



21 octobre 2013

Structure et plasticité de la chromatine

Nous allons débiter ce cours en revenant sur certains des aspects déjà évoqués, à travers la question du rôle régulateur des ARN non codants (ncRNAs) dans la réparation de l'ADN. Je le ferai en insistant plus sur NHEJ puisque la longévité neuronale s'adresse d'abord aux cellules post-mitotiques (la HR aura parfois son mot à dire cependant). La **DIA III.2** a simplement pour but de vous remettre en mémoire les deux voies de réparation des cassures double brin, la voie NHEJ (à gauche) et la voie HR (à droite). Pour la NHEJ, la séquence des événements est maintenant familière avec Ku70 et Ku80 qui viennent couvrir les extrémités libérées par la cassure et mobilisent les différentes enzymes de phosphorylation dont les DNA-PKs qui elles-mêmes phosphorylent Artémis conduisant à la génération d'extrémités qui se recouvrent puis à la réparation par l'action conjuguée des DNA-polymérase qui comblent les trous et des ligases qui lient le tout.

Je n'ai pas vraiment besoin de m'étendre trop sur les ARN non codants, puisque nous en avons souvent parlé au cours des années précédentes. Pour les nouveaux venus cependant, où ceux qui auraient oublié, je rappellerai que les domaines régulateurs (qui ne codent pas pour des protéines) comptent pour environ 98 % du génome et que les ARN non codants sont les produits les plus nombreux de ces régions régulatrices. Ces ARN sont transcrits à partir de l'ADN mais ne codent pas pour des protéines, désobéissant donc au schéma classique, mais par trop simplificateur et dogmatique, de la séquence temporelle et unidirectionnelle ADN-ARN-Protéine (je rappelle que l'on peut aussi passer de l'ARN à l'ADN comme nous l'avons vu à propos de la rétrotransposition et comme nous le retrouverons quand nous parlerons des télomères le 4 novembre de cette année. Ces ARN non codants ont de nombreuses fonctions biologiques de régulation de l'expression génétique qui s'exercent à tous les niveaux : transcription (ADN donne ARN), épissage (un même transcrit primaire peut donner naissance à plusieurs mRNAs distincts),

transport des ARN (la traduction des ARN en protéines peut se faire localement après transport de l'ARN, c'est en particulier le cas des ARN messagers périmitochondriaux ou des ARN présents dans la synapse et « en attente »). À quoi il faut ajouter une fonction de régulation de la stabilité des ARN messagers et de leur traduction en protéines. Ces fonctions régulatrices peuvent être, ou non, associées à des mécanismes de régulation de la stabilité des génomes, comme dans le cas des piRNA qui répriment la transcription des rétrotransposons. Je n'y reviens pas pour l'instant puisque là encore nous en avons souvent parlé et que nous y reviendrons dans ce même cours, mais un peu plus tard.

Les microRNAs ou miRNA, constituent une classe importante d'ARN non codants. Il s'agit de régulateurs post-transcriptionnels et on pense aujourd'hui que plus de 60 % des ARN messagers (mRNAs) sont des cibles des miRNAs, lesquels régulent leur stabilité (en fait leur dégradation) et leur traduction en protéines, le plus souvent en s'associant à l'extrémité 3' terminale des mRNAs (3'UTR). Cela est décrit dans la **DIA III.2** en haut à droite où l'on voit que le complexe argonaute-miRNA (Argonaute est une famille de protéines) se lie à l'extrémité 3' de l'ARN messager et à une double action sur l'assemblage des ribosomes (appareil de traduction des mRNA en protéines) en 5' (formation du complexe d'initiation de la traduction) ou leur stabilité pendant la lecture du message.

Une association parfaite favorise la dégradation quand une association imparfaite favorise plutôt la régulation de la traduction mais ne touche pas à la stabilité du message. Connaissant la séquence d'un miRNA on peut donc identifier ses cibles potentielles (ayant une séquence complémentaire d'appariement plus ou moins parfait en 3'UTR). Comme l'indique la **DIA III.3**, les miRNAs sont générés à partir de précurseurs plus longs les Pri-miRNA transcrits grâce à la RNA polymérase II (ou III) puis maturés à travers un mécanisme impliquant les deux RNases III Drosha et Dicer qui agissent pour la première au niveau du noyau et pour la seconde



au niveau du cytoplasme, générant un ARN double brin (dsRNA) de 20 à 25 nucléotides lié à une protéine de la famille Argonaute.

Incidemment cette figure est prise d'un article portant sur l'existence de miRNA extracellulaires et suggérant donc la possibilité d'une signalisation intercellulaire par transfert de miRNA. On peut supposer, si cette hypothèse est vérifiée, qu'une régulation de la longévité pourrait faire intervenir un mécanisme dépassant le cadre du seul groupe de cellules où cette régulation est initialement activée, une sorte de vieillissement communicatif (ou de résistance au vieillissement tout aussi bien). Ce miRNA est alors incorporé dans le complexe RISC (RNA-Induced Silencing Complex) qui comprend des protéines Argonautes et catalysent l'interaction entre le miRNA et ses mRNAs cibles.

