



14 octobre 2013

## Les désordres du génome et leur réparation

Avant de reprendre, je veux souligner que l'attitude qui consiste à ne pas voir la pathologie ou le vieillissement comme le résultat d'une dégradation permanente à partir d'un point idéal, ce qui est encore la vision dominante, mais de la considérer comme un déséquilibre entre destruction et construction, un excès de l'un ou de l'autre pouvant avoir des conséquences pathologiques, ouvre des voies nouvelles au développement de thérapies. Ce n'est donc pas à un jeu purement gratuit auquel nous nous livrons.

Alors que les modifications subtiles sont prises en charge par le système BER sur lequel nous sommes attardés la semaine dernière et dont je vous rappelle les principales étapes (retrait de la base, hydrolyse du squelette phosphodiester, réparation et ligation **DIA II.2**), des lésions plus volumineuses (bulkier) de l'ADN simple brin (souvent induites par les UV) sont capables de distordre la structure hélicoïdale de l'ADN. Ces lésions sont prises en charge via la réparation par excision de nucléotide (NER) et non plus de la seule base comme dans le cas du BER. Cette réponse implique plusieurs étapes : (i) la reconnaissance de la lésion, (ii) une coupure de part et d'autre de la lésion, (iii) le remplissage de la partie délétée et (iv) la ligation. Ce qui engage l'activité coordonnée d'une trentaine d'enzymes (**DIA II.3**). En plus de réparer globalement l'ADN (GG-NER pour *global genome*) quand les lésions ont un effet de distorsion sur la structure comme, par exemple une liaison entre deux thymidines (**DIA II.3**), la réparation par excision de nucléotide (NER) répare aussi au cours de la transcription (synthèse d'ARN à partir de l'ADN) (TC-NER pour *transcription-coupled NER*), les modifications qui peuvent bloquer la progression de la RNA-polymérase. Ces deux systèmes diffèrent par les mécanismes de reconnaissance de la lésion ((i) dans la **DIA II.3**), mais utilisent les mêmes enzymes (ii à v dans la même **DIA II.3**). On voit en haut à droite que dans un cas c'est le changement de structure dû à la lésion qui est reconnu

par RAD23B et que dans le deuxième cas c'est l'arrêt de la RNA polymérase (Pol-II) qui constitue le signal. Pour la suite c'est à peu près la même chose dans les deux cas, avec des hélicases comme XBP et XDP qui désenroulent l'ADN, et TFIIH qui maintient le système ouvert donnant ainsi accès aux enzymes de réparation. Les deux nucléases XPF et XPG retirent tout le morceau abîmé et la DNA polymérase recopie le brin complémentaire avant que la ligase n'achève le travail.

Des défaillances de ce système, au niveau d'une ou plusieurs de ces enzymes – dont des hélicases dont, je le répète, la fonction est de désenrouler les brins d'ADN et d'ARN au cours de la réplication ou de la transcription – sont associées à de nombreuses maladies génétiques autosomiques récessives marquées par un vieillissement prématuré. Parmi ces maladies, les plus connues sont xeroderma pigmentosum (XP), Cockayne syndrome (CS), et une forme photosensible de trichothiodystrophie (TTD). Bien que systémiques et affectant de nombreux organes, on s'en doute un peu, ces trois maladies sont souvent associées à des désordres neurologiques. Xeroderma pigmentosum (mutation des hélicases) est caractérisée par une sensibilité importante aux radiations UV. C'est une maladie rare, qui en plus des transformations cellulaires (cancers) qui sont sa marque principale, est associée dans 25 % des cas environ à des syndromes neurologiques, dont des microcéphalies, des désordres cognitifs, des ataxies cérébelleuses (ce sont des troubles de la coordination motrice d'origine cérébelleuse), des surdités sensorielles et des neuropathies périphériques. Les mutations conduisant au phénotype xeroderma pigmentosum peuvent toucher le GG-NER et le TC-NER. Le Cockayne syndrome est aussi une maladie rare uniquement associée à des mutations dans le système TC-NER. Il existe des formes juvéniles et des formes plus adultes (moins graves) et dans tous les cas on observe un vieillissement prématuré ou progeria. Pour la trichothiodystrophie, les phénotypes rappellent les phénotypes xeroderma pigmentosum et Cockayne



syndrome, et 80 % des patients ont des troubles neurologiques (microcéphalie, retard mental, surdité, ataxie, démyélinisation). Il s'agit d'une atteinte de TC-NER (partie droite de **DIA II.4**).

