



13 octobre 2014

Quelques éléments nouveaux

Je commencerai cette mise à jour par une revue récente et généraliste sur le lien entre neuro-dégénérescence et les cassures de l'ADN. On la doit à Madabhushi *et al.* (*Neuron*, 83 : 266-282, 2014). Les auteurs commencent par cette vision optimiste de 800 000 centenaires états-unien en 2050. Ils appellent ça un miracle, et c'en est un – au moins sur le plan biologique – si l'on sait que, chaque jour chaque cellule de notre corps est soumise à plusieurs centaines de milliers de lésions et modifications qui touchent protéine, lipides, ADN – rien n'est épargné. Comme nous renouvelons notre poids corporel en cellules chaque année, on pourrait se dire que ça n'a pas beaucoup d'importance, mais chacun le constate, ou sera rapidement amené à le constater, ce n'est pas pour cela qu'on est « du jour » ou « à la coque ». Par ailleurs, nombre de neurones vivent aussi longtemps que leur porteur et ne sont donc pas renouvelés, même si certains le sont au niveau de l'hippocampe et du bulbe olfactif (plutôt pour les souris, car pour *sapiens*, il y a un doute), du striatum (peut-être et pour *sapiens* uniquement) nous reviendrons sur ce point dans un cours prochain.

La revue dont je vous parle se concentre sur l'ADN et le système nerveux. Avec des chiffres impressionnants : 200 déaminations de cytosines, 3 000 méthylations de guanines, 10 000 dépurinations spontanées, 10 à 100 000 lésions par oxydation, 10 000 cassures simple brin et de 10 à 50 cassures double brin par jour et par cellule. Pour les DSB, cela semble peu, mais ce serait une grave erreur de le croire, car ce sont les plus toxiques des cassures et, probablement, la base de la plupart de nos « maladies » du vieillissement cérébral. Je ne vais pas répéter ce que nous avons vu l'année dernière et résumé il y a une semaine, mais disserter, à l'aide de cette revue, sur les lésions de l'ADN dans le cerveau vieillissant et sur le rôle des lésions de l'ADN dans les maladies neurodégénératives. Nous n'y reviendrons que dans 6 semaines,

probablement, à travers des travaux accomplis par ma propre équipe sur la maladie de Parkinson.

Personne n'échappe au vieillissement, ce qui montre que la maintenance des organismes est une tâche plus ardue que leur fabrication. Avec l'âge, l'instabilité du génome se manifeste d'au moins trois façons. Une première d'entre elles consiste en l'accumulation de lésions non réparées probablement dues à la diminution des systèmes de réparation (**DIA II.2**). Sur cette diapositive, on constate trois voies. La première est la simple accumulation de mutations qui altèrent le génome. La seconde est l'accumulation de lésions non réparées avec des conséquences importantes au niveau même de la lecture des séquences géniques par les RNA polymérases. La troisième inclut les réparations avec des modifications de séquences – nous n'y reviendrons pas – pouvant entraîner des changements défavorables (noter aussi la présence de SIRT1) et des modifications épigénétiques. En fin de course, c'est un vieillissement du système nerveux et les maladies associées à ce vieillissement. Je vais illustrer ce point dans un moment à l'aide d'un article récent. L'analyse par μ array (une technologie qui a presque disparu mais permet de comparer des transcriptomes entre eux) de cerveaux humains post-mortem pris à des âges différents démontre, dès 40 ans, une baisse de l'expression de gènes impliqués dans la mémorisation en même temps qu'une augmentation de l'expression de gènes liés au stress (Lu *et al.*, *Nature* 429 : 883-891, 2004).

Dans cet article, les auteurs ont analysé le transcriptome au niveau du cortex frontal de 30 individus âgés de 26 à 106 ans et identifié deux clusters de gènes, un composé de gènes dont l'expression augmente avec l'âge et l'autre de gènes dont l'expression diminue avec l'âge, le tout comptant pour environ 4 % des 11 000 gènes analysés (**DIA II.3**). Sur cette même diapositive, on constate que les résultats sont retrouvés par une autre technologie (QRT-PCR) et au niveau des protéines, sans une perte massive de neurones (β tubuline, TAG-1, GAP-43 restent identiques ou presque). Si l'on classe les



gènes par catégorie, et sans entrer dans les détails, on constate une baisse (bleu) de l'expression des gènes de la « fonction synaptique » et du transport vésiculaire et une augmentation (rouge) de celle des gènes de la réponse au stress ou de l'inflammation. Sur la partie droite de cette même **DIA II.3**, on peut suivre la diminution d'expression de gènes spécifiques entrant dans les catégories « bleues ». Elles sont aussi décrites dans les **DIA II.4** et **II.5** pour ceux d'entre vous qui veulent plus de détails.