Pour en revenir à la sécrétion possible, probable de mon point de vue, les auteurs proposent plusieurs mécanismes. Parmi ces mécanismes j'en souligne deux qui sont particulièrement intéressants, la sécrétion atypique du complexe Argonaute/miRNA (ou de tout autre complexe impliquant des protéines autre que les protéines Argonautes classiques et liant des miRNA tout aussi bien) ou l'épulsion d'un exosome (**DIA III.4**). Dans ce cas on voit qu'une entité cytoplasmique peut rejoindre le cytoplasme d'une autre cellule après fusion de l'exosome (suivre le trajet du petit bonhomme rouge).

Pour en revenir aux DSB, constatons que de nombreuses protéines impliquées dans les DSB sont directement associées à des ncRNAs qui semblent donc jouer un rôle dans la réparation, même si ce rôle demande à être étudié et compris. C'est en particulier le cas de p53BP1, du complexe Ku et de BRCA1 (breast cancer type I susceptibility) qui se lient à des ARN non codant. Je rappelle d'ailleurs que ce n'est pas la première fois que nous constatons que la liaison à l'ADN peut impliquer un complexe ARN-protéine puisque les complexes polycomb et trithorax qui réprime ou active épigénétiquement la transcription sont structurés par

de tels ARN non codants. Je souligne simplement que le recrutement d'ARN non codants au niveau des sites de coupure influence probablement la réparation (**DIA III.2**). Par ailleurs les DSB eux-mêmes peuvent réguler l'expression de ncRNAs. Ces nombreux points sont abordés, sous la forme d'un article d'opinion, par Chowdhury *et al.*, *Nature Reviews MCB*, 14: 181-189, 2013. On trouvera des compléments d'information dans Sharma & Misteli, *FEBS Lett.* 587: 1832-1839, 2013 et Wan *et al.*, *TIBS* 36: 478-484, 2011 (les références sont dans les diapositives). Dans ce contexte, il est bien démontré que les lésions de l'ADN induisent l'expression de miRNAs (une sous classe d'ARN non codants), mais ces changements d'expression dépendent du type de dommage et de l'intensité du dommage. Indépendamment de cette variabilité, il semble bien que l'initiation de la DDR est régulée, en partie du moins, par des modifications après DD de l'expression – en hausse ou en baisse – de miRNAs spécifiques.

Une liste de protéines impliquées dans la DDR et des miRNAs qui régulent leur expression est montrée dans la **DIA III.5**, incluant pour les plus « populaires » ATM, H2AX, RAD52, BRCA1 et p53 qui n'ont plus de secrets pour nous. ATM joue un rôle important dans cette activation des miRNAs et 71 miRNAs dépendent d'ATM pour leur expression à la hausse après DD (addition de la drogue radiomimétique neocarzinostatin (NCS) à des fibroblastes embryonnaires de souris (MEF)). L'action d'ATM n'est pas transcriptionnelle, la protéine activée par la cassure de l'ADN venant phosphoryler KSRP, une protéine du complexe Drosha (aussi du complexe Dicer en fait) et augmentant par là sa capacité de recrutement des précurseurs de miRNA (**DIA III.6**). On voit dans cette même figure que la MAP-kinase ERK est aussi phosphorylée en réponse à DD et phosphoryle TRBP (une RNA-binding protein de Dicer), contribuant ainsi à la génération de miRNAs via un processus non transcriptionnel. Il est évident et nous allons y venir dans un instant que cela n'a de sens physiologique que si les miRNA régulent eux-mêmes l'expression de protéines impliquées dans la réparation de l'ADN ce qui est indiqué par les flèches activatrices et inhibitrices en retour (**DIA III.6**).



Pour la HR, BRAC1 se fixe à certains précurseur de miRNAs, les pri-miRNAs qui sont les produits de transcription primaire avant toute maturation, et interagit avec Drosha et d'autres protéines du complexe, ce qui facilite la maturation des miRNAs (**DIA III.6** à gauche). BRAC1 a aussi un rôle répresseur de la transcription de certains miRNAs (dont miR-155), via une interaction avec HDAC2 et la déacétylation des histones H2A et H3 au niveau du promoteur de ce miRNA (**DIA III.6**, panel de droite). Je vous rappelle en effet que la déacétylation des histones joue un rôle répresseur sur la transcription. À l'inverse on peut avoir une activation de la transcription induite par le DD (mir-21) via l'activation de NF-kB. Bref, pour les auteurs de cet article, une part importante de la réponse DSB pourrait être prise en charge à travers la régulation des miRNAs, soit leur augmentation (répression des régulateurs négatifs de la réparation) soit par leur diminution (augmentation des régulateurs positifs). Cet effet régulateur important sur les deux types de réparation (NHEJ et HR) est illustré dans la **DIA III.7** où sont listés certains miRNA qui antagonisent soit la réponse NHEJ (gauche) soit la HR (droite).

On peut développer en reprenant la distinction entre « sensor » (sentinelles) et « mediator » (médiateurs) d'une part et « effector » (effecteurs) de l'autre. Les protéines de la première catégorie sont activées immédiatement par la lésion de l'ADN. Parmi elles on range, je le rappelle (**DIA III.8**), les complexes MRN (MRE-11, RAD50, NBS1) et Ku70-Ku80, plus 53BP1. Les mRNAs encodant les DSB « sensors » ont des parties non codantes 3' terminales très longues (par exemple 1101 bases pour Ku80 ou 2246 pour NBS1 (sous unité de MRN) ce qui laisse beaucoup de place pour l'appariement des miRNAs qui induit un blocage de la traduction (parfois une activation) voire une dégradation de l'ARN messager (partie droite de la **DIA III.8**). Je rappelle en effet que l'activité des miRNA exige une hybridation avec la région 3' terminale de l'ARN messager.

Ces considérations doivent attirer notre attention sur les effets de « dose ». En effet, des modifications mesurées d'une protéine, ici d'un sensor/mediator, telles qu'elles peuvent être induites via une régulation post-transcriptionnelle reposant sur l'intervention d'un miRNA, peuvent avoir des effets importants sur la DDR. Cette régulation a des effets contradictoires (bénéfiques ou maléfiques) selon les systèmes puisque, pour une tumeur, nous aurons intérêt à ce que la réparation ne se fasse pas ou mal et que la cellule entre en apoptose, alors que pour un neurone, sa survie est préférable sauf si son fonctionnement devient lui-même par trop délétère, en tout cas plus délétère que sa disparition, ce qui peut arriver.

Les médiateurs (après les sentinelles) ont pour fonction importante la régulation post-translationnelle (phosphorylation très certainement) de leurs effecteurs et leur recrutement sur les sites de réparation. Les kinases ATM ou DNA-PK qui ont ce type d'activité sont fortement régulées par les miRNAs comme cela est illustré sur la **DIA III.7** pour miR-18a, 100, 101 et 421. Sur cette même **DIA III.7** on voit aussi que BRAC1 est cible de plusieurs miRNAs et BRAC2 de miR-1245. On ne voit pas, en revanche que H2AX est une cible de miR-24 et miR-138.

Nous allons continuer sur le thème des ARN non codants en faisant l'impasse sur nombre d'entre eux et en nous concentrant pour un instant sur les piRNA dont nous savons depuis les deux dernières années qu'ils régulent l'expression des rétrotransposons et peuvent donc, de ce fait, réguler la formation de cassures double brin. Un bref rappel du cours de l'année 2011 va vous remettre en mémoire ce que sont les éléments transposables. La **DIA III.9** vous rappelle tout d'abord que les éléments transposables constituent de l'ordre de 45 % du génome humain. Ces séquences, distribuées en sous-types distincts, quand elles sont mobilisées peuvent sauter d'une région du génome à une autre et induire des modifications irréversibles du génome. La **DIA III.10** résume à l'extrême un



certain nombre de données. D'abord (en haut à gauche) le fait que cette mobilisation, découverte par Barbara McClintock qui s'intéressait à la variéation des pigments des grains de l'épi de maïs, se produit sous l'effet de l'environnement et qu'elle conduit à des modifications irréversibles, nous l'avons dit, de la structure de la chromatine.

En bas à gauche, il est illustré que les transposons de la famille des LINEs sont transcrits sous la forme d'un ARN polycistronique qui code pour deux protéines ORF1 et ORF2. ORF1 a une fonction packaging protégeant le transcrit et permet le transport de cette particule dans le noyau. ORF2 porte deux fonctions, une fonction de transcription réverse (je refais un ADN à partir de l'ARN) et une fonction endonucléase qui coupe un brin d'ADN. À la suite de ces deux événements le nouveau fragment d'ADN est inséré au site de coupure, ce qui amplifie l'élément transposable et introduit éventuellement une mutation. En haut à droite est illustré le fait qu'ORF1 et ORF2 peuvent aider à la mobilisation d'une autre classe d'éléments transposables, les SINEs qui quand ils sont transcrits ont besoin de ORF1 et ORF2 des LINEs pour se réintégrer dans le génome, agissant ainsi en parasites des LINEs. Pour compléter nos informations sur les LINEs, ils sont pour la plupart fossilisés, ce qui veut dire que des mutations les empêchent de sauter, même si leur transcription, sans réinsertion, peut avoir une action régulatrice de l'expression génétique (ils agissent alors comme de longs ARN non codants, dont nous connaissons la fonction régulatrice de la transcription. On estime le nombre de LINEs sauteurs à 100 chez *sapiens* et 3000 chez la souris. Finalement, je rappelle que la transcription des LINEs est sous le contrôle répresseur du complexe Piwi-piRNA, PIWI étant une protéine qui se fixe un petit ARN double brin non codant piRNA (en bas à droite) et réprime la transcription des LINEs en se fixant à HP1 (une protéine de l'hétérochromatine – région peu active de la chromatine – sur laquelle je reviendrai la semaine prochaine).