Je passe momentanément à la réparation des cassures simple brin (SSBR). C'est la lésion la plus commune. Elle se produit au rythme de plusieurs dizaines de milliers de fois par cellule et par jour. La formation de ces cassures est induite par de nombreux mécanismes, y compris des réactions entre le désoxyribose et les radicaux libres (ROS). Par ailleurs les SSB sont des intermédiaires de nombreux mécanismes de réparation (BER, dont nous avons parlé plus haut, **DIA II.2**) et peuvent même constituer des états intermédiaires normaux de certaines activités enzymatiques, comme l'activité de la topoisomérase 1 (TOP1) qui se lie temporairement à l'ADN pour dénouer, grâce aux cassures simple brin, les super enroulements qui se forment au cours de la transcription et de la réplication. De ce fait, il existe plusieurs types de SSB et le maintien de ces lésions peut bloquer la transcription ou conduire au collapse de la fourche de réplication. De nombreuses enzymes servant à la réparation et leurs mutations sont à l'origine de désordres neurobiologiques (entre autres). La **DIA II.4** illustre l'importance de SSB dans certains syndromes et compare avec TC-NER. Si le Cockayne syndrome (CSB) et la trichothiodystrophie résultent exclusivement de déficiences du TC-NER (voir plus haut), celles de SSB provoquent au moins trois maladies (ataxia avec une apraxie oculomotrice (AOA1), une ataxie spinocérébelleuse avec neuropathie axonale (SCAN1) et une microcéphalie (MCSZ) dues respectivement aux mutations de trois enzymes de réparation : APTX, TDP1 et PNKP.

AOA1 est donc provoquée par des mutations de l'aprataxin (APTX), une enzyme qui a une activité de déadénylation et transforme les groupements 5'AMP en 5'P (nécessaire à la réparation) au niveau des cassures (**DIA II.4**). Elle a aussi de ce fait une activité dans la réparation des cassures double brin. La maladie est rare et récessive (auto-

somique) et, sur le plan anatomique, se traduit par une perte sévère des cellules de Purkinje dans le cervelet. Des données récentes suggèrent aussi un rôle dans la réparation de l'ADN mitochondrial ce qui est évidemment intéressant pour d'autres types de pathologies. Nous avons déjà fait allusion à la question des mutations de l'ADN mitochondrial et nous y reviendrons plus tard dans le cours.

SCAN1 est une ataxie cérébelleuse qui apparaît vers l'âge de 15 ans. Elle est produite par une activité défectueuse de TDP1, enzyme qui hydrolyse le lien entre TOP1 (topoisomérase 1) et l'extrémité 3' terminale de la cassure (**DIA II.4**). PNKP à l'origine des microcéphalies est une enzyme qui grâce à ses deux activités de kinase et de phosphatase restaure les extrémités 5'-P et 3'-OH et est utile pour la réparation des SSB et DSB. Comme pour APTX et TDP1, la mutation retarde les réparations SSB et rend l'ADN plus sensible aux agents oxydants. Les patients souffrent de microcéphalie, d'épilepsie précoce et de délai du développement. On peut donc souligner que si AOA1 et SCAN1 sont des maladies neurodégénératives progressives, MCSZ est une maladie du développement cérébral.

Pour continuer ce tour d'horizon sur la réparation, j'en viens au plat de résistance des cassures double brin (DSB) et à leur réparation (DSBR). Les DSB représentent la forme la plus délétère des lésions de l'ADN. Ils activent les mécanismes de mort cellulaire et, en l'absence de réparation, s'accompagnent d'une instabilité du génome (translocations). Souvent induits par les ROS produits par le métabolisme mitochondrial, les DSB peuvent aussi constituer l'étape intermédiaire de processus physiologiques normaux, par exemple la recombinaison V(D)J dans la génération des immunoglobulines, ou au cours de la méiose (augmentation de la diversité génétique). Sur un plan moins physiologique, les DSB sont induits par les irradiations ou chimiothérapies. Il n'existe que deux systèmes de réparation : la recombinaison homologue (HR) et le Non Homologous End Joining (NHEJ). Comme son nom l'indique et je vais y revenir, la recombinaison homologue nécessite la copie



d'une séquence homologue sur l'autre chromatide. De ce fait, elle est très fidèle et fait peu d'erreurs, mais ne peut opérer que dans les cellules en division, en phase S et G2 (synthèse d'ADN) alors que NHEJ, qui est un simple raboutage des extrémités brisées, peut intervenir à toutes les étapes du cycle cellulaire et dans les cellules post-mitotiques mais est prône aux erreurs. Pour les neurones matures qui ne se divisent pas, seule la NHEJ est envisageable.

La RH donc, agit essentiellement durant les phases S et G2 du cycle cellulaire. La **DIA II.5** rappelle à gauche les différentes étapes du cycle cellulaire. En phase G0, les cellules sont quiescentes (comme les neurones post-mitotiques). Elles peuvent sous l'effet de mitogènes (les neurones ne le peuvent pas normalement et les forcer à entrer en mitose active les systèmes de mort cellulaire par apoptose) entrer en G1, phase de croissance qui prépare la mitose, puis en phase S de réplication de l'ADN puis en phase G2 de croissance répllicative puis en phase M, la mitose proprement dite. En fin de M, on peut soit continuer en repassant en G1, soit sortir du cycle et passer en G0.

Sont indiqués les points de restriction en G1 (réponse aux signaux mitogènes) et les points de contrôle (checkpoints) qui contrôlent que tout est en ordre pour passer de S en G2 puis de G2 en M (les protéines de checkpoint sont impliquées dans la HR). Je ne développe pas les mécanismes à l'œuvre dans la régulation du cycle cellulaire, cela nous écarterait trop du sujet et, ceux d'entre vous qui sont intéressés à avoir plus de détails les trouveront aisément dans les manuels de biologie cellulaire (ou même sur le web). Comme je vous l'ai dit et comme cela est indiqué au centre de la figure de droite de la **DIA II.5**, la recombinaison homologue n'agit qu'en S et G2, mais le NHEJ est possible en tout point du cycle, y compris en G0 (non représentée sur ce schéma). La compétition entre NHEJ et HR et le choix entre les deux voies de réparation (quand il est possible, donc dans les cellules en prolifération) sont régulés par des facteurs tiers. C'est un sujet en soi sur lequel nous ferons l'impasse.

Nous venons de le voir, la recombinaison homologue répare les DSB pendant les phases S et G2 du cycle cellulaire. Cette voie de réparation semble avoir évolué pour faire face aux DSB qui se forment au cours de la réplication de l'ADN quand la fourche de réplication collapse du fait essentiellement d'une lésion (qui peut être d'une autre nature, par exemple l'oxydation d'une base) bloquant la progression de la DNA polymérase, selon un mécanisme très proche de la TC-NER qui est activée quand la RNA-polymérase rencontre une base modifiée (nous en avons parlé il y a un instant). Ce mécanisme de recombinaison homologue utilise le brin d'ADN intact (chromatide sœur) comme source d'information exacte quant à la séquence normale à recopier.

Dans le modèle simplifié de la **DIA II.5**, on constate qu'à la suite de la fixation du complexe MRN (on ne s'inquiète pas pour l'instant et ce complexe sera défini plus tard) CtIP induit une résection 5'-3' et crée un fragment 3' simple brin libre qui peut être hydrolysé par d'autres exonucléases, ici EXO1 est indiquée. Le DNA simple brin (ssDNA) généré par l'action des exonucléases est stabilisé par l'association avec la protéine RPA (le complexe RPA-RAD52 en vert et rose). Ce complexe est alors remplacé par un autre complexe (BRACA2-RAD51) et c'est ce ssDNA recouvert de RAD51 qui peut se glisser dans le double brin de la région homologue de la chromatide sœur. On comprend aisément, c'est ici le point le plus important, que ce mécanisme est d'une grande fidélité puisqu'il repose sur la copie d'un brin « normal ». On voit aussi qu'il implique une importante mobilité de la chromatine, puisqu'il faut aller chercher le brin normal. Je reviendrai plus tard sur cette question de la mobilité quand nous parlerons de la structure de la chromatine.

La réparation par NHEJ (qu'on peut traduire par le raboutage des brins non homologues) est le système majoritaire de réparation, le seul possible dans les phases du cycle pendant lesquelles la chromatide sœur est absente. Il obéit à un principe de réparation très différent de celui mis en œuvre dans la



RH. Les deux fragments d'ADN sont reconnus par le complexe Ku (Ku70 et Ku80) qui se lie directement aux deux extrémités créées par la lésion et recrute des kinases (enzyme qui ajoute un phosphate à leurs molécules substrats) activées par l'ADN (DNA-PKcs sur notre schéma de la **DIA II.5**). Ces complexes multiprotéiques stabilisent et alignent les extrémités libres de l'ADN. Les DNA-PK sur les brins qui se font face, du fait de leur interaction se phosphorylent mutuellement et se détachent. Elles ont de multiples activités, par exemple phosphoryler Artemis, une endonucléase qui digère les bouts simple brin 5' et 3' permettant de révéler des séquences complémentaires. Avant la ligation qui s'ensuit, PNKP (polynucléotide-kinase-phosphatase déjà rencontrée dans la réparation des cassures simple brin) est recrutée via une interaction avec XRCC4-LIG4 ce qui permet de retirer tout groupe phosphate en 3' et d'en ajouter en 5', ce qui est indispensable à la ligation. Récemment ATM (protéine mutée dans ataxia telangiectasia, comme on va le voir) a aussi été impliquée dans NHEJ comme facteur de signal DBS et pourrait jouer un rôle dans la réparation au niveau de la chromatine peu active sur le plan transcriptionnel, encore appelée hétérochromatine. À l'inverse de la HR, NHEJ est moins fidèle et peut introduire des mutations dans la séquence. En fait c'est là le cas général.

Des mutations dans les deux systèmes HR et NHEJ ont des conséquences sur le plan des pathologies. Pour s'en tenir au système nerveux, les mutations affectant le système HR concernent seulement les cellules en division, donc essentiellement les cellules souches, au cours du développement mais aussi chez l'adulte puisqu'il existe une neurogenèse adulte, comme nous l'avons rappelé la semaine dernière. De façon logique – puisqu'on touche les cellules souches – ces mutations entraînent des microcéphalies d'origine développementale. On retrouve aussi des cas de microcéphalie dans des mutations de la voie NHEJ (c'est un mode de réparation qui touche aussi les cellules en mitose et pas seulement les cellules en G0) mais aussi des ataxies caractérisées par des désordres neuromusculaires d'origine

nerveuse qui se mettent en place après la maturation initiale du système nerveux. Dans les minutes qui suivent, je vais m'attarder sur trois pathologies qui concernent, peu ou prou, le système nerveux.