Enfin, dernière information (**DIA II.6**), après avoir confirmé que l'ADN de cortex embryonnaire est en « bonne santé » (a), les auteurs montrent que les guanosines des promoteurs de plusieurs gènes sont oxydées, dont le gène encodant l'ATP-synthase mitochondriale (b). Ils s'amuse à suivre l'augmentation avec le temps des dommages subis par des gènes importants, avec un nette détérioration entre 60 et 70 ans (c), et montrent que les gènes dont l'expression diminue ont des guanines oxydées dans leurs promoteurs (d-f) et donc que la baisse d'expression des gènes « de la jeunesse » s'accompagne d'une oxydation, et des lésions qui l'accompagnent, au niveau des régions régulatrices. Cela suggère – et même démontre – un lien entre oxydation et déclin cognitif chez l'humain, même si comme on le dit souvent « nous sommes plus que nos gènes ».

Un deuxième mode de manifestation de l'instabilité du génome consiste en la réparation erronée des lésions avec les mutations qui l'accompagnent. Contrairement aux oxydations dont nous venons de parler et qui, bonne nouvelle (il en faut), sont réversibles, les lésions non réparées, mauvaise nouvelle (il y en a), ne le sont pas. Ces mutations peuvent donc contribuer à la neurodégénérescence liée à l'âge et ce de façon plutôt directe. L'analyse génomique au niveau de la cellule unique a démontré que 13 à 41 % des neurones du cortex frontal humain (post-mortem) ont des modifications du nombre de copies du matériel génétique sur des longueurs d'au moins un million de bases. Compte non tenu des modifications directes de l'ADN, les lésions non

réparées ont des conséquences au niveau de la structure de la chromatine et ce sur de très grandes régions. Ces modifications, pour une part, interviennent dans le processus de réparation, mais il arrive que l'organisation chromatiniennne ne revienne pas à la normale une fois la réparation terminée (**DIA II.7**). De ce fait, avec le temps, l'organisation globale de la chromatine peut se trouver atteinte. Je reviendrai peut-être sur les modifications, avec l'âge, de l'épigénome.

Ces modifications globales de l'architecture de la chromatine peuvent être induites par des agents DNA-toxiques agissant de façon aiguë. Par exemple, il a été observé que l'exposition de cellules à H_2O_2 , et la formation qui s'ensuit de DSB, induit une redistribution de SIRT1 qui vient se relocaliser sur les sites lésés (depuis les régions riches en éléments répétés) (**DIA II.7**). Je reviendrai ultérieurement sur la question des sirtuines mais, pour l'instant, contentons nous de dire que, si elle est maintenue par un stress continu, la relocalisation de SIRT1 – essentielle pour la réparation de l'ADN – a des effets globaux sur la transcription. Or, les changements transcriptionnels observés dans ces conditions, sont similaires à ceux observés dans le cerveau de souris au cours du vieillissement. L'activation de SIRT1 peut donc à la fois contribuer à la réparation de l'ADN, mais aussi promouvoir l'expression d'éléments répétés dont vous savez depuis l'année dernière, et cela a été rappelé il y a une semaine, que c'est moins bon.

Les manquements à la réparation de l'ADN ont aussi été observés dans des maladies neuro-dégénératives qui ne se déclarent qu'avec l'âge. C'est en effet assez surprenant de constater que, même dans leurs formes génétiques strictes, ces maladies ne se déclarent qu'après un certain âge. Cela est vrai de la maladie de Huntington, de la maladie de Parkinson ou de la maladie d'Alzheimer. Il y a donc, au-delà des mutations, une composante « âge » qui intervient et explique sans doute que ces maladies ne sont importantes que dans les civilisations permettant une survie prolongée pour la



vaste majorité des individus. Nous reviendrons sur ces points plus tard quand nous proposerons que c'est une modification avec l'âge de l'hétérochromatine qui sensibilise aux mutations déjà toujours présentes. Il reste que, comme nous l'avons rappelé la semaine dernière, les cassures double brin, en ne parlant que d'elles, sont une composante naturelle de l'activité cérébrale. Pourquoi ? Cela est difficile à dire, mais un lien avec les ROS générés par l'activité cérébrale, grosse consommatrice d'ATP (**DIA II.8**), est tout à fait envisageable. Ce que l'article de Suberbielle propose, dans le cas de la maladie d'Alzheimer, est que c'est du côté de la réparation qu'il y a un problème (**DIA II.9**).

