



18 novembre 2014

La longévité cérébrale et ses pathologies

Pour ce dernier cours de l'année, je vais reprendre un peu sur les télomères, la fin du cours d'il y a deux semaines, puis remettre tout ce qui a été discuté en mémoire afin d'ouvrir un peu plus largement sur l'intégration des différents mécanismes du vieillissement et vous préparer à la suite du cours, en 2014. Je commence par vous rappeler le schéma de renouvellement des neurones des grains et périglomérulaires du bulbe olfactif (**DIA VI.2**). Je vous rappelle aussi, rapidement, que le vieillissement s'accompagne d'une baisse de renouvellement de ces cellules accompagnée d'une baisse parallèle de l'activité télomérase (**DIA VI.3**).

Nous avons commencé à discuter la semaine dernière le lien possible entre raccourcissement des télomères et modification morphologique des neurones (et pas seulement leur sénescence et apoptose). C'est important car cela suggère une fonction autre – possiblement physiologique – des télomères. Comme je l'avais souligné, il se trouve que les souris de laboratoire ont des télomères beaucoup plus longs que les humains et que les souris sauvages (40 à 60 kbp versus 5 à 10 kbp). C'est la raison pour laquelle, comme vous l'avez constaté la semaine dernière, les analyses sont faites à la 3^e, 4^e ou 5^e génération (G3, G4 ou G5) de souris dépourvues d'activité télomérase (mutation de *Terc*, l'ARN substrat de la télomérase).

Les auteurs (Ferron *et al.*, *J. Neurosci.* 29: 14394-14407, 2009) rappellent que dès G3 on constate une baisse du nombre de cellules GFAP (les cellules souches), de neuroblastes et aussi de neurones marqués par le β III-tubulin, plus – nous l'avons aussi constaté antérieurement – une diminution du volume du bulbe olfactif (**DIA VI.4**). Cette même **DIA VI.4** rappelle les différents types cellulaires (NeuN et β III-tubulin marquent les mêmes cellules) et les données quantitatives en A montrent la diminution du nombre de cellules marquées par le BrdU, donc nouvellement générées, dans le bulbe olfactif.

Malgré cette baisse globale de neurogenèse *in vivo*, la prolifération des neuroblastes telle qu'on peut l'évaluer par le nombre de neurones exprimant la β III-tubulin et marqué par le BrdU (injecté seulement 12 heures avant l'analyse) est identique chez les WT et les mutant à G3 (14,6 % versus 11,9 % avec des erreurs standard de 1,1 et 2,1 %, c'est dans le texte pas sur la DIA). Cela suggérerait une prolifération non modifiée des neuroblastes, mais peut-être une moindre survie ultérieure de ces cellules, comme le suggère l'effet de la mutation de p53 sur le nombre de cellules *in vivo* (**DIA VI.4** panels A et B) ou la taille des neurosphères *in vitro* (**DIA VI.4**, panel F).

En effet, p53 est un anti-oncogène, c'est-à-dire une protéine qui induit sénescence et apoptose (en particulier – mais pas seulement – dans les cellules qui risquent de devenir tumorales d'où le terme d'anti-oncogène). Il reste que la différence la plus forte observée par les auteurs est une différenciation incomplète avec une diminution de la longueur du dendrite le plus long et du nombre de branchements mesuré par celui des extrémités libres. La **DIA VI.5** quantifie le pourcentage de cellules différenciées à partir des neurosphères et montre que les neurones (β 3-tubulin) sont les cellules les plus affectées avec un sauvetage par la mutation de p53 ce qui est en faveur d'une mort prématurée. En B est illustré le phénotype de ces neurones avec un sauvetage par mutation de p53, y compris au niveau morphologique, ce qui suggère une action autre que de survie pour la protéine p53. On remarquera d'ailleurs que même chez le sauvage l'absence de p53 a un effet dramatique sur la morphologie neuronale.

Le rôle des télomères et télomérases dans la prolifération, ou plutôt sa continuation et son arrêt, en particulier pour les cellules souches, commence à être bien compris même si tous les détails ne sont pas élucidés et des surprises toujours possibles. Mais les données sur leur rôle dans la différenciation sont très peu nombreuses. Quand de tels phénomènes de modification de la différenciation ont été observés, par exemple au niveau des follicules



pileux, il a été difficile de les séparer des troubles du cycle cellulaire. Ici ce n'est pas le cas puisque d'une part les cellules prolifèrent normalement, ce qui reste étonnant, et de l'autre nous avons essentiellement affaire à des cellules en G0 (les neurones, sauf si...). D'où une vraie possibilité de s'interroger sur le rôle des télomères dans la différenciation des cellules post-mitotiques.