Auparavant je vais vous donner un aperçu un peu plus détaillé des deux systèmes de réparation par RH et NHEJ, en essayant de ne pas trop entrer dans les détails. Je dois d'ailleurs préciser que dans les articles que j'ai pu lire pour préparer ce cours, j'ai découvert nombre d'informations contradictoires, ce qui suggère que nous sommes loin du compte quant à notre compréhension réelle de ces phénomènes. Je vais donc essayer de synthétiser les données des revues et articles qui se focalisent sur le rôle de la chromatine dans la réparation, c'est-à-dire non seulement de l'ADN mais de l'ADN et de son « habillage », en particulier de l'habillage par les histones. En effet comme le rappellent Price & D'Andrea (*Cell* 152: 1344-1354, 2013), la réparation de l'ADN se situe dans le contexte de l'organisation de la chromatine. Les cellules des mammifères contiennent plusieurs structures chromatiniennes, par exemple les régions actives de l'euchromatine, les télomères, les régions intergéniques, les fourches de réplication, les régions compactes de l'hétérochromatine pauvres en transcription. Ces régions se distinguent toutes par des patterns d'histones différents, avec des histones spécifiques ou des variétés de protéines qui se fixent à la chromatine, plus la densité du « packaging » par les nucléosomes. La **DIA II.6** que vous avez déjà vue la semaine dernière vous schématise la structure d'un nucléosome, avec les 8 histones principales (doublets H2A, H2B, H3 et H4) autour desquels l'ADN s'enroule dans une conformation qui retient 147 nucléotides appariés. J'ai aussi indiqué ici H1 (une autre histone) qui se fixe au linker DNA et participe au « packing » du nucléosome.

La structure de la chromatine influence fortement la nature des gènes exprimés. Elle a donc une fonction épigénétique qui prend en compte une forme de mémoire du neurone (son âge, son histoire, sa participation à un réseau de neurones).



Cette structure joue aussi sur la réparation de l'ADN, ce qui est évident dès lors qu'on comprend que pour réparer l'ADN il faut y avoir accès. D'où le modèle « access-repair-restore » qui rappelle qu'il faut détecter les cassures dans les différentes configurations de la chromatine énumérées plus haut et modifier les architectures locales de la chromatine pour que les enzymes de réparation aient accès à l'ADN et le réparent. Ce qui implique une réorganisation du nucléosome pour qu'en fin de course le système soit remis en place (restore). Cela est vrai pour tous les types de réparation, même si je me concentre ici sur les DSB dans les cellules de mammifères.

La **DIA II.7** illustre la cinétique rapide d'accès au DSB. Le complexe MRN que vous avez pu voir présenté sur la **DIA II.5**, est composé de trois protéines (Mre11, Rad50 et Nbs1, d'où son nom MRN). Il est rapidement amené au site de lésion où il recrute et active la kinase ATM (mutée dans ataxia telangiectasia). ATM activée par MRN phosphoryle des centaines de protéines, on ne voit donc ici que le bout de l'iceberg (pas étonnant que certains papiers soient contradictoires). Parmi les cibles classiques et bien vérifiées nous avons les protéines de checkpoint comme p53 et chk2 et des protéines de réparation de l'ADN comme BRCA1 actif dans la HR et 53BP1 actif dans la NHEJ. Une cible très importante d'ATM est H2AX, dont la forme phosphorylée (par ATM) gH2AX (nous avons introduit cette histone modifiée dans le premier cours) crée un site d'ancrage pour la protéine MDC1 ce qui permet de recruter des complexes MRN/ATM additionnels et contribue à l'amplification du recrutement du système de réparation.

Le résultat de cette amplification est une augmentation de la présence de gH2AX sur plusieurs centaines de milliers de bases, ce n'est donc pas, loin de là, un phénomène purement local qui serait restreint au seul site de la lésion. Dans les minutes qui suivent (**DIA II.7**), MDC1 recrute des effecteurs plus tardifs, comme RNF8 et RNF168 (cette dernière n'est pas non représentée sur le schéma),

deux ubiquitines ligases qui ubiquitinent la chromatine et stimulent la fixation locale des protéines de réparation BRCA1 et 53BP1. Je rappelle dans cette même **DIA II.7** que l'ubiquitination consiste en l'ajout de plusieurs unités d'ubiquitine, une petite protéine de 76 acides aminés. La polyubiquitination conduit souvent à la dégradation par le protéasome comme cela est figuré, mais ce n'est pas sa seule fonction, elle peut jouer un rôle de modification, à l'égal d'une phosphorylation. Là encore ce phénomène s'étend sur plusieurs dizaines de milliers de bases, mais cette extension est néanmoins limitée par l'activité de deux ligases E3 (TRIP12 et UBR5) qui promeuvent la dégradation de RNF168 (dégradation elle-même ubiquitine dépendante, ce qui n'arrange rien) par le protéasome.