Il serait dangereux d'aller trop vite et de dire que cette maladie est liée à une réparation défectueuse des DSB. D'abord, parce que sous le terme de maladie d'Alzheimer se cachent nombre d'étiologies différentes (les formes génétiques comptent pour moins de 10 %) et que, comme pour le Parkinson ou la Schizophrénie, on ne saurait faire l'impasse sur cette diversité des causes, même si les phénotypes sont très similaires, quelque soit leur déterminisme. Revenons sur la maladie d'Alzheimer pour illustrer notre propos à l'aide de deux modèles murins (à prendre, nous le savons, avec des pincettes). Un premier modèle concerne des souris mutantes (mutations conditionnelles) pour ERCC1, une enzyme du *Nucleotide Excision Repair pathway* (**DIA II.10**). La délétion conditionnelle du gène dans les neurones excitateurs du cerveau antérieur induit une perte de plasticité synaptique dans l'hippocampe et des défauts de mémorisation évocateurs des neurodégénérescences liées à l'âge. Mais il doit être souligné que de telles mutations, non plus que des mutations dans le BER, n'ont jamais été identifiées chez les malades. Assertion à moduler du fait que les formes génétiques sont peu nombreuses et qu'on peut toujours imaginer des polymorphismes génétiques touchant des éléments régulateurs de l'expression des gènes de réparation.

Pour les DSB, qui sont intéressantes du fait même de l'article de Suberbielle *et al.*, des augmen-

tations du nombre de DSB ont été observées dans AD (Sclérose Latérale Amyotrophique ALS, aussi) et dans plusieurs modèles murins de maladies neurodégénératives dont la souris J20. Comme on peut le constater dans le **DIA II.11**, il s'agit d'une double mutation mimant des formes génétiques humaines de la maladie. Si nous regardons la protéine, nous voyons qu'il existe trois sites de clivage. Le site alpha est physiologique et permet la sécrétion de la forme soluble qui a une activité physiologique. En particulier, elle stimule la prolifération des cellules souches neurales adultes. Par ailleurs, sa production est incompatible avec celle du fragment toxique A β ou BA4 à l'origine des fameuses plaques amyloïdes. Mais l'inverse est aussi malheureusement vrai et on doit s'attendre chez les malades à une accumulation de plaques amyloïdes et à une diminution de la neurogenèse adulte.

Nous continuerons de suivre Madabhushi et collègues en introduisant la souris p25/Cdk5. La kinase 5 cyclin-dépendante (Cdk5), est une kinase qui ajoute un phosphate sur les serines et thréonines et dont l'activité nécessite une association avec la protéine p35 *cyclin-like*. Il a été démontré que dans les cerveaux AD et d'autres conditions neurotoxiques, p35 est clivée en p25 et que l'association p25/Cdk5 change à la fois la localisation de Cdk5 et la nature des protéines qu'elle phosphoryle. Une souris CK-p25 inductible (induction dans le cerveau antérieur) a été générée – qui récapitule de nombreux traits AD – dont l'accumulation du peptide BA4 (**DIA II.11**) et des *neurofibrillary tangles* composés d'agrégats de la protéine Tau (hyperphosphorylée) d'assemblage des microtubule (**DIA II.11**). Plus, pour faire bonne mesure, une gliose réactive et une perte neuronale.

Mais avant ces symptômes, ce qui apparaît en premier est une augmentation des cassures double brin. D'après les auteurs de ces études (Kim *et al.*, *EMBO J.*, 26 : 3169-3179, 2007 ; Kim *et al.*, *Neuron*, 60 : 803-817, 2008), ces cassures pourraient être attribuées à une inhibition des histone-déacétylase de classe I (HDAC1 qui retire un résidu acétyl-



sur la que N-ter des histones) dont la surexpression réduit le nombre de DSB dans cette souris et bloque la mort neuronale (le Neuron 2008). Mais commençons par le papier de 2007 (*EMBO J.*). Il commence par une remarque sur le fait que si les maladies neurodégénératives sont plutôt spécifiques quant aux types de cellules touchées, par exemple les neurones DA pour la maladie de Parkinson, les mécanismes à l'œuvre sont plus ubiquitaires. Et leur liste nous est familière : agrégation de protéines, stress oxydatif, inflammation et autres phénomènes que l'on retrouve aussi dans le vieillissement normal. Cela laisse ouverte la possibilité de développer des médicaments qui seraient actifs sur plusieurs pathologies et retarderait le vieillissement en général. Ce pourquoi ils seraient actifs sur plusieurs pathologies puisque que c'est le vieillissement normal qui facilite l'apparition de phénotypes pathologiques, même quand ceux-ci résultent d'une mutation présente dès l'œuf.

La découverte d'une action anti-âge des sirtuins, qui sont des déacétylases (elles retirent un groupