérer plus particulièrement importants. D'autres études sont nécessaires afin de confirmer ces résultats et de préciser le rôle spécifique de ces sphingolipides.

VI. RÉFÉRENCES

Alessandro, A.V., Bugrova, A.E., Dudnik, L.B. (2004) Connection of lipid peroxide oxidation with the sphingomyelin pathway in the development of Alzheimer's disease. *Biochemical Society transactions*. 42(1) : 144-146.

Algeri, S., Biagini, L., Manfredi, A., Pitsikas, N. (1991) Age-related ability of rats kept on a life-long hypocaloric diet in a spatial memory test. Longitudinal observations. *Neurobiology of Aging*. 12 : 277-282.

Ariga, T., Jarvis, W.D., Yu, R.K. (1998) Role of sphingolipid-mediated cell death in neurodegenerative diseases. *Journal of lipid research*. 39 : 1-16.

Bear M.F., Connors, B.W., Paradiso M.A. *Neurosciences; à la découverte du cerveau*. Éditions Pradel, Paris, 1997.

Bektas, M., Spiegel, S. (2004) Glycosphingolipids and cell death. *Glycoconjugate journal*. 20 : 39-47.

Bellush, L.L., Wright, A.M., Walker J.P., Kopchick, J., Colvin, R.A. (1996) Caloric restriction and spatial learning in old mice. *Physiology & behavior*. 60(2) : 541-547.

Birké, S., Zeng, G., Gao, L., Yu, R.K., Aubry, J. (2003) Role of tumor-associated gangliosides in cancer progression. *Biochimie*. 85 : 455-463.

Bodennec, J., Koul, O., Aguado, I., Brichon, G., Zwingelstein, G., Portoukalian, J. (2000) A procedure for fractionation of sphingolipid classes by solid-phase extraction on aminopropyl cartridges. *Journal of lipid research*. 41(9) : 1524-1531.

Bondolfi, L., Ermini, F., Long, J.M., Ingram, D.K., Jucker, M. (2004) Impact of age and caloric restriction on neurogenesis in the dentate gyrus of C57BL/6 mice. *Neurobiology of Aging*. 25 :333-340.

Bosio, A., Binczek, E., Haupt, W.F., Stoffel, W. (1998) Composition and biophysical properties of myelin lipids define the neurological defects in galactocerebroside and sulfatide deficient mice. *Journal of neurochemistry*. 70 : 308-315.

Bouillon, M., Mourad, W.M. (2003) Complexe majeur d'histocompatibilité de classe II : diversité fonctionnelle. *Medecine sciences : M/S*. 19 : 988-993.

Buccoliero, R., Futerman, A.H. (2003) The roles of ceramide and complex sphingolipids in neuronal cell function. *Pharmacological research : the official journal of the Italian Pharmacological Society*. 47 : 409-419.

Buresova, O., Bolhuis, J.J., Bures, J. (1986) Differential effects of cholinergic blockade on performance of rats in the water tank navigation task and in a radial water maze. *Behavioral neuroscience*. 100(4) : 476-482.

Burrell, B.D., Sahley, CL. (2001) Learning in simple systems. *Current opinion in neurobiology*. 11(6) : 757-764.

Carr, K.D., Kim, G.Y., Cabeza de Vaca, S. (2001) Rewarding and locomotor-activating effects of direct dopamine receptor agonists are augmented by chronic food restriction in rats. *Psychopharmacology*. 154 : 420-428.

Cefalu, W.T., Bell-Farrow, A.D., Wang, Z.Q., Sonntag, W.E., Fu, M.X., Baynes, J.W., Thorpe, S.R. (1995) Caloric restriction decrease age-dependent accumulation of the glycoxidation products, N epsilon-(carboxymethyl)lysine and pentosidine, in rat skin collagen. *The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences*. 50(6) : B337-B341.

Cha, M.C., Jones P.J.H. (2000) Energy restriction dilutes the changes related to dietary fat type in membrane phospholipid fatty acid composition in rats. *Metabolism : clinical and experimental*. 49(8) : 977-983.

Chipalkatti, S., De, A.K., Aiyar, A.S. (1983) Effect of diet restriction on some biochemical parameters related to aging in mice. *The Journal of nutrition*. 113 : 944-950.

Cinque, B., Di Marzio, L., Centi, C., Di Rosso, C., Riccardi, C., Cifone M.G. (2003) Sphingolipids and the immune system. *Pharmacological research : the official journal of the Italian Pharmacological Society*. 47 : 421-437.