Pour en venir à la réparation elle-même, je reviens sur le fait que deux mécanismes coexistent, NHEJ et HR. Je rappelle, une fois encore, que HR est fondée sur une copie de la chromatide intacte, ne peut se produire qu'au cours de la division cellulaire et est parfaitement fidèle, ce qui n'est pas le cas de NHEJ qui fait des erreurs et induit donc des mutations. Dans la **DIA II.8** je vous remontre que la NHEJ implique la fixation des protéines Ku70/80 et des DNA-PKc alors que HR repose sur la génération d'un simple brin qui peut aller rechercher une homologie dans la chromatide sœur, uniquement présente pendant les phases S et G2 du cycle cellulaire. Le choix entre NHEJ et HR (quand il est possible) implique des mécanismes encore mal compris mais dans lesquels 53BP1 et BRCA1 jouent un rôle (Chapman *et al.*, *Molecular Cell*, 47: 497-510, 2012). Excusez ces répétitions, mais je ne suis pas certain qu'elles soient complètement inutiles s'agissant de phénomènes compliqués.

Nous pouvons maintenant en venir à l'organisation de la chromatine et la stabilité du génome. Comme nous venons de le voir (**DIA II.6**) le nucléosome est composé de 147 nucléotides enroulés autour d'un octamère d'histones (2 dimères H3-H4 et 2 dimères H2A-H2B). Les queues N-terminales des histones non représentées sur cette **DIA II.6**



s'étendent éventuellement hors du nucléosome et sont riches en lysines (très conservées au cours de l'évolution) qui peuvent être modifiées (acétylation, méthylation, ubiquitination) ce qui change leurs propriétés et leurs effets (structure de la chromatine, interaction avec d'autres partenaires protéiques).

Par ailleurs, l'organisation de la chromatine peut aussi être modifiée par des complexes multiprotéiques qui sont organisés autour d'une ATPase (4 familles d'ATPases ont été identifiées : SWI/SNF, CHD, INO80 et ISWI). L'hydrolyse de l'ATP (c'est la fonction des ATPases) fournit l'énergie nécessaire pour que les protéines de ces complexes déplacent le nucléosome et donnent ainsi accès à l'ADN. Par déplacer, je veux dire faire glisser le nucléosome pour couvrir un domaine et en dégager un autre, et échanger une histone contre un variant d'histone spécialisé dans la réparation. Cette dynamique des nucléosomes permet de souligner une forme d'inégalité des différentes régions de la chromatine devant les cassures et leur réparation. Certaines régions sont mieux protégées contre les agents délétères ou moins accessibles à la machinerie de réparation.

Un des changements les mieux caractérisés est l'ouverture de la chromatine ou sa relaxation au niveau des DSB, en préparation de la réparation. Cette ouverture est associée à l'augmentation de l'acétylation des histones H2A et H4 au niveau de la coupure (**DIA II.9**). De nouveau ce phénomène n'est pas strictement local puisque cela concerne plusieurs centaines de milliers de bases (un nucléosome c'est 147 nucléotides, on voit donc que 1000 bases cela veut dire une dizaine de nucléosomes). Les acétylations des queues des histones dépendent des acétyltransferases. L'acétyltransferase Tip60 fait partie du complexe NuA4 qui contient plusieurs enzymes dont, à part Tip60, deux hélicases (Ruvbl1, Ruvbl2) et la p400 motor ATPase.

Le recrutement de NuA4 se fait via MDC1 (donc via gH2AX, voir schéma en bas **DIA II.9**). Le complexe NuA4 contient aussi la p400 motor ATPase. p400 est membre de la famille Ino80 citée plus haut

qui permet l'échange entre H2A et H2A.Z et une exposition des queues des histones qui sont alors acétylées par Tip60, conduisant à une ouverture de la chromatine. Cette ouverture de la chromatine a pour conséquence le recrutement de protéines nécessaires à la réparation, à commencer par BRCA1, RAD 51 et 53BP1 qui se fixe sur la H4 méthylée (**DIA II.10**, à gauche). On peut donc proposer un scénario selon lequel le changement initial de structure induit par la transition H2A.Z/H2A conduit à un certain nombre de modifications des histones, dont l'acétylation de H4 et une ubiquitination de la chromatine. Il s'ensuit un démasquage de H4K20me2 (ou la méthylation de H4K20) ce qui facilite la fixation de 53BP1 et BRCA1.

Pour finir, nous allons revenir sur l'ouverture initiale de la chromatine qui permet la réparation des DSB. La **DIA II.10** suggère que Tip60 et l'acétylation de H4 constitue l'étape initiale. En réalité, en amont du recrutement de Tip60, la modification la plus précoce que l'on peut observer est la polyADP-ribosylation par PARP1 (**DIA II.10**, à droite) des lysines des histones (H2A/B, H3, H4) qui forment le cœur du nucléosome. Ces polyADP riboses (PAR) sont reconnus par NurD (une déacétylase) et ALC1 (une enzyme qui favorise le glissement du nucléosome), aussi (probablement) par HP1/kap-1 (méthylation de H3K9 par docking de la méthyltransferase). La déacétylation des histones (H2A, H3 et H4) par NurD et la méthylation de H3 sur K9 par KJMT qui se dock sur HP1/kap-1 crée une structure répressive temporaire de la transcription (faible acétylation, forte méthylation) ce qui est important pour que la réparation précède la formation des ARN messagers. Ces structures répressives sont ensuite levées par une dePARylation par la poly(ADP-ribose) glycohydrolase ou PARG. La suite est connue, avec phosphorylation de H2AX, recrutement de NuA4 Tip60, etc.