Enfin en bas à droite nous avons les informations les plus importantes agrandies dans la **DIA III.11** :
(i) le complexe Piwi-piRNA qui est maintenu actif via une phosphorylation par la présence de la protéine de choc thermique HSP90 a une activité cytoplasmique de type dégradation de l'ARN et inhibition de la traduction, exactement comme un miRNA,
(ii) ce même complexe dans le noyau interagit avec des protéines de la chromatine (HP1 en particulier) et exerce un effet répresseur, tout particulièrement sur l'expression des LINEs (je viens de le rappeler), répression qui passe par la méthylation de l'histone H3 (sur la lysine en position 9 de sa queue C-terminale) et celle des CpG dans l'ADN. Cette liaison à HP1 est particulièrement intéressante car HP1 fait le lien entre un récepteur de la lamine B et l'ADN de l'hétérochromatine. Je ne vous demande pas de comprendre pour l'instant, mais de garder dans un coin de votre mémoire jusqu'à la semaine prochaine, que les LINEs sont normalement silencieux du fait de leur localisation dans l'hétérochromatine, région peu active sur le plan transcriptionnel et localisée sur les pourtour du noyau essentiellement, donc à proximité des lamines. De nouveau, c'est du chinois aujourd'hui mais la semaine prochaine nous aurons appris le chinois.

Pour ce dernier point essentiel pour notre réflexion sur la longévité cérébrale (même si vous ne voyez peut-être pas le lien à ce stade), cela signifie que les piRNAs liés à PIWI (famille Argonaute) empêche la transposition, mais surtout, et à l'inverse, qu'une inactivation du complexe PIWI/piRNA libère l'expression des LINEs au niveau de l'hétérochromatine avec toutes les conséquences que cela peut avoir sur l'expression génétique (les ARN des LINEs régulent les méthylation du génome) et la stabilité des génomes, à cause des insertions qui accompagnent la rétrotransposition. Je ne reviens pas ici sur les effets positifs sur le plan adaptatif et évolutif car nous en avons parlé abondamment il y a deux ans. Nous allons plutôt discuter des effets négatifs en rappelant que l'inactivation de Piwi et donc la dérégulation de la transcription des éléments mobiles est induite par les stress, en particulier par le stress oxydatif.



Dans leur revue récente, Peng & Lin (*Current opinion in Cell Biology*, 25:190-194, 2013) rappellent que de nombreux travaux, sur le modèle de la *Drosophile* essentiellement, ont établi que des mutations de gènes impliqués dans la biogénèse des piRNA conduisent à une augmentation de la transposition et à des lésions de l'ADN dans les cellules germinales (il y a seulement deux ou trois ans, tous les travaux sur la rétrotransposition étaient concentrés sur les cellules germinales et il paraissait impossible que les LINEs soient exprimés dans les cellules somatiques). Mais il est aussi bien démontré que Piwi et son homologue Aubergine ont un rôle important dans la régulation épigénétique et que les complexes Piwi-piRNA jouent un rôle dans le « silencing » transcriptionnel et sont requis pour la formation de l'hétérochromatine (interaction non seulement avec HP1 mais aussi avec Polycomb qui est un répresseur épigénétique). Par ailleurs, Les orthologues de Piwi chez la souris (Mili et Miwi2) régulent la méthylation de l'ADN. Bref, les données convergent pour suggérer une répression de la transcription et un maintien d'une hétérochromatine silencieuse dans la lignée germinale (mais pas seulement comme vous l'avez sans doute compris).

Comme neurobiologistes nous interrogeant sur la longévité cérébrale, nous sommes plus intéressés ici par cette régulation somatique récemment découverte que par ce qui se passe dans les cellules germinales. Des données récentes suggèrent que les piRNAs régulent l'expression de CREB2 dans les neurones d'Aplysie avec un effet sur la mémoire à long terme, découverte du groupe d'Eric Kandel que je vais détailler dans un instant. Ces données sont à mettre en regard de la forte concentration du système nerveux (par exemple 75 000 séquences dans l'hippocampe) en structure piRNA-like (une uridine en 5' et une adénosine en position 10, plus une méthylation en position 3'). Même si ce nombre global est de 10 à 100 fois inférieur à celui des transcrits piRNA dans les gonades, cela n'empêche pas de nombreux auteurs de s'intéresser au lien possible entre LINEs, cassures de l'ADN et vieillissement du système nerveux.

Je ne vais pas me lancer dans la description détaillée des articles qui sont parus sur ce thème au cours des dernières années et dont un échantillon représentatif est rappelé sur la **DIA III.12**. Les trois couleurs soulignent trois aspects différents, même s'ils se recouvrent. Un cadre rouge indique que les éléments transposables ne sont pas exprimés seulement dans les lignées germinales mais aussi dans la lignée somatique et qu'ils y jouent probablement un rôle physiologique. En vert est indiqué l'aspect délétère de l'expression incontrôlée de ces éléments, tout particulièrement l'induction de cassures double brin. Enfin en bleu nous avons trois articles qui indiquent que des agents délétères, dont les superoxydes, induisent la rétrotransposition.

Je vais insister un peu en partant de la revue de St. Laurent III *et al.* (*Mechanisms of Ageing and Development*, 131: 299-305, 2010) qui replace la question des éléments transposables dans le contexte de la longévité. Les auteurs rappellent que le vieillissement constitue un facteur de risque pour les maladies les plus graves et que cela est en partie dû à l'accumulation des lésions de l'ADN et, aussi, des altérations plus globales de la structure de la chromatine, les deux choses étant probablement liées puisque qu'une altération globale de la chromatine induit des transcriptions illégitimes, dont très probablement, celle des rétrotransposons.

C'est particulièrement intéressant quand on considère, et j'aurais sans doute dû le préciser plus tôt, que nombre des maladies neurodégénératives, Alzheimer, Parkinson ou Huntington, même quand elles sont d'origine génétique pure (ce qui est toujours vrai pour la maladie de Huntington, mais reconnu pour 5 % seulement des cas d'Alzheimer et de Parkinson), ne se déclare pas avant un âge relativement avancé, ce qui confirme que le vieillissement est un véritable facteur de risque. Ces maladies, je l'ai souvent dit ici, n'existent pas dans les pays où l'espérance de vie n'excède pas 50 ans, ce qu'on eut considéré comme une espérance normale dans nos pays développés, il y a seulement une centaine d'années.



Comme nous l'avons entraperçu au début du cours (**DIA III.13**), plusieurs causes de lésions ont été identifiées, comme l'excès calorique ou le stress oxydatif. Mais ce qui semble acquis est que toutes ces causes, aussi diverses soient-elles, convergent vers une altération de l'ADN et un affaiblissement des systèmes de réparation, ce qui – au passage – justifie le temps que nous y passons. Parmi les éléments endogènes qui altèrent l'intégrité des génomes, pouvons-nous inclure les rétroéléments ? Telle est la question posée par ces auteurs. Les SINEs sont mobilisés par les LINEs, ou plutôt – je viens de le rappeler – en sont les parasites puisqu'ils utilisent ORF1 en ORF2 encodés par les LINEs. De ce fait, je tacherai de m'en tenir aux LINEs tout en vous demandant de garder en tête que LINEs et SINEs sont liés. Pour ce qui est des humains, on a dénombré environ 500 000 éléments LINEs dans le génome mais, je le répète, la plupart sont fossilisés et seule une centaine sont encore actifs (3000 chez la souris).

La **DIA III.14** dans sa partie gauche décrit assez bien le mécanisme de rétrotransposition. Il y a d'abord une reconnaissance du site d'insertion par le transcrite LINE et nous ne savons pas à ce jour quels sont les facteurs qui déterminent ce site sinon la séquence 5'TTTTAA3' (en vert dans la figure), ou même s'il y a des sites préférentiels d'insertion (des hots spots). Puis l'endonucléase encodée par ORF2 fait une première coupure entre le T et le A et l'ARN du LINE (L1) s'hybride par sa queue 3'AAA à la séquence TTTT ainsi dégagée. La reverse transcriptase de ORF2 permet alors une élongation de l'ADN qui copie le brin ARN de L1 (réverse transcription, en bleu dans la figure). Le DNA néosynthétisé est alors copié (formation d'un brin complémentaire, donc d'un double brin) et l'insertion de ce double brin nécessite une deuxième cassure et une ligation.

Le schéma de droite sur la même **DIA III.14** montre que peut être transcrite soit le full length (FL) messenger bicistronique encodant ORF1 et ORF2, soit seulement ORF2. Dans les deux cas, la transcription de ORF2 est suffisante pour générer des cassures double brin (ORF2 est une endonucléase

qui s'accumulent dans le génome, sauf réparation. Dans les deux cas, cela peut induire des modifications de la chromatine et des changements d'expression génétique, mais aussi des mutations associées à la réparation des DSB induits par l'insertion en particulier si c'est le système NHEJ (infidèle) qui est utilisé ce qui est toujours le cas dans les cellules post-mitotiques et parfois le cas dans les cellules en division. Et même s'il y a moins d'erreurs quand les cellules en division utilisent la recombinaison homologue, le fait d'avoir des séquences identiques répétées dans le génome induit des appariements illégitimes entre régions à distance (le génome est très mobile, rappelez-vous) et introduit des variations en nombre de copies de certains gènes (délétions ou copies supplémentaires), source importante de désordres physiologiques comme s'en souviennent sans doute ceux qui ont assisté aux cours des deux années précédentes.

Dans ces conditions, on comprend l'abondance des mécanismes qui ont été sélectionnés et ont pour effet de contrôler l'expression des éléments transposables (**DIA III.15**). Tout d'abord la régulation épigénétique de leur expression et la formation de l'hétérochromatine. La méthylation de l'ADN joue un rôle important et la mesure de cette méthylation au niveau des promoteurs de L1 révèle entre 20 et 100 % de méthylation sur des CpG. De façon attendue, cette régulation épigénétique peut s'affaiblir avec l'âge, par exemple à travers l'oxydation des CpG. Un autre mécanisme de régulation est la polyadénylation prématurée à l'intérieur d'un transcrite codant (ORF2 pour le cas présenté dans la **DIA III.15**). Cette polyadénylation prématurée fait que les enzymes encodées par ORF2 (endonucléase et reverse transcriptase) ne sont pas fonctionnelles empêchant la « prolifération » du transposon (mais la partie transcrite peut avoir une activité régulatrice de l'expression génétique, je le rappelle).

À ces deux mécanismes de contrôle on peut ajouter les antisens endogènes et l'interférence ARN. La même **DIA III.15** illustre comment l'hybridation entre le sens et l'antisens génère des ARN interférentiels,



des miRNA et des piRNA qui ont une activité répressive dont une des modalités, représentée ici par la flèche verticale en retour, est de renforcer la méthylation des promoteurs des LINEs. Ces différents mécanismes sont particulièrement actifs dans les cellules adultes. D'ailleurs, comme je l'ai indiqué plus haut, le consensus prévalait d'une rétrotransposition essentiellement active au cours de l'embryogenèse, vision qui a peu à peu évolué puisque l'expression de L1 est admise chez l'adulte, y compris dans des tissus post-mitotiques (en G0). Mais il reste que cette expression se fait en réponse au stress cellulaire, en particulier en réponse à l'exposition à de nombreux agents qui provoquent des lésions de l'ADN. Une explication possible à ce phénomène paradoxal est que la fonction initiale de la transposition serait d'inventer des solutions génétiques à une situation qui met l'organisme ou la cellule en danger. Je vous renvoie une fois de plus aux cours des années précédentes, mis nous pouvons en discuter si vous vous décidez à poser des questions.

Il existe donc une contradiction apparente entre l'adaptabilité que permettent les éléments transposables pour l'espèce et le danger qu'ils représentent pour la survie des individus. On ne peut donc entièrement éliminer l'hypothèse que la longévité humaine est le résultat d'une répression de la transposition (100 LINEs actifs contre 3000 chez la souris) et la fossilisation progressive des éléments transposables. Un schéma amusant est proposé à droite dans la **DIA III.15** où il est illustré (hypothétiquement) que le stress induit l'expression de L1 avec un choix entre l'adaptation par variation génétique (au niveau des cellules germinales ou des cellules souches somatiques) et sénescence après lésion de l'ADN. En tout cas, il est certain que, chez *sapiens*, une longévité prolongée est incompatible avec une forte expression des rétrotransposons, tout particulièrement dans des cellules adultes, voire en G0.

Avant de clore sur cette histoire de transposition, je voudrais vous décrire le contenu de deux articles. Le premier article, du groupe de Kandel (Rajasethupathy *et al.*, *Cell* 149: 693-707, 2012),

démontre une activité physiologique de la transposition et celui de Li *et al.* (*Nature Neurosci.* 16: 529-532, 2013) démontre, à l'inverse, une activité pathologique de cette même transposition. L'article de Kandel (qui donnera une conférence ici même le 18 décembre 2013) part d'une question que nous ne cessons de nous poser depuis l'ouverture de la chaire des Processus morphogénétiques qui est celle de la contradiction, forcément apparente même si non résolue, entre le turnover rapide des structures biologiques, en particulier les ARN et les protéines, et une certaine forme de stabilité au niveau de notre mémoire. Les auteurs rappellent trois hypothèses, celle des prions, ces protéines dont le changement de conformation « infectieux » transfère une information aux nouvelles protéines en leur imposant ce changement de forme, celle des boucles enzymatiques de feedback positif qui modifient les nouvelles protéines et reproduisent les modifications acquises (phosphorylation, ubiquitination, etc.) et enfin les modifications épigénétiques qui, au niveau du génome, permettent de stabiliser une information, par exemple sous la forme d'une méthylation de l'ADN.

C'est ce dernier mécanisme qui nous intéresse ici (nous oublierons les deux autres) puisqu'il s'agit de mémoire stable et de lien entre ce qui se passe à la synapse et ce qui se passe dans le noyau au niveau de modifications épigénétiques plus stables, voire irréversibles qui permettent de rendre compte d'une mémorisation de longue durée. Il me faut d'abord vous décrire brièvement le modèle qui est celui de l'apprentissage de la rétraction des branchies. La **DIA III.16** (où nous découvrons ce modèle de mollusque marin) vous résume rapidement le fait que la libération de sérotonine (5HT) par un interneurone facilitateur facilite l'apprentissage du réflexe de rétraction des branchies drivé par le motoneurone. Ce modèle a été à la base des nombreux travaux de l'équipe qui ont valu à Eric Kandel de recevoir le prix Nobel de Médecine ou Physiologie. Ce n'est cependant que plus récemment que les auteurs de l'article en question ont observé la présence de piRNA dans le neurone sensoriel



qui établit un contact avec le motoneurone. Nous verrons que le complexe Piwi/piRNA conduit à la méthylation du promoteur de CREB2, un facteur de transcription répresseur de la mémorisation à long terme et le fait en s'hybridant avec le transcrit naissant.

Mais reprenons les choses à leur début. Dans leur recherche (initialement de miRNA d'Aplysie) les auteurs tombent sur des ARN un peu plus grands que prévu (28nt au lieu des 22 attendus pour des miRNA) avec un U en 5' pour 60 % d'entre eux. Si la plupart de ces piRNA sont, c'est normal, enrichis dans les gonades, plusieurs sont présents dans le système nerveux. La vérification de la méthylation en 3' caractéristique des piRNA permet de s'assurer qu'il ne s'agit pas d'un artefact. La **DIA III.17** démontre que les deux protéines qui lient respectivement les piRNA et le miRNA (gel d'immunoprecipitation) appartiennent bien aux familles argonautes et Piwi. Sur cette même **DIA III.17** on constate que Piwi est fortement exprimé dans le noyau de la cellule sensorielle, à la fois par immunocytochimie et par fractionnement subcellulaire.