Coetzee, T., Fujita, N., Dupree, J., Shi, R., Blight, A., Suzuki, K., Suzuki, K., Popko, B. (1996) Myelination in the absence of galactocerebroside and sulfatide : Normal Structure with abnormal function and regional instability. *Cell*. 86 : 209-219.

Cutler, R.G., Mattson, M.P. (2001) Sphingomyelin and ceramide as regulators of development and lifespan. *Mechanisms of ageing and development*. 122 : 895-908.

Cutler, R.G., Kelly, J., Storie, K., Pedersen, W.A., Tammara, A., Hatanpaa, K., Troncoso, J.C., Mattson, M.P. (2004) Involvement of oxidative stress-induced abnormalities in ceramide and cholesterol metabolism in brain aging and Alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 101(7) : 2070-2075.

Cuvillier, O. (2002) Sphingosine in apoptosis signaling. *Biochimica et biophysica acta*. 1585 : 153-162.

Davis, L.J., Hakim, G., Masiello, P., Novelli, M., Bergamini, E., Licastro, F. (1994) Plasma protein's glycation is decreased in Sprague-Dawley rats under caloric restriction. *Archives of gerontology and geriatrics*. 19 : 295-301.

Denny, C.A., Kasperzyk, J.L., Gorham, K.N., Bronson, R.T., Seyfried, T.N. (2006) Influence of caloric restriction on motor behavior, longevity and brain lipid composition in Sandhoff disease mice. *Journal of neuroscience research*. 83 : 1028-1038.

Dubey, A., Forster, M.J., Lal, H., Sohal, R.S. (1996) Effect of age and caloric intake on protein oxidation in different brain regions and on behavioral functions of the mouse. *Archives of biochemistry and biophysics*. 333(1) : 189-197.

Duffy, P.H., Leakey, J.E.A., Pipkin, J.L., Turturro, A., Hart, R.W. (1997) The physiologic, neurologic, and behavioral effects of caloric restriction related to aging, disease, and environmental factors. *Environmental research*. 73 : 242-248.

Duffy, P.H., Seng, J.E., Lewis, S.M., Mayhugh, M.A., Aidoo, A., Hattan, D.G., Casciano, D.A., Feuers, R.J. (2001) The effects of different levels of dietary restriction on aging and survival in the Sprague-Dawley rat : Implications for chronic studies. *Aging clinical and experimental research*. 13 : 263-272.

Dupree, J.L., Coetzee, T., Suzuki, K., Popko, B. (1998) Myelin abnormalities in mice deficient in galactocerebroside and sulfatide. *Journal of Neurocytology*. 27 : 649-659.

Eckles-Smith, K., Clayton, D., Bickford, P., Browning, M.D. (2000) Caloric restriction prevents age-related deficits in LTP and in NMDA receptor expression. *Brain research. Molecular brain research*. 78 : 154-162.

- Effros, R.B., Walford, R.L., Weindruch, R., Mitcheltree, C. (1991) Influences of dietary restriction on immunity to influenza in aged mice. *Journal of gerontology*. 46(4) : B142-147.
- Eiam-Ong, S., Sabatini, S. (1999) Food restriction beneficially affects renal transport and cortical membrane lipid content in rats. *The Journal of nutrition*. 129 : 1682-1687.
- Engelmann, M., Ebner, K., Landgraf, R., Wotjak, C.T. (2006) Effects of Morris water maze testing on the neuroendocrine stress response and intrahypothalamic release of vasopressin and oxytocin in the rat. *Hormones and behavior*. 50(3) : 496-501.
- Ezoe, T., Vanier, M.T., Oya, Y., Popko, B., Tohyama, J., Matsuda, J., Suzuki, K., Suzuki, K. (2000) Biochemistry and neuropathology of mice doubly deficient in synthesis and degradation of galactosylceramid. *Journal of neuroscience research*. 59 : 170-178.
- Folch, J., Lees, M., Sloane Stanley, GH. (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *The Journal of biological chemistry*. 226(1) : 497-509.
- Forster, M.J., Lal, H. (1999) Estimating age-related changes in psychomotor function : influence of practice and of level of caloric intake in different genotypes. *Neurobiology of Aging*. 20 : 167-176.
- Fredman, P., Hedberg, K., Brezicka, T. (2003) Gangliosides as therapeutic targets for cancer. *BioDrugs : clinical immunotherapeutics, biopharmaceuticals and gene therapy*. 17(3) : 155-167.