On ne peut certes retenir tous ces détails et les livres et revues sont là pour ceux que ça intéresse au-delà d'un simple cours, mais ce qui ressort de cette description est que nous avons à la fois un très grand nombre d'acteurs moléculaires locaux mais aussi des



modifications qui touchent de grandes parties de la chromatine (plusieurs millions de bases parfois) qui peuvent être remodelées y compris au niveau de leur structure tridimensionnelle (par exemple via la fixation de 53BP1). Les mutations génétiques qui touchent ponctuellement l'un quelconque des très nombreuses enzymes de réparation (on a vu la complexité du système) peuvent donc avoir des conséquences sur la réparation et être à l'origine de maladies génétiques, nous allons y revenir. Il reste que, même sans mutation des enzymes de réparation, une cassure locale de l'ADN aura des effets locaux (si le domaine est important et la réparation peu fidèle, comme pour les NHEJ), mais aussi des conséquences plus larges via les modifications temporaires (plus ou moins) de la structure même de la chromatine sur une longue distance. Il n'est donc pas étonnant qu'au-delà des mutations ponctuelles qui sont à l'origine de maladies génétiques, la chromatine soit elle-même un modulateur probable du processus de vieillissement.

C'est pourquoi après avoir très rapidement évoqué des maladies génétiques liées à des mutations des enzymes de réparation nous discuterons, assez brièvement aussi, la question de la chromatine comme modulateur du vieillissement ou, si l'on préfère, de la longévité. Une première pathologie est ataxia telangiectasia (A-T) provoquée par la mutation de la kinase ATM dont nous sommes maintenant familiers. Les patients A-T ont un certain nombre de symptômes qui suggèrent un affaiblissement de la réponse DSB (immunodéfiance, stérilité, radiosensitivité, prédisposition au cancer), mais ils développent aussi une neurodégénérescence progressive et une ataxie. La mutation d'ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated pour ATM) à l'origine du syndrome joue essentiellement sur la maintenance neuronale, en particulier au niveau des cellules de Purkinje du cervelet qui présentent une fragilité plus importante que d'autres types cellulaires.

Le modèle murin *Atm*  $-/-$  (le gène encodant ATM est délété) n'a pratiquement aucun phénotype ce qui suggère une fragilité différente selon les espèces. Cela est sans doute exact si on n'y regarde

pas de trop près mais mon attention a été attirée (par un collègue du laboratoire qui lit tout) sur un article de 2011 (Kirshner *et al.*, *J. Mol. Neurosci.* DOI 10.1007/s12031-011-9643-y) qui suggère qu'un dysfonctionnement de la DDR chez le mutant murin *Atm*  $-/-$  conduit à une dégénérescence de la voie nigrostriatale, voie qui dégénère dans la maladie de Parkinson du fait de la mort des neurones dopaminergiques de la substance noire qui projettent sur le striatum (d'où le terme de voie nigrostriatale, car chez *sapiens* les neurones dopaminergiques sont riches en mélanine, donc noirs). Dans cet article les auteurs ont étudié le phénotype de souris avec une inactivation conditionnelle de *Atm*, mais aussi de *Nbs1* (pour ce dernier gène, délétion spécifique dans le cerveau). Comme on s'en souvient (**DIA II.11**), NBS1 fait parti du complexe MRN qui active ATM et se place très en amont dans la cascade de réparation des cassures double brin. Je n'entre pas dans les détails de cet article mais je crois intéressant de constater (**DIA II.12**) une perte sensible des neurones dopaminergique au niveau de la substance noire à la fois dans le mutant *Atm* et dans le mutant *Nsb*. Ici comme dans le cas du cervelet chez l'humain, se pose la question de la sensibilité particulière d'une classe de neurones à des cassures de l'ADN. Évidemment, on pense au ROS qui sont générés à un niveau élevé dans les cellules à forte activité métabolique comme les neurones dopaminergiques, nous y reviendrons.

ATM est activée par les DSB, mais ATR (une sérine-thréonine kinase très proche d'ATM qui phosphoryle la protéine de checkpoint Chk1, et arrête le cycle cellulaire le temps que la réparation ait pu se faire, l'est par la Replication Protein A (RPA) liée à l'ADN simple brin généré par la dégradation par CtIP et EXO1 au niveau des cassures réparées par HR. On s'en souvient RPA et Rad52 protègent ces simples brins contre la dégradation, en amont de l'échange avec RAD51 et de la recherche d'un brin homologue (**DIA II.11**). Les pathologies ATR sont marquées par une importante mort cellulaire au cours du développement neuronal. On le comprend bien puisque la prolifération continue en dépit



des cassures (le cycle cellulaire n'est pas arrêté en l'absence d'ATR active). On comprend donc que le syndrome de Seckel (mutation d'ATR) soit marqué par des problèmes de croissance, de microcéphalie et de retard mental. On note une faible sensibilité aux radiations et peu d'atteintes du système immunitaires, ce qui est un peu surprenant (encore que la génération des anticorps par recombinaison des régions variables implique plus la voie NHEJ que la voie HR). Dans un modèle murin porteur d'une mutation humaine (ATR humanisée), on constate une microcéphalie (souris à tête d'oiseau) et des pertes neuronales sévères très largement réparties (hippocampe, cervelet, cortex). Il faudrait sans doute réfléchir à ce qui se passe au niveau des cellules souches neurales si le système ATR vient à souffrir chez l'adulte.