Pour étudier si ces piRNAs ont un rôle régulateur de la mémoire synaptique, les auteurs ont criblé ceux dont la concentration était modifiée en présence de sérotonine, un neuromédiateur libéré par l'interneurone facilitateur qui – dans ce système – module de façon importante l'apprentissage et la mémoire. L'expression de plusieurs piRNA, dont piR-4 et surtout piR-15, est fortement augmentée (**DIA III.18**) et le rôle de ces piRNA a été testé par une stratégie antisens anti-Piwi drivé par la penetratin). On doit comprendre que dans cette stratégie comme Piwi se fixe à tous les piRNA, ce sont tous les piRNA qui sont touchés et pas seulement ceux dont l'expression est augmentée. Le signal de sortie est la facilitation à long terme induite par la sérotonine (5 pulses de 5HT). Je rappelle que la facilitation à long terme signifie que la même réponse peut être obtenue avec un signal plus faible. La **DIA III.18** qui rappelle le schéma d'innervation donne aussi les résultats de la perte ou du gain de fonction PIWI

dans la LTP. Clairement un antisens (rouge) et non un brouillé (vert) diminue considérablement la mémorisation quand le gain de fonction par expression de Piwi-GFP (jaune) l'augmente.

Cette expérience a été suivie du criblage de nombreux gènes de plasticité (**DIA III.19**) pour aboutir à la démonstration (en haut à gauche) que la perte de Piwi est suivie d'une forte augmentation de la transcription et de la traduction de CREB2 (cyclic AMP responsive element binding protein 2 qui se fixe sur certains promoteurs de gènes régulés par l'AMPc) dont on connaît, des travaux antérieurs, le rôle inhibiteur sur la mise en place de la LTP dans ce modèle (CREB2 bloque la mémorisation). À l'inverse (en bas à gauche et en jaune) la surexpression de PIWI rend le système sensible à un seul pulse de 5HT quand 5 pulses sont normalement demandés pour induire la mémorisation.

Du fait de la fonction connue du système PIWI/pi sur la méthylation (rappel tout en haut à droite), les auteurs ont utilisé RG108, un inhibiteur de la DNA méthyltransférase (DNMT) et effectivement observé que cet inhibiteur a un fort effet antagoniste sur la répression de l'expression de CREB2 par la 5HT (F en haut à droite). Cet effet antagoniste de la répression est corroboré avec une perte de la facilitation (en bas à droite, rouge).

D'où l'étape suivante : la recherche des promoteurs du gène cible (CREB2) et des CpG qui sont modifiés dans cette région et la démonstration d'une inhibition de la transcription probablement liée à une méthylation d'un site promoteur proximal. En effet comme l'illustre la **DIA III.20**, la présence de 5HT hyperméthyle le promoteur proximal et cette méthylation (MSP pour Methy Specific Primers) est augmentée en présence de 5HT et perdue si l'inhibiteur des méthyltransférases est ajouté, avec même une identification des quatre sites principaux qui présentent 100 % de méthylation en présence de 5HT. La suite de l'article consiste à démontrer que c'est bien le complexe PIWI/Pi qui régule la méthylation et qu'il le fait en s'hybridant au mRNA



naissant selon le schéma de droite sur cette même **DIA III.20**. J'attire ici votre attention, celle de certains d'entre vous tout particulièrement, sur le fait que la séquence du piRNA peut nous donner une information sur le gène dont l'expression est régulée.

Ce qui ressort de cette lecture est très intéressant car l'article donne au complexe PIWI/piRNA une fonction plus large que celle de la seule répression de la transcription des LINEs, pour laisser entrevoir la possibilité d'une action régulatrice dont une modalité serait la complémentarité entre le piRNA et le transcrite du gène réprimé par le complexe. Cela ouvre des perspectives intéressantes et suggère de partir des piRNA exprimés dans une cellule donnée pour identifier des cibles épigénétiques de PIWI, ou (pourquoi pas ?) d'autres facteurs susceptibles de lier les piRNA et de les transporter au noyau.

Je ne crois pas que nous nous soyons égarés puisqu'il s'agit, après tout, de mémoire épigénétique et de la façon dont l'expérience laisse sa trace dans les neurones, donc de la façon dont cette trace s'efface ou se perd, ce qui peut être bon ou mauvais, c'est selon. Mais pour revenir plus directement sur le « désastre » je vais maintenant commenter un autre article, celui de Li *et al.* (*Nature Neurosci.* 16: 529-532, 2013) dont le titre est particulièrement évocateur : « Activation of transposable elements during aging and neuronal decline in *Drosophila* ». Les auteurs ont examiné l'expression des transposons chez la drosophile par RT-PCR dans la tête (le cerveau et tout particulièrement les mushroom bodies) au cours du vieillissement normal entre des adultes de 2 à 4 jours, 14, 21 et 28 jours. Je rappelle que les mushroom bodies (**DIA III.21**), identifiés en 1850 par Félix Dujardin sont impliqués dans l'apprentissage et la mémoire chez les insectes, tout particulièrement, mais pas seulement, la mémoire des odeurs.