À cette fin, les neurosphères clonales ont été différenciées ou dissociées et 7 jours plus tard les phénotypes ont été observés chez les WT et les G5 *Terc*^{-/-}. On ne trouve pas de différence dans la capacité des neurosphères clonales à générer les trois types cellulaires principaux (oligodendrocytes, neurones astrocytes) (**DIA VI.6**, A et B), mais très clairement il y a plus de cellules non différenciées et moins de neurones chez les mutants panel C de la même **DIA VI.6**). MAP2 est aussi un marqueur neuronal, spécifique des dendrites, et donne le même résultat, les cellules non différenciées marquées par la nestin étant plus nombreuses chez le mutant (panels D et E de la même **DIA VI.6**). Le tout suggère que les cellules aux petits télomères peinent à s'engager dans la voie de différenciation neuronale. Afin d'exclure un rôle possible de *Terc*, autre que celui de substrat pour la TERT, l'ARN a été transfecté dans les cellules, mais sans effet sur le ratio de différenciation en neurones. Finalement, les morphologies des neurones sont affectées avec une baisse de la différenciation dendritique chez les mutants (**DIA VI.6**, panel F)

Cela suggère que le raccourcissement des télomères ou leur attrition a une fonction indépendante du cycle cellulaire. La possibilité de l'intervention de p53 (qui augmente dans les cellules en prolifération dont la taille des télomères devient critique après un certain nombre de divisions) a donc été avancée (nous l'avons annoncé plus haut), d'autant plus que le pourcentage de cellules ayant du p53 nucléaire passe de 5 à 50 entre le sauvage et le mutant (cellules en culture) et que l'activité de p53 augmente chez les mutants, non seulement dans

les cellules en prolifération, mais aussi dans les cellules en cours de différenciation (**DIA VI.7**, en haut à gauche). Cela est clair avec un gène rapporteur sous contrôle d'un promoteur activé par p53 (PIG3), aussi si l'on suit l'expression de p21, une cible classique de p53 (**DIA VI.7**, en A et B).

Cette augmentation de p53 ne s'accompagne ni d'une modification du taux de division (BrdU) ni d'une augmentation à ce stade de la mort cellulaire, suggérant une action directe de p53 sur la formation de dendrites. Afin de vérifier ce point les auteurs ont mis des neurones du striatum en culture (il ne s'agit plus ici de cellules souches neurales) à partir d'embryons (E14,5) normaux ou p53^{-/-} et observé que la mutation augmente la dendrogenèse (**DIA VI.7**, panel F). Je ne vais pas m'embarquer sur la question du mécanisme pour conclure cette partie par une discussion rapide.

On commencera par proposer que les cellules souches adultes n'ont probablement pas une capacité illimitée de se répliquer sans que cette réplication ne soit marquée par la réduction des télomères. Ce que nous venons de discuter ajoute à cette observation déjà moyennement optimiste que même si ce raccourcissement n'a pas de conséquence sur la survie des cellules souches parce que le nombre de leurs divisions ne permet pas d'atteindre le seuil critique de sénescence et d'apoptose, les étapes suivantes sont néanmoins rendues plus problématiques. D'une part il y a le compartiment d'amplification et si l'on amplifie des cellules qui sont déjà raccourcies au niveau de leurs télomères, alors cette amplification peut permettre d'atteindre un seuil critique de sénescence. Ensuite, à supposer que tel ne soit pas le cas et que nous passons la phase d'amplification, les cellules aux télomères raccourcis semblent avoir une certaine difficulté à se différencier de façon satisfaisante, en tout cas pour ce qui est de la taille de leur arborisation dendritique, sans aucun doute avec des conséquences physiologiques une fois que ces cellules se sont intégrées aux réseaux de neurones, si elles le font.



Il convient maintenant de parcourir les derniers mètres qui nous séparent de la fin du cours de cette année et je le ferai d'une part en proposant une sorte de résumé de ce qui a été dit au cours des quelques heures que nous venons de passer ensemble et en vous donnant un aperçu de ce dont nous parlerons l'année prochaine (si nos télomères le permettent). Pour ce faire je reviendrai une fois de plus au schéma sur lequel ce cours a été ouvert (**DIA VI.8**) en tachant de faire apparaître les interactions entre ces 9 items afin de souligner à quel point le vieillissement, y compris le vieillissement en bonne santé (définition de la longévité), est un phénomène physiologique global. Nous avons commencé par l'instabilité des génomes, chapitre dans lequel nous avons inclus les modifications de l'ADN et les cassures qui en résulte. Nous avons décrit tous les types de cassure, mais avons insisté sur les cassures double brin.

À travers les expériences rapportées par Suberuelle *et al.* et commentées par Herrup *et al.* dans le même numéro de *Nature Neuroscience* de mai 2013 (**DIA VI.9**), nous avons pu insister sur le fait que ces cassures accompagnent la physiologie normale et qu'elles sont donc elles-mêmes physiologiques, appelant une réparation permanente de l'ADN. Cette observation nous a permis de soutenir le point de vue selon lequel le vieillissement repose non pas tant sur les cassures qui sont des événements normaux – j'insiste – que sur les altérations des mécanismes de réparation – j'insiste. Évidemment quand les pathologies, par exemple à la suite de mutations retrouvées dans certaines formes familiales de maladies d'Alzheimer, soit augmentent ces cassures au-delà d'un seuil compatible avec la physiologie, soit diminuent l'efficacité des systèmes de réparation comme cela semble être le cas dans le modèle de la maladie d'Alzheimer de la **DIA VI.10**, des atteintes du génome peuvent s'accumuler ou persister suffisamment longtemps pour fournir une explication possible de cette pathologie. Cela pourrait aussi expliquer pourquoi, même quand les gènes sont mutés dès le départ – dès l'œuf –, ce qui est le cas dans les formes familiales, la maladie ne se déclare que chez l'adulte, parfois même très tardivement.