- Futerman A.H., Hannun Y.A. (2004) The complex life of simple sphingolipids. *EMBO reports*. 5(8) : 777-782.
- Garcia-Alloza, M., Zaldua, N., Diez-Ariza, M., Marcos, B., Lasheras, B., Javier Gil-Bea, F., Ramirez, M.J. (2006) Effect of selective cholinergic denervation on the serotonergic system: implications for learning and memory. *Journal of neuropathology and experimental neurology*. 65(11) : 1074-1081.
- Giusto, N.M., Roque, M.E., Ilincheta de Boschero, M.G. (1992) Effects of aging on the content, composition and synthesis of sphingomyelin in the central nervous system. *Lipids*. 27(11) : 835-839.
- Goettl, V.M., Wemlinger, T.A., Colvin, AmE., Neff, N.H., Hadjiconstantinou, M. (2001) Motoric behavior in aged rats treated with GM1. *Brain research*. 906 : 92-100.
- Goettl, V.M., Wemlinger, T.A., Duchemin, A.M., Neff, N.H., Hadjiconstantinou, M. (1999) Gm1 Ganglioside restores dopaminergic neurochemical and morphological markers in aged rats. *Neuroscience*. 92(3) : 991-1000.
- Gomi, F., Matsuo, M. (1998) Effects of aging and food restriction on the antioxidant enzyme activity of rat livers. *The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences*. 53(3) : B161-167.
- Goodman, W., Mattson, M.P. (1996) Ceramide protects hippocampal neurons against excitotoxic and oxidative insults, and amyloid B-peptide toxicity. *Journal of neurochemistry*. 66 : 869-872.
- Gottfries, C., Karlsson, I., Svennerholm, L. (1996) Membrane components separate early-onset Alzheimer's disease from senile dementia of the Alzheimer type. *International psychogeriatrics / IPA*. 8(3) : 365-372.

- Gould, T.J., Bowerkamp, K.E., Larson, G., Zahniser, N.R., Bickford, P.C. (1995) Effects of dietary restriction on motor learning and cerebellar noradrenergic dysfunction in aged F344 rats. *Brain research.* 684 : 150-158.
- Granner, D.K., Moyes, A., Murroy, R.K., Rodwell, V.W., Précis de biochimie de Harper. (1995) Éditions ESKA, 8^e édition, 940 pages.
- Hakomory, S. (2005) Organization and function of glycosphingolipids in membrane. *Proceedings of the Japan Academy.* 81(SerB) : 189-203.
- Han, X., Cheng, H., Fryer, J.D., Fagan, A.M., Holtzman, D.M. (2003) Novel role for apolipoprotein E in the central nervous system. *The Journal of biological chemistry.* 278(10) : 8063-8051.
- Han, X., Fagan, A.M., Cheng, H., Morris, J.C., Xiong, C., Holtzman, D.M. (2003) Cerebrospinal fluid sulfatide is decreased in subjects with incipient dementia. *Annals of neurology.* 54 : 115-119.
- Han, X., Holtzman, D.M., McKeel Jr., D.W., Kelley, J., Morris, J.C. (2002) Substantial sulfatide deficiency and ceramide elevation in very early Alzheimer's disease : potential role in disease pathogenesis. *Journal of neurochemistry.* 82 : 809-818.
- Harris, S.B., Gunion, M.W., Rosenthal, M.J. Walford, R.L. (1994) Serum glucose, glucose tolerance, corticosterone and free fatty acids during aging in energy restricted mice. *Mechanisms of ageing and development.* 73 : 209-221.
- Herr, I., Martin-Villalba, A., Kurz, E., Roncaioli, P., Schenkel, J., Cifone, MG., Debatin, K.M. (1999) FK506 prevents stroke-induced generation of ceramide and apoptosis signaling. *Brain research.* 826(2) : 210-219.

- Idrobo, F., Nandy, K., Mostofsky, D.I., Blatt, L., Nandy, L. (1987) Dietary restriction : effects on radial maze learning and lipofuscin pigment deposition in the hippocampus and frontal cortex. *Archives of gerontology and geriatrics.* 6 : 355-362.
- Ikeno, Y., Bertrand, H.A., Herlihy, J.T. (1997) Effets of dietary restriction and exercise on the age-related pathology of the rat. *Age.* 20 : 107-118.
- Ingram, D.K., Weindruch, R., Spangler, E.L., Freeman, J.R., Walford, R.L. (1987) Dietary restriction benefits learning and motor performance of aged mice. *Journal of gerontology.* 42(1) : 78-81.
- Irizarry, M.C. (2003) A turn of the sulfatide in Alzheimer's disease. *Annals of neurology.* 54(1) : 7-8.
- Jolly, C.A. (2004) Dietary restriction and immune function. *The Journal of nutrition.* 134 : 1853-1856.
- Joseph, J.A., Denisova, N.A., Bielinski, D., Fisher, D.R., Shukitt-Hale, B. (2000) Oxidative stress protection and vulnerability in aging : putative nutritional implications for intervention. *Mechanisms of ageing and development.* 116 : 141-153.
- Jourdian, G.W., Dean, L., Roseman, S. (1971) The sialic acids. XI. A periodate-resorcinol method for the quantitative estimation of free sialic acids and their glycosides. *The Journal of biological chemistry.* 246(2) : 430-435.
- Kanda, K. (2002) Effets of food restriction on motoneuronal loss with advancing age in the rat. *Microscopy research and technique.* 59 : 301-305.

- Kean, E.L. (1968) Rapid, sensitive spectrophotometric method for quantitative determination of sulfatides. *Journal of lipid research*. 9(3) : 319-327.
- Kozawa, O., Yamamoto, T., Tanabe, K., Akamatsu, S., Dohi, S., Uematsu, T. (2000) Enhancements by sphingosine 1-phosphate in vasopressin-induced phosphoinositide hydrolysis in aortic smooth-muscle cells: involvement of p38 MAP kinase. *Journal of cellular biochemistry*. 80(1) : 46-52.
- Kracun, I. et Kalanj, S., Talan-Hranilovic, J., Cosovic, C. (1992) Cortical distribution of gangliosides in Alzheimer's disease. *Neurochemistry international*. 20(3) : 433-438.
- Levi, B. et Werman, M.J. (1998) Long-term fructose consumption accelerates glycation and several age-related variables in male rats. *The Journal of nutrition*. 128 : 1442-1449.
- Levin, P., Janda, J.K., Joseph, J.A., Ingram, D.K., Roth, G.S. (1981) Dietary restriction retards the age-associated loss of rat striatal dopaminergic receptors. *Science*. 214 : 561-562.
- Lightle, S.A., Oakley, J.I., Nikolova-Karakashian, M.N. (2000) Activation of sphingolipid turnover and chronic generation of ceramide and sphingosine in liver during aging. *Mechanisms of ageing and development*. 120 : 112-125.
- Lin, M.T. et Beal, M.F. (2003) The oxidative damage theory of aging. *Clinical neuroscience research*. 2 : 305-315.
- Lu, L.X., Yon, J.H., Carter, L.B., Jevtovic-Todorovic, V. (2006) General anesthesia activates BDNF-dependent neuroapoptosis in the developing rat brain. *Apoptosis: an international journal on programmed cell death*. 11(9) : 1603-1615.

- Macchia, M., Bertini, S., Fogli, S., Giovannetti, E., Minutolo, F., Rapposelli, S., Danesi, R. (2003) Ceramide analogues in apoptosis : a new strategy for anticancer drug development. *Farmaco (Societa chimica italiana : 1989)*. 58 : 205-211.
- Maeda, H., Gleiser, C.A., Masoro, E.J., Murata, I., McMahan, C.A., Yu, B.P. (1985) Nutritional influences on aging of Fischer 344 rats : II. Pathology. *Journal of gerontology*. 40(6) : 671-688.
- Magnusson, K.R. (2001) Influence of diet restriction on NMDA receptor subunits and learning during aging. *Neurobiology of Aging*. 22 : 613-627.
- Marieb E.N. *Anatomie et physiologie humaine*. Editions ERPI. Canada, 1992.
- Markowska, A.L. (1999) Life-long diet restriction failed to retard cognitive aging in Fischer-344 rats. *Neurobiology of Aging*. 20 : 177-189.
- Markowska, A.L., Savonenko, A. (2002) Retardation of cognitive aging by life-long diet restriction : implications for genetic variance. *Neurobiology of Aging*. 23 : 75-86.
- Masoro, E.J. (2000) Caloric restriction and aging : an update. *Experimental gerontology*. 35 : 299-305.
- Masoro, E.J. (2003) Subfield history : caloric restriction, slowing aging and extending life. Sage Ke. sageke.sciencemag.org/cgi/content/full/sageke;2003/8/re2.
- Masoro, E.J. (2005) Overview of caloric restriction and ageing. *Mechanisms of ageing and development*. 126 : 913-922.