Des mutations peuvent aussi affecter non pas ATM ou ATR mais une protéine du complexe MRN qui interagit avec ATM ou ATR. Ce complexe protéique (MRE1, RAD50 et NBS1 d'où RMN) est important pour maintenir les deux extrémités cassées en contact et promouvoir la suite des opérations de réparation (**DIA II.11**). Des mutations hypomorphes (qui réduisent l'activité mais ne la supprime pas totalement) dans l'une des trois protéines du complexe ont été trouvées dans un spectre de maladies dont le Nijmegen breakage syndrom (NBS) et des désordres qui évoquent le NBS ou l'ataxia telangiectasia (NBS-like disorders et AT-like disorders). Ce sont toujours les mêmes phénotypes de microcéphalie, immunodéficience, radiosensibilité et prédisposition aux cancers. Chez la souris nous venons de voir que la mutation cerveau spécifique de *Nbs1* induit une mort des neurones dopaminergiques (**DIA II.12**).

Avant de passer comme je l'ai promis aux ARN non codants, en particulier au miRNAs, je vais développer brièvement, à l'aide de l'article de O' Sullivan et Karlseder (*TIBS* 37: 466-476), la question du rôle de la chromatine comme élément modulateur de la longévité. Les auteurs le signalent en ouverture, une des caractéristiques du vieillissement est la

perte des systèmes de régulation homéostatiques qui permettent de compenser les lésions créées par des doses légères d'agents toxiques, que ces agents soient extrinsèques (ultraviolets, gamma-irradiation, nutrition inappropriée) ou intrinsèques (ROS, raccourcissement des télomères, erreurs dans la biosynthèse et la dégradation des protéines, erreurs dans la transcription et la réplication conduisant à des lésions de l'ADN, etc.).

Comme toutes les structures du vivant, la chromatine est soumise à ces stress, ce qui comporte des conséquences quant à sa structure et sa fonction aussi comme cela est résumé dans la **DIA II.13** où sont rappelés les acteurs essentiels du stress dont l'action augmente avec l'âge (ROS, lésions de l'ADN, stress réplcatif, bruit transcriptionnel, altération de la chromatine), et les processus régulateurs qui eux-mêmes diminuent avec l'âge (métabolisme, longueur des télomères, hétérochromatine et histones, modificateurs de la chromatine). Sur cette même **DIA II.13** je vous rappelle que la structure élémentaire de la chromatine est le nucléosome et ses 4 histones « de base » et que la présence ou non de l'histone H1 (dans la région linker) mais aussi d'autres histones « spéciales » joue un rôle dans la transition de la chromatine entre états différemment structurés. Ces transitions ont un rôle important dans la mesure où, nous venons de le voir (**DIA II.9**), elles donnent accès ou non à l'ADN avec toutes sortes de conséquences sur la transcription, la réparation, les modifications épigénétiques (méthylation des CpG par exemple), les autres modifications, plus ou moins heureuses (alkylation, déamination, oxydation) des bases.

Quand nous parlons des variations dans les histones, nous devons ajouter les modifications des histones classiques (le cœur du nucléosome), leur acétylation ou déacétylation, leur méthylation sur différentes lysines, leur ubiquitination, leur phosphorylation sur les sérines et thréonines. Bref, nous sommes dans un système qui est tout sauf statique. Pour aussi peu locale que soit la chromatine (comparée à un gène), elle reste néanmoins locale et



cellulaire. Ce qui veut dire que son implication dans la longévité entraîne inévitablement une inégalité. Toutes les cellules ou tous les organes ne vieillissent pas à la même vitesse – non plus que tous les individus –, même si un contrôle supérieur, par exemple des signaux hormonaux, font que tous les niveaux d'intégration sont sujets au/du vieillissement.

Cette possible hétérogénéité, entre cellules, des modifications épigénétiques (la structure de la chromatine détermine en partie quels gènes sont exprimables) liées à l'âge explique pourquoi le vieillissement se traduit souvent par une variation stochastique de gènes exprimés. La **DIA II.14** donne une liste de modifications des histones et des variations dans leur expression dont il a été proposé qu'elles sont liées à l'âge, et indique à la fois leur fonction et les états pathologiques associés, dont le vieillissement normal qui n'est pourtant pas une pathologie. Parmi les facteurs impliqués, certains nous sont déjà familiers, comme SWI, ATM, ATR, HDAC1 ou TIP60. D'autres vont se trouver rapidement sur notre route, tout particulièrement les sirtuines, une classe de lysine déacétylases d'abord identifiées chez la levure et dont il semble que les orthologues (homologues à travers l'évolution) mammaliens SIRT2 et SIRT6 jouent un rôle important dans la réponse aux lésions de l'ADN et le stress cellulaire. Un article paru en août dernier (Toiber *et al.*, *Molecular Cell* 51: 454-468, 2013) (**DIA II.15**) démontre que SIRT6 est une protéine d'échafaudage dans la DDR et qu'une fois recrutée au niveau des DSB elle recrute elle-même SNF2H, une ATPase de la famille ISWI dont nous avons parlé un peu plus tôt, ce qui fournit l'énergie nécessaire au remodelage de la chromatine donnant accès au site de lésion et permettant la réparation.