C'est pour cette raison que nous avons passé un temps considérable, peut-être excessif aux yeux de certains, sur les mécanismes de réparation de l'ADN qui, quand ils sont atteints à la suite de mutations, conduisent à un vieillissement pathologique. Nous avons distingué deux mécanismes essentiels de réparation de l'ADN, la recombinaison homologue et le Non Homologous End Joining (NHEJ) que nous avons traduit par raboutage (**DIA VI.11**). Ces deux mécanismes sont très différents et si le raboutage peut avoir lieu dans les cellules en prolifération et dans les cellules en G0, donc post-mitotiques (c'est le cas des neurones), la recombinaison homologue nécessite une mitose puisqu'elles repose sur la copie exacte de la chromatide sœur au cours de la phase de division cellulaire au moment de la duplication des chromosomes. Nous avons insisté sur le fait que la recombinaison homologue fait peu d'erreurs mais que le raboutage en introduit de façon quasi systématique. Ces erreurs s'accumulent jusqu'à ce que le seuil qui sépare la physiologie de la pathologie ait été franchi de façon irréversible.

Cela nous a amenés à nous intéresser à certaines modalités de la création de ces cassures, tout particulièrement à la réactivation de l'expression d'éléments transposables normalement réprimés et qui en se réinsérant dans le génome non seulement créent des cassures mais modifient ce génome, le mutant donc de façon irréversible, à la fois du fait de la réinsertion et de la réparation par NHEJ de la cassure double brin nécessaire à la réinsertion (**DIA VI.12**) qui introduit une mutation supplémentaire. Évidemment les conséquences en sont plus ou moins graves selon le site d'insertion. Une des conséquences ultérieures (un troisième type de mutation) de la présence de ces séquences répétées est que leur association au moment de la division cellulaire peut amener à des délétions ou des duplications de fragments plus ou moins larges du génome en tout cas qui dépassent largement la taille de la séquence insérée, donc à des variations du nombre de copies de gènes localisés à proximité de ces sites.



Or, nous le savons, le dosage génétique est un point très important de la physiologie et nombre de pathologies sont dues à des variations du nombre de copies de certains gènes non mutés mais simplement surexprimés ou sous exprimés. Un exemple classique est l'expression d'une copie supplémentaire du gène de l'alpha-synucléine retrouvée dans certaines formes de la maladie de Parkinson. Par ailleurs la simple introduction d'un transposon, voire sa simple expression sous forme d'ARN sans cassure d'ADN et sans réinsertion peut conduire à des méthylations de CpG dans la chromatine et donc à des variations d'expression qui n'ont rien à voir avec une délétion ou une duplication génétique (**DIA VI.13**) mais qui peuvent être suffisamment importantes pour induire un phénotype. Vous l'avez souvent entendu ici, si les travaux de génétique impliquent des gains de fonction expérimentaux, donc artificiels, d'un facteur 10, 100 ou 1000 ou des délétions qui annulent complètement l'expression d'un gène (elles suppriment ce gène), ce n'est pas forcément ainsi que ça se passe physiologiquement. Car physiologiquement, de petites variations peuvent avoir des effets très importants sur la durée.

Avant de revenir sur cette affaire de transposition, je vais vous illustrer ce que je viens de dire sur l'importance du dosage génétique par une étude menée dans mon laboratoire par Kenneth Moya et ses collègues sur l'importance du dosage génétique dans les pathologies mais aussi sur le moment où la pathologie apparaît, donc sur la durée du vieillissement en bonne santé (ce qui ici nous intéresse). À la suite de mutations dans le gène *Otx2* qui encode un facteur de transcription nous avons pu générer 6 génotypes qui se distinguent par des activités différentes de ce gène *Otx2*. Sur la **DIA VI.14**, vous constatez que déjà au cours du développement le phénotype s'aggrave avec la perte progressive de l'activité du gène. Pour l'animal sauvage l'embryon est normal à E18, pour l'animal muté (sans *Otx2*), il meurt avant le 10^e jour de la vie embryonnaire.

Pour les niveaux d'activité intermédiaires du gène, que je simplifierai en donnant les chiffres de

20 %, 40 %, 50 % et 70 % du niveau sauvage, on ne voit de différence que pour le 20 % (AA/GFP) qui ne développe pas sa tête, les autres animaux semblant normaux. Il reste que même pour un animal qui semble normal, la pénétrance du phénotype est variable et vous observerez aisément dans le bas de cette **DIA VI.14** que des souris ayant le même génotype peuvent avoir des phénotypes différents, et que la même souris peut avoir une pénétration différente du phénotype entre la droite et la gauche, avec perte d'un œil à droite et pas à gauche, ce qui veut dire qu'une faible variation même stochastique au cours du développement, de l'expression du gène peut amener des modifications très brutales du phénotype (« en avoir ou pas »), dès lors qu'elles fluctuent autour d'une valeur seuil.