- Masoro, E.J., McCarter, R.J.M., Katz, M.S., McMahan, A. (1992) Dietary restriction alters characteristics of glucose fuel use. *Journal of gerontology*. 47(6) : B202-B208.
- Mattson, M.P. (2005) Energy intake, meal frequency and health : a neurobiological perspective. *Annual review of nutrition*. 25 : 237-60.
- Mattson, M.P., Cutler, R.G., Jo D. (2005) Alzheimer peptides perturb lipid-regulation enzymes. *Nature cell biology*. 7(11) : 1045-1047.
- McCarter, R.J.M., Shimokawa, I., Ikeno, Y., Higami, Y., Hubbard, G.B., Yu, B.P., McMahan, C.A. (1997) Physical activity as a factor in the action of dietary restriction on aging : Effects in Fischer 344 rats. *Aging clinical and experimental research*. 9 : 73-79.
- McCay, C.M., Crowell, M.F., Maynard, L.A. (1935) The effect of retarded growth upon the length of life and upon the ultimate size. *The Journal of nutrition*. 10 : 63-79.
- Means, L.W., Higgins, J.L., Fernandez, T.J. (1993) Mid-life onset of dietary restriction extends life and prolongs cognitive functioning. *Physiology & behavior*. 54 : 503-508.
- Mhatre, M.C., Ticku, M.K. (1998) Caloric restriction retards the aging associated changes in γ -aminobutyric acid^A receptor gene expression in rat cerebellum. *Brain research. Molecular brain research*. 54 : 270-275.
- Mo, L., Ren, Q., Duchemin, AM., Neff, NH., Hadjiconstantinou, M. (2005) GM1 and ERK signaling in the aged brain. *Brain research*. 1054(2) : 125-134.

Monti, B., Virgili, M., Contestabile, A. (2004) Alterations of markers related to synaptic function in aging rat brain, in normal conditions or under conditions of long-term dietary manipulation. *Neurochemistry international*. 44 : 579-584.

Morris, R.G., Garrud, P., Rawlins, J.N., O'Keefe, J. (1982) Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature*. 24(5868) : 681-683.

Naoi, M., Lee, Y.C., Roseman, S. (1974) Rapid and sensitive determination of sphingosine bases and sphingolipids with fluorescamine. *Analytical biochemistry*. 58(2) : 571-577.

Nicolas, A., Lanzmann-Petithory, D., Vellas, B. (1999) Caloric restriction and aging. *The Journal of nutrition*. 3(2) : 77-83.

Novelli, M., Masiello, P., Bonmbara, M., Bergamini, E. (1998) Protein glycation in the aging male Sprague-Dawley rat : Effects of antiaging diet restrictions. *Journal of gerontology*. 53A(2) : B94-B101.

Ohanian, J. Ohanian, V. (2001) Sphingolipids in mammalian cell signalling. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 58 : 2053-2068.

Pitsikas, N., Algeri, S. (1992) Deterioration of spatial and nonspatial reference and working memory in aged rats : Protective effect of life-long calorie restriction. *Neurobiology of Aging*. 13 : 369-373.

Pitsikas, N., Carli, M., Fidecka, S., Algeri, S. (1990) Effect of life-long hypocaloric diet on age-related changes in motor and cognitive behavior in a rat population. *Neurobiology of Aging*. 11 : 417-423.

- Pitto, M., Raimondo, F., Zoia, C., Brighina, L., Ferrarese, C., Masserini, M. (2005) Enhanced GM1 ganglioside catabolism in cultured fibroblasts from Alzheimer patients. *Neurobiology of Aging*. 26 : 833-838.
- Satoi, H., Tomimoto, H., Ohtani, R., Kitano, T., Kondo, T., Watanabe, M., Oka, N., Akiguchi, I., Furuya, S. Hirabayashi, Y., Okazaki, T. (2005) Astroglial expression of ceramide in Alzheimer's disease brains : A role during neuronal apoptosis. *Neuroscience*. 130 : 657-666.
- Shelke, R.R.J., Leeuwenburgh, C. (January 2, 2003) Lifelong caloric restriction increases expression of apoptosis repressor with a caspase recruitment domain (ARC) in the brain. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 10.1096/fj.02-0803fje.
- Söderberg, M., Edlund, C., Alafuzoff, I., Kristensson, K., Dallner, G. (1992) Lipid composition in different regions of the brain in Alzheimer's disease/senile dementia of Alzheimer's type. *Journal of neurochemistry*. 59 : 1646-1653.
- Sohal, R.S., Weindruch, R. (1996) Oxidative stress, caloric restriction and aging. *Science*. 273 : 59-63.
- Soreghan, B., Thomas, S., Yang, A.J. (2003) Aberrant sphingomyelin/ceramide metabolic-induced neuronal endosomal/lysosomal dysfunction : potential pathological consequences in age-related neurodegeneration. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 55 : 1515-1524.
- Stewart, J., Mitchell, J., Kalant, N. (1989) The effects of life-long food restriction on spatial memory in young and aged fischer 344 rats measured in the eight-arm radial and the morris water mazes. *Neurobiology of Aging*. 10 : 669-675.