J'y reviendrai quand nous parlerons des sirtuines et des effets que certains pensent bénéfiques de la restriction calorique (elle l'est chez les invertébrés et les petits mammifères mais ses effets chez les primates sont controversés). Au-delà de ces acteurs qui vont revenir on peut se poser la question du vieillissement de la structure même de la

chromatine. On constate au cours du vieillissement une réorganisation des nucléosomes en particulier au niveau de l'hétérochromatine, pour une grande part inactive (normalement) sur le plan transcriptionnel. Cette inactivité est due à un enrichissement de l'hétérochromatine en H3K9me3 et HP1 (hétérochromatin protein 1). L'hétérochromatine joue aussi un rôle important dans la répression de l'expression des éléments transposables dont je vous rappelle qu'ils introduisent des mutations (insertions) et peuvent générer des cassures de l'ADN (**DIA II.16**). Il reste que tout cela relève encore, très largement, du domaine de l'hypothèse. Une fois encore, j'espère que nous pourrons revenir sur cet aspect très important à mes yeux de la régulation de la stabilité du génome et de son intégrité via la répression de l'expression des éléments transposables. Il est en effet envisageable que le vieillissement associé à la relaxation de la chromatine passe par les dommages créés par l'expression illégitime d'éléments transposables.

Un exemple de la façon dont la dérégulation de l'hétérochromatine peut provoquer le vieillissement est fourni par le syndrome HGPS (Hutchison-Gilford Progeria Syndrom) qui se manifeste par un vieillissement accéléré et une mort précoce (avant la 2<sup>e</sup> décennie) liée, le plus souvent, à une défaillance cardiaque. HGPS est causé par une forte détérioration de l'enveloppe nucléaire due à une mutation (C1824T) dans le gène de la lamine A (LMNA). Je reviendrai dans deux semaines sur les lamines qui sont des protéines nucléaires de la classe des filaments intermédiaire avec un rôle structurel (elles participent au maintien de la structure nucléaire) mais aussi un rôle de signalisation.

En attendant que je développe ce thème, sachez que cette mutation cytidine donne thymidine active un site cryptique d'épissage et produit un ARN messager tronqué de 150 bases et une protéine tronquée de 50 acides aminés en position C-terminale. Cette protéine raccourcie, appelée Progerin, n'a pas les propriétés structurantes de la protéine normale (d'où des noyaux qui semblent faire des



bulles). Entre autres défauts, les cellules HGPS en culture présentent un grand nombre de lésions de l'ADN et une perte des structures caractéristiques de l'hétérochromatine, en particulier une baisse des histones triméthylées H3K9me3 et H3K27me3, plus un fort niveau d'acétylation des histones et une baisse de HP1. HGPS est donc un exemple intéressant de la façon dont la dérégulation de l'hétérochromatine peut promouvoir le vieillissement. Mais ce qui est surtout intéressant est que la Progerin a été retrouvée dans les tissus de personnes âgées normales qui ont aussi une baisse de H3K9me3 et HP1 au niveau de l'hétérochromatine. Évidemment le lien causal n'est pas démontré mais disons que l'hypothèse selon laquelle un « relâchement » de l'hétérochromatine serait associé au vieillissement (ou le contraire) est très raisonnable.

Ce relâchement de l'hétérochromatine s'inscrit dans l'idée plus générale d'une très grande fluidité nucléaire (en tout cas d'une possibilité de passer à un état fluide). À ce niveau comme à tous les niveaux du vivant, la règle est le mouvement plutôt que la rigidité et l'immobilité. Pour le noyau, j'y ai fait allusion quand, à propos de la réparation par recombinaison homologue, nous suggérions que le simple brin protégé par Rad51 devait aller à la recherche d'un brin complémentaire dans la chromatide sœur, ce qui implique une grande capacité de mouvement. Dans un article récent, Susan Gasser et ses collègues (Seeber *et al.*, *Current Opinion in Genetics & Development*, 23: 174-184, 2013) s'intéressent à ce qu'ils appellent les « remodeleurs » du nucléosome dans le cas de la formation de DSB. Ils rappellent que la famille SWI/SNF d'ATPase joue un rôle important dans le recrutement de γH2AX et l'acétylation des histones aux sites DSB (ce qui entraîne une relaxation de la chromatine). Mais surtout ils rappellent qu'après résection (dans le cas de la réparation par recombinaison homologue) et recrutement de Rad51 sur le simple brin, cette même protéine recrute Rad54 (**DIA II.17**) et que ces deux protéines (Rad51 et Rad54) sont nécessaires à la mobilité du simple brin à la recherche d'un homologue à copier. La

perte de l'une ou l'autre de ces protéines inhibe complètement la mobilité de la chromatine induite par le DSB. Même si le mécanisme impliqué (perte d'ancrage, nécessité de l'activité ATPase (moteur moléculaire ?) n'est pas clair à ce jour, la nécessité d'une mobilité est une certitude. ■