C'est déjà là une information, mais si nous nous penchons maintenant sur la question du vieillissement et que nous analysons un certain nombre de phénotypes (morphologie, électrophysiologie, comportement) que nous subsumons dans une valeur globale qui traduit la détérioration liée à la perte progressive des neurones qui expriment *Otx2*. Cette perte d'autant plus importante que l'activité du gène est plus faible (**DIA VI.15**) se traduit en une détérioration morphologique et physiologique progressive, qui donc s'aggrave avec l'âge. Il est particulièrement intéressant de constater que la souris +/AA, qui a environ 70 % d'*Otx2*, est pratiquement normale pendant 2 mois puis se détériore progressivement jusqu'à un an. Mais on constate aussi que pour 50 % d'activité (en bleu), le déficit apparaît beaucoup plus tôt, et encore plus tôt pour 40 % (en vert). Cela illustre clairement que le problème est véritablement un problème de dose, de pénétrance, de durée et finalement de seuil et que nous pouvons appliquer en génétique les principes qui sont ceux-là même de la physiologie. Pour ce qui est du mécanisme d'action d'*Otx2*, et de la façon dont son hypomorphisme peut induire un vieillissement accéléré, nous avons plusieurs hypothèses l'une d'entre elles étant que ce facteur réprime la transcription d'éléments transposables, mais ce n'est là qu'une hypothèse, bien entendu.



Cette hypothèse nous ramène cependant à ces affaires de rétrotransposition (**DIA VI.16**), et nous permet de rappeler que si la génétique n'est pas loin de la physiologie, la physiologie n'est, elle-même, jamais loin de la pathologie. Cette année je vous ai proposé deux exemples qui illustrent cette idée. Le premier exemple est pris dans les travaux du group d'Eric Kandel et le fait que l'activité PIWI, cette protéine qui lie les piRNAs dont une des fonctions est de bloquer la transcription de rétrotransposons, se traduit par la méthylation ou la déméthylation de CpG au niveau de séquences régulatrices de l'expression de CREB2 (**DIA VI.16**), un gène impliqué dans l'apprentissage du réflexe de retrait du siphon après stimulation des branchies chez un mollusque marin, l'aplysie. Au-delà de son intérêt, cette expérience (**DIA VI.17**) nous rappelle que pour distante que la synapse puisse être du noyau, son activité, a des conséquences sur la structure de la chromatine et que nous marquons ainsi de façon parfois irréversible les événements physiologiques, psychologie incluse, dans la structure épigénétique de la chromatine.

Nous avons alors soulevé l'hypothèse, et apporté des données en sa faveur, selon laquelle certaines pathologies psychologiques pourraient trouver leur origine, au moins partiellement, dans la trace ainsi laissée par des traumatismes dont nous pouvons ne pas avoir conscience et qui se sont produits tôt au cours de notre développement, soit dans la période embryonnaire, soit au cours de notre enfance, petite ou grande, voire au cours de la vie adulte. Les conséquences de l'activation d'éléments transposables sur le vieillissement et la possibilité que cette activation accompagne le vieillissement normal ont été illustrés par des travaux sur la mouche *Drosophila* (**DIA VI.18**) complétés par des travaux chez l'humain, je n'y reviens pas.

Je reviens, en revanche, sur notre schéma simplifié (**DIA VI.19**) pour souligner que nous venons de résumer les questions de l'instabilité génétique et, partiellement seulement, celle des altérations épigénétiques. Partiellement seulement parce que cette

instabilité épigénétique engage plus que ces événements moléculaires, somme toute locaux, pour embrasser la structure globale de la chromatine et du noyau. C'est pourquoi nous nous sommes engagés sur la piste des lamines et des laminopathies. La **DIA VI.20**, vous rappelle à quel point la chromatine n'est pas isolée de la cellule, liaison physiologique, mais aussi liaison physique via les protéines qui relient les lamines, protéines de structure nucléaire, au cytosquelette du cytoplasme, en particulier les microtubules. J'ai illustré l'importance de ces interactions à travers l'exemple de la division et de la migration cellulaire (**DIA VI.21**) et des défauts de développement, y compris du développement cérébral qui peuvent résulter d'une mauvaise interaction entre noyau et microtubules à la suite d'une mutation de la lamine B2.

Mais cette influence de la structure du noyau va au-delà du cytoplasme pour atteindre le milieu extérieur. Influence réciproque, puisque nous avons appris que la matrice extracellulaire a un effet sur l'expression des types de lamines (lamine A ou lamine B) (**DIA VI.22**) et qu'à l'inverse, les lamines, via la voie de signalisation Wnt (peut-être d'autres voies aussi) ont une influence sur la sécrétion des protéines de matrice avec des effets pathologiques au niveau de la structure des tissus osseux ou de la paroi des artères (**DIA VI.23**). Si nous ajoutons à cela les effets épigénétiques (**DIA VI.24**), et de relaxation de l'hétérochromatine, conduisant à l'expression illégitime de certains gènes, dont les gènes encodant des rétrotransposons, sans oublier que l'oxydation de lamines est un des éléments régulateurs de leur physiopathologie (**DIA VI.25**) alors nous constatons que notre camembert se remplit progressivement (**DIA VI.26**) par l'interaction entre instabilité du génome, altération épigénétique, dysfonction mitochondriale (stress oxydatif), et altération des communications intercellulaires.