- Stoffel, W., Bosio, A. (1997) Myelin glycolipids and their functions. *Current opinion in neurobiology*. 7 : 654-661.
- Svennerholm, L. (1994) Gangliosides; a new therapeutic agent against stroke and Alzheimer's disease. *Life sciences*. 55 (25-26) : 2125-2134.
- Tacconi, M.T., Lligona, L., Salmona, M., Pitsikas, N., Algeri, S. (1991) Aging and food restriction : Effect on lipids of cerebral cortex. *Neurobiology of Aging*. 12 : 55-59.
- Tamir, H., Bebirian, R., Muller, F., Casper, D. (1980) Differences between intracellular platelet and brain proteins that bind serotonin. *Journal of neurochemistry*. 35(5) : 1033-1044.
- Tayebi, N., Stubblefield, B.K., Park, J.K., Orvisky, E., Walker, J.M., La Marca, M.E., Sidransky, E. (2003) Reciprocal and non reciprocal recombination at the glucocerebrosidase gene region : implications for complexity in Gaucher disease. *American journal of human genetics*. 72(3) : 519-534.
- Thompson, H.J., Zhu, A., Jiang, W. (2003) Dietary energy restriction in breast cancer prevention. *Journal of mammary gland biology and neoplasia*. 8(1) : 133-142.
- Torras-Garcia, M., Costa-Miserachs, D., Coll-Andreu, M., Potell-Cortés, I. (2005) Decreased anxiety levels related to aging. *Experimental brain research*. 164 : 177-184.
- Undie, A.S., Frieman, E. (1993) Diet restriction prevents aging-induced deficits in brain phosphoinositide metabolism. *Journal of gerontology*. 48 : B62-B67.

- Vander, A.J., Sherman, J.H., Luciano, D.S., Brière, R. *Physiologie humaine* 3^e édition, Éditions Chenelière/Mc Graw-Hill, Canada 1995.
- Venable, M.E., Webb-Froehlich, L.M., Sloan, E.F., Thomley, J.E. (2006) Shift in sphingolipid metabolism leads to an accumulation of ceramide in senescence. *Mechanisms of ageing and development*. 127 : 473-480.
- Wanagat, J., Allison, D.B., Weindruch, R. (1999) Caloric intake and aging : Mechanisms in rodents and a study in nonhuman primates. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*. 52(Supp) : 35-40.
- Weindruch, R. (1989) Dietary restriction, tumors and aging in rodents. *Journal of gerontology*. 44(6) : 67-71.
- Weindruch, R. (1996) The retardation of aging by caloric restriction : Studies in rodents and primates. *Toxicologic pathology*. 24(6) : 742-745.
- Weindruch, R. (2003) Caloric restriction : life span extension and retardation of brain aging. *Clinical neuroscience research*. 2 : 279-284.
- Williams, M.A., McCluer, R.H. (1980) The use of Sep-Pak C18 cartridges during the isolation of gangliosides. *Journal of neurochemistry*. 35(1) : 266-269.
- Yamagishi, K., Mishima, K., Ohgami, Y., Iwasaki, K., Jimbo, M., Masuda, H., Igarashi, W., Inokuchi, J., Fujiwara, M. (2003) A synthetic ceramide analog ameliorates spatial cognition deficit and stimulates biosynthesis of brain gangliosides in rats with cerebral ischemia. *European journal of pharmacology*. 462 : 53-60.
- Yanagisawa, K., Matsuzaki, K. (2002) Cholesterol-dependent aggregation of amyloid B-protein. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 977 : 384-386.

Zappia, M., Crescibien, L., Bosco, D, Arabia, G., Nicoletti, G., Bagala, A., Bastone, L, Napoli, I.D., Caracciolo, M., Bonavita, S., Di Costanzo, A., Ganbardella, A., Quattrone, A. (2002) Anti-GM1 ganglioside antibodies in Parkinson's disease. *Acta Neurologica Scandinavica*. 106(1) :54-57.