Les éléments choisis sont R1 et R2 qui appartiennent à la famille des LINEs et gypsy, de la famille des transposons à LTR (des rétrovirus domestiqués qui constituent chez *sapiens* 8 % du génome, contre 17 % pour les LINEs, **DIA III.21**). Je ne m'étends

pas sur cette distinction discutée au cours des années précédentes, mais dans le deux cas, il s'agit de rétrotransposition, donc d'éléments mobiles). Le résultat de cette étude est qu'on observe une augmentation notable de ces transcrits (**DIA III.21a**) au cours du vieillissement et de l'expression de la protéine ENV (glycoprotéine d'enveloppe) encodée par gypsy (**DIA III.20b**). Cette expression tardive s'accompagne d'une capacité de réintégration dans les « mushroom bodies » qui peut être suivie par l'expression de la GFP (**DIA III.20**, en bas). Donc la rétrotransposition augmente avec l'âge.

Ago2 (Argonaute 2) est la protéine de la famille PIWI qui réprime la rétrotransposition dans les tissus adultes. D'où l'utilisation de mutants de Ago2 pour comprendre le rôle éventuel de ces transpositions dans le processus de vieillissement. La première observation est que R1, R2 et gypsy augmentent avec l'âge et que la mutation 51B dans Ago2 augmente la transcription de R2 (pas de R1) et de gypsy, la mutation 414 ayant un effet faible sur R2 mais fort sur gypsy (voir pour l'expression de ENV en fluo et en western blot) (**DIA III.22**). Sur le plan comportemental une mesure de la mémoire à long terme a été faite chez les différents phénotypes. On remarque une absence de déclin comportemental entre le jeune et l'âgé dans la situation WT (enfin une bonne nouvelle), avec une forte diminution chez les deux dans le mutant 414 (diminution encore plus forte chez les animaux âgés, ce qui est intéressant). Quant à la survie de la *Drosophila*, elle diminue significativement chez les deux mutants. Ces expériences suggèrent que la dérégulation de la rétrotransposition pourrait avoir un effet délétère sur les performances cognitives des vieilles mouches.

Mais évidemment ce ne sont que des mouches et je vais clore cette section avec un travail du même groupe sur les humains et les souris (Li *et al.*, *PLOS One* 7, 9, e4409, 2012). Partant de la constatation que l'expression d'éléments transposables (TE) spécifiques a été observée dans plusieurs désordres de type neurodégénératif, les auteurs ont démontré que nombre des transcrits



de TE se lie à une RNA-binding protein appelée TAR DNA-binding protein 43 (TDP-43) qui joue un rôle dans la sclérose latérale amyotrophique (SLA) et les dégénérescence fronto-temporales (FTLD). D'où les expériences et hypothèse qui suivent sur le rôle des TE et de leur répression dans la régulation de la neurodégénérescence et du vieillissement chez les mammifères.

L'accumulation d'inclusions cytoplasmiques contenant TDP-43 est une caractéristique de plusieurs maladies neurodégénératives dont l'ALS, la FTLD et l'AD. Des mutations dans cette protéine sont à l'origine de quelques cas de formes familiales ou sporadiques d'ALS. Les auteurs ont donc repris les données déjà publiées sur les ARN immunoprécipités avec un anti TDP-43 (rat et humain) et trouvé un enrichissement spectaculaire en séquences dérivées de chaque classe de TE (**DIA III.23**, en haut à gauche). En comparant entre humains sains et humains avec une dégénérescence fronto-temporale (FTLD), les auteurs constatent un enrichissement presque général chez les individus sains (**DIA III. 23** en haut à droite). Ces résultats pouvaient suggérer chez les patients une diminution de la régulation des TE. Cette hypothèse a été testée de deux façons différentes.

Dans un premier temps les auteurs ont analysé le nombre de « reads » de séquences répétitives (les TE sont des séquences répétitives) dans des données de séquençage d'ARN à partir de modèles murins de pathologie TDP-43. Deux modèles ont été utilisés, un de gain de fonction de TDP-43 humaine dans une souris transgénique et l'autre de perte de fonction (oligonucléotides antisens) dans le striatum de souris. Le gain de fonction de cette protéine qui s'agrège est censé avoir un effet dominant négatif sur la fonction normale de TDP-43 et donc ne pas différer, par ses effets, d'une perte de fonction. Dans les deux modèles (**DIA III.23**, en bas) on constate en effet une forte augmentation de 86 (gain de fonction) et 223 (perte de fonction) de l'expression des TE de toutes les familles.

Pour conclure ce cours, le message est très simple. Avec le temps, la modification globale de la structure de la chromatine est à l'origine d'une dérégulation de l'expression génétique qui augmente le nombre des cassures de l'ADN en même temps qu'elle diminue l'efficacité de la réparation. C'est pour cette raison que le cours suivant sera consacré au rapport entre architecture du noyau et instabilité génétique. ■