Je ne reviens pas trop sur la question des télomères et l'épuisement des cellules souches qui devrait être encore fraîche dans les mémoires puisqu'elle recouvre en partie les trois derniers



cours, mais il me faut quand même insister sur deux points importants parce qu'ils la relient à d'autres éléments de ce schéma. Le premier point est que l'attrition des télomères et évidemment liée à l'épuisement des cellules souches et à la sénescence dans la mesure où c'est la diminution de la longueur des télomères au-delà d'une certaine limite qui induit sénescence et apoptose. Je rappelle ici qu'il s'agit d'un phénomène progressif dont l'effet délétère ne se manifeste qu'après un certain âge, que nous n'atteignons que du fait d'un changement révolutionnaire de l'espérance de vie, pas partout sur notre planète, ni uniformément dans les contrées qui en bénéficient. Par ailleurs, cette attrition des télomères s'accompagne de cassures double brin et active la DNA Damage Response, traçant un lien avec les instabilités génomiques. D'ailleurs, dans la cas où la réparation ne se fait pas, il y a effectivement instabilité génomique avec, je le rappelle, des fusions chromosomiques et des aberrations cytogénétiques gravissimes.

Enfin et nous l'avons discuté il y a peu, les cellules souches raccourcies au niveau de leurs télomères peuvent quand même se différencier et donner des cellules post-mitotiques anormales qui remplissent mal leurs fonctions physiologiques. Pour les neurones (**DIA VI.27**), leur morphologie dendritique est altérée et même si cela n'a pas été étudié, il est plus que probable que cette anomalie morphologique a des conséquences physiologiques. Les neurones naissent, pour ainsi dire avec des cheveux gris, ce qui nous permet de tracer un lien, parmi d'autres, avec la sénescence cellulaire et les communications intercellulaires (**DIA VI.26**). Nous reviendrons sur tous ces points, en creusant plus, l'année prochaine et c'est pourquoi je vais brièvement présenter, pour conclure le cours de cette année quelques éléments sur les dysfonctions mitochondriales, l'analyse défectueuse des nutriments et la perte de proteostasis.

Si je préfère terminer sur la dysfonction mitochondriale, ou sur une petite partie de ce qui peut en être dit, on verra l'année prochaine pour la suite,

c'est pour relier au point souvent discuté dans les années précédentes de l'importance du métabolisme énergétique dans les pathologies psychiatriques et neurodégénératives. Comme vous vous en souvenez certainement, le cerveau humain par rapport à celui des autres primates est démesuré puisque la règle de proportionnalité entre cerveau et corps lui attribuerait de 400 à 500 cm³ au lieu de ses 1300 à 1500 cm³. Cette augmentation a un coût énergétique majeur et nous plaçons 20 % de notre énergie quotidienne dans cet organe qui représente seulement 2 % du poids du corps. Et même à ce prix nous sommes loin du compte puisque, pour maintenir la proportionnalité avec les primates non humains qui y consacrent 10 %, il nous faudrait consacrer 40 % du métabolisme énergétique corporel au seul cerveau.

Les contraintes que cela crée sont considérables sur le plan évolutif. D'un simple point de vue nutritionnel en suivant Fonseca-Azevedo & Herculano-Houzel (*PNAS* 109: 18571-18576, 2012), si notre diète était semblable à celle des grands singes, nous consacrerions autour de 8 à 10 heures par jour à nous nourrir plus le temps nécessaire à la quête de nourriture. Vous pouvez constater sur la **DIA VI.28** que du macaque au gorille le temps passé à se nourrir passe de 5 à 10 heures par jour avec un effet du nombre de neurones et du poids du corps. Sur le panel de droite vous avez la confirmation que nous sommes avec un cerveau qui constitue 2 % du poids du corps dans la zone des 8 à 10 heures d'activité de nutrition. Si cette activité est réduite à une ou deux heures, c'est parce que notre diète est différente avec une grande part d'aliments cuits de plus grande valeur nutritive. C'est en tout cas ce que proposent les auteurs.

Par-delà cette question de nutrition il y a le fait que, malgré cette grande efficacité, nous sommes en dessous de ce qui serait nécessaire ce qui amène à une distribution inégale du métabolisme entre régions cérébrales, avec une attention particulière pour le cortex préfrontal, je n'y reviens pas, mais aussi une fragilité particulière des neurones



qui ont une forte consommation énergétique, en particulier les neurones à longues projections et les neurones inhibiteurs corticaux à décharge rapide qui jouent un rôle important dans la cognition. Toujours est-il que la production d'énergie est l'élément limitant du fonctionnement du cerveau et intervient dans sa performance et aussi dans sa longévité puisque chaque molécule d'ATP produite s'accompagne de la production de radicaux libres et que trop de radicaux libres ont des effets délétères, nous l'avons vu, au niveau de l'oxydation de nombre d'éléments cellulaires, à commencer par l'ADN lui-même mais sans oublier les lipides et les protéines avec les conséquences déjà discutées. Au passage on comprendra que l'utilisation optimale des réserves implique un système de mesure des nutriments extrêmement fiable et que, là encore, il existe une interaction entre plusieurs quadrants de notre camembert de départ (**DIA VI.29**).

Un point particulièrement intéressant est que les radicaux libres générés par les mitochondries au cours de la synthèse d'ATP ne sont pas forcément les méchants garçons. Une fois de plus, en physiologie tout est affaire de dose. Je vous illustrerai ce point en fin de séance, mais je vais d'abord discuter la question du rapport entre mitochondrie et vieillissement. Je pars de l'article de Bratic & Larsson (*JCI* 123: 951-957, 2013) et de leur introduction que je cite : « *Les raisons exactes du vieillissement sont très mal comprises. Vieillir est vu comme un processus de dégénération causé par l'accumulation de lésions qui mènent au dysfonctionnement cellulaire, au collapse des tissus et à la mort.* » Pour s'en tenir à ce qu'on appelle la théorie des radicaux libres (pour le vieillissement), les ROS seraient uniquement des produits toxiques indésirables générés par la métabolisme aérobie. La chaîne respiratoire localisée sur la membrane interne de la mitochondrie est le site principal de production des superoxydes, une espèce oxygénée réactive (définition globale des ROS) très abondante. Comme on peut l'observer sur la **DIA VI.30**, les superoxydes (O_2^-) sont générés au niveau des complexes I et III de la chaîne respiratoire puis, pour une part importante, transfor-

més en H_2O_2 par la superoxyde dismutase (SOD). H_2O_2 n'est pas toxique en lui-même mais peut le devenir suite à la réaction de Fenton catalysée par les métaux de transition dans la classification de Mendeleïev et la génération de radicaux hydroxyle qui sont les agents les plus réactifs et créateurs de lésions oxydantes qui, une fois encore, touchent lipides, protéines et acides nucléiques.

En fait cette *Mitochondrial Free Radical Theory of Aging* (MFRTA) bien qu'en accord avec de nombreuses observations a été mise un peu en doute et remplacée dans des schémas moins mécanicistes (le méchant radical libre qui casse tout ce qui passe). Les auteurs discutent l'affaire des ROS dans le cadre plus large du rôle de la mitochondrie dans le vieillissement avec un intérêt particulier pour les mutations mitochondriales, le rôle des ROS mitochondriaux et le lien entre fonction mitochondriale et signalisation (un point trop important pour être traité en fin de cours et que je développerai en 2014). Sur le plan évolutif, les mitochondries sont d'origine bactérienne et, bien qu'ayant dévolu une grande partie de leur génome au noyau, elles ont gardé un certain nombre de gènes portés par les 16,5 kb de leur ADN circulaire. Chez les mammifères, ces gènes codent pour 13 protéines, 22 ARN de transfert, et 2 ARN ribosomiaux. Les protéines sont toutes présentes dans la chaîne respiratoire et l'ATP synthase (complexe V), donc essentielles à la phosphorylation oxydative (**DIA VI.30**).

Il existe des preuves solides d'une augmentation du nombre de mutations de l'ADN mitochondrial (mtDNA) avec l'âge. Par exemple des mutations ponctuelles et des délétions de l'ADN ont été observées chez les vieillards (y compris au niveau du système nerveux central). Cela résulte de lésions non réparées de l'ADN, du fait des ROS mais aussi (c'est peut-être la part essentielle) des erreurs qui se produisent au cours de la réplication de l'ADN, puisque les mitochondries se reproduisent par scissiparité. Une cellule somatique humaine contient des milliers de copies de mtDNA (10^5 copies pour l'oocyte) et les mitochondries se dupliquent sans



lien avec le cycle cellulaire. Le plus important ici est qu'une même cellule peut contenir des mitochondries distinctes sur le plan génétique (définition de l'hétéroplasmie). On comprend que pour une mutation à effet pathologique, l'apparition de la maladie dépendra des niveaux respectifs des populations saines et « atteintes » pour les cellules concernées. Cette tolérance en pourcentage de mitochondries malades peut osciller et si certaines pathologies apparaissent dès un seuil de 60 % de mitochondries anormales (délétions larges), d'autres mutations sont plus permissives (jusqu'à 95 % de mitochondries malades pour certaines mutations dans les gènes codant pour des ARN de transfert). Cette distribution inégale des mitochondries bien portantes et « malades » peut varier entre les tissus, voire entre les cellules d'un même tissu et il peut exister un mosaïcisme cellulaire de l'atteinte à la chaîne respiratoire.

La question se pose donc du rôle des mutations de l'ADN mitochondrial dans le vieillissement. Pour étudier cette question, des souris ont été produites dont une sous-unité de la polymérase mitochondriale chargée de la correction des erreurs (proof-reading) est déficiente (mtDNA mutator mice), ce qui mène évidemment à de nombreuses mutations réparties en trois classes, sur lesquelles je ne m'appesantis pas. Ces souris présentent un grand nombre de phénotypes qui évoquent le vieillissement (la liste est longue : poils blancs, alopecie, surdité, cardiomyopathies, fertilité réduite,...) et ont une durée de vie réduite. Ces souris « mutator » (pour simplifier) ont donc un phénotype de progeria (progeroid) qui a récemment été attribué, au moins partiellement, à un dysfonctionnement précoce (embryonnaire) des cellules souches somatiques (**DIA VI.31**, panel de gauche). Les auteurs ont en particulier démontré que le développement des cellules souches hématopoïétiques et neurales est affecté dès la période embryonnaire et que les cellules souches neurales sont réduites en nombre *in vivo* et prolifèrent mal *in vitro*. Il est intéressant de constater que le dysfonctionnement de la chaîne respiratoire n'apparaît que tardivement dans les

tissus somatiques post-mitotiques (parfois après le phénotype de progeria) et il est donc possible que ce phénotype trouve sa cause première dans l'atteinte des cellules souches somatiques (y compris des cellules souches neurales).

C'est là une observation très importante qui suggère que, chez cette souris « mutator », les mutations somatiques de l'ADN mitochondrial viennent des erreurs de réplication au cours du développement plutôt que de lésions qui s'accumuleraient au cours de la vie adulte, ce qui donne du poids à l'hypothèse « cellule souche ». Un traitement avec l'antioxydant N-acetylcysteine rétablit la capacité des cellules souches neurales à se renouveler, ce qui suggère que des changements subtils dans l'état redox et/ou le niveau des ROS sont des éléments importants dans la fonction des cellules souches (**DIA VI.31** panel de gauche). Il reste que leur mesure dans cette souris ne démontre pas une forte augmentation des ROS.

Si tel est le cas, cela signifie que les mutations qui touchent la chaîne respiratoire ne s'accompagnent pas d'augmentation du niveau des ROS et qu'il n'y a pas, de ce fait, installation d'un cercle vicieux, les mutations augmentant le niveau des ROS qui induisent des mutations, et ainsi de suite (hypothèse courante). Cela peut ne pas surprendre puisque c'est l'activité de cette chaîne qui provoque la formation de ROS, mais cela bat aussi en brèche l'idée que les lésions oxydatives ont un rôle causal dans le vieillissement (ce qui ne veut pas dire que des lésions dans les systèmes de réparation des lésions ne sont pas des causes du vieillissement comme nous l'avons discuté pendant près de 9 heures et suggéré en début de cours pour la maladie d'Alzheimer). Sur cette base et celle d'autres arguments que je vous épargne (dont la faible efficacité des traitements vitaminés ou régimes alimentaires censés diminuer la formation des radicaux libres – fini le thé vert !), les auteurs mettent en doute la validité d'une théorie du vieillissement fondée sur une production anormale de radicaux libres par les mitochondries.



Ils avancent en revanche une autre ligne de réflexion qui tout en conservant l'idée qu'il peut effectivement y avoir une dysfonction mitochondriale primaire (causale donc), une altération métabolique plus large pourrait avoir des effets secondaires sur la production énergétique de la mitochondrie ou même sur leur biogenèse (**DIA VI.30**, panel de droite). Les auteurs rappellent que les dysfonctions mitochondriales, mais aussi une biogenèse mitochondriale déficiente, sont causées par des défauts de la signalisation rétrograde via des facteurs et gènes nucléaires ou des produits du métabolisme mitochondrial (ATP, Ca⁺⁺, ROS, NO, NAD⁺/NADH). En effet il semble que dans plusieurs organismes le métabolisme mitochondrial régule la longévité via le « nutrient sensing pathway » et la restriction calorique. La signalisation par Insuline ou insulin-like growth factor (IGF-1), dite signalisation IIS (mesure du glucose), et la signalisation via mTOR (mesure des acides aminés) sont les deux systèmes de mesure des nutriments (qui a sa place dans notre camembert à 9 tranches).

Une altération de IIS et une inhibition de mTOR (par des drogues comme la rapamycin) augmentent la durée de vie des mouches, des vers et des mammifères. De même la restriction calorique a des effets positifs sur la longévité, depuis la levure jusqu'aux primates, même si les mécanismes sont encore mal compris. C'est dans ce contexte qu'il faut placer les effets bénéfiques de la restriction calorique (en fait sur *sapiens*, il y a des doutes). Je n'ai guère le temps de m'y attarder cette année, mais j'y reviendrai l'année prochaine et je demande simplement qu'on s'aide du modèle de la **DIA VI.31** pour considérer l'hypothèse d'un passage par une augmentation du métabolisme mitochondrial et une augmentation parallèle et transitoire des ROS.

Ce qui me permet de terminer le cours de cette année par une sorte de réhabilitation des ROS. Je vais faire appel à ce qui a déjà été dit et à une revue de Nathan et Cunningham-Bussel (*Nature Reviews Immunology* 13: 349-361, 2013). Le terme de ROS dans ce qui suit subsume toutes les espèces oxygé-

nées réactives, espèces qui participent à un grand nombre de phénomènes biologiques et qu'il est parfois difficile de séparer ou de quantifier séparément, même si les outils se mettent en place qui permettent ces opérations et permettent aussi de localiser les ROS dans la cellule. Il faut encore savoir que les ROS ne sont pas les seules petites molécules réactives et qu'il faut compter avec les espèces azotés (NO^{*}, NO₂^{*}) ou carbonées (CO), ou les sulfures (H₂S, HS⁻) qui ont des effets parfois proches, parfois distincts de ceux des ROS. La biologie des ROS a fait des progrès considérables au cours des dernières années qui permettront peut-être de développer des outils pharmacologiques touchant telle ou telle de leurs activités.

Le point de départ de cette réflexion est que le stress oxydatif ne résume pas l'entièreté de la biologie des ROS, loin de là et qu'il est nécessaire d'intégrer le rôle biologique des ROS à notre réflexion. Les ROS sont générés par les NADPH oxydases (NOX) au niveau mitochondrial comme nous l'avons vu plus haut (**DIA VI.30**), mais aussi au niveau du réticulum endoplasmique et des membranes plasmiques. La production des ROS est soumise à une régulation précise avec plusieurs points de contrôle (check-points). Les NOX sont des enzymes transmembranaires qui peuvent être activées par la fixation à son récepteur d'un ligand comme l'insuline, le PDGF, le NGF, les FGF, en fait un grand nombre de molécules impliquées dans la signalisation. Cette régulation de la concentration en ROS se fait au niveau de leur synthèse et de leur dégradation. La **DIA VI.32**, en même temps qu'elle souligne que c'est la quantité de ROS qui importe et qu'à des concentrations faibles, les ROS ont une fonction physiologique, donne les sources de ROS ainsi que les systèmes qui permettent leur catabolisme, enzymatique ou non.

Les auteurs de cette revue distinguent plusieurs types de cibles des ROS. D'abord les cibles atomiques à travers une liaison covalente, souvent réversible, avec certains atomes positionnés correctement au sein de macromolécules. Ces modifications sont physiologiques et, du fait de la diffusion



de ces petites molécules, peuvent toucher plusieurs voies physiologiques qui sont ainsi modifiées de façon synchrone en réponse à l'état métabolique de la cellule. Une des cibles atomiques privilégiées est le sulfure des cystéines et des méthionines que l'on trouve dans les chaînes peptidiques (**DIA VI.32**). L'environnement de la méthionine ou de la cystéine est important (les environnements acides sont favorables à l'oxydation), mais il y a probablement d'autres facteurs régulateurs de l'oxydation qui entrent en jeu. Peu de travaux ont été consacrés à cette question. Parmi les protéines dont on sait qu'elles sont cibles des ROS, on peut citer de nombreuses kinases et phosphatases (pour les spécialistes, PTEN, ATM, la CamK II si importante dans la physiologie nerveuse), de nombreux facteurs de transcription (famille FOXO, Zn-Finger), les histones déacétylases, et de nombreuses autres protéines extrêmement importantes sur le plan physiologique. Je ne vais pas entrer dans la description exhaustive du catalogue mais vous illustre ce point par la **DIA VI.33** qui en offre une sorte de tableau synthétique. Vous pouvez y constater une action au niveau de la transduction du signal (ici celle du TNF ou de l'EGF) et au niveau transcriptionnel, soit directement (oxydation de FOXO), soit indirectement via la signalisation (la voie du TNF en montre un bon exemple).

Au-delà du ciblage d'atomes spécifiques, le soufre, par exemple, les ROS peuvent toucher nombre de macromolécules, au premier rang desquelles l'ADN. Par exemple, les ROS produits par la mitochondrie périnucléaire peuvent oxyder les résidus guanine au niveau de promoteurs spécifiques et modifier la transcription de gènes régulés par ces promoteurs. C'est ce qui est illustré dans la **DIA VI.34** où l'on constate que l'oxydation d'une guanine dans le promoteur du VEGF (qui va induire un bourgeonnement des vaisseaux et donc une meilleure oxygénation du tissu) stimule la fixation du Hypoxia-Induced-Factor et la transcription du gène encodant le VEGF. On peut donc dire ici que l'oxydation s'inscrit dans une régulation physiologique qui apporte une réponse à une situation d'hypoxie. Sur la même **DIA VI.34**, on constate que la cassure de

l'ADN qui suit le mécanisme de Base excision repair sur lequel nous avons quasiment ouvert le cours (**DIA VI.35**) et qui cause la cassure de l'ADN, permet aussi le recrutement d'une topoisomérase qui au cours de la torsion qu'elle impose à l'ADN donne accès à des facteurs de transcription qui initie une réponse aux androgènes ou aux œstrogènes.

Où l'on voit le plaisir pris ici à clore un cours qui commença de façon si catastrophique et qui se termine si bien, tout l'inverse du supplice du pal. Ce qui j'espère vous incitera à revenir l'année prochaine pour que nous puissions continuer à faire tourner cette roue de la fortune (**DIA VI.36**) qui a structuré l'enseignement de cette année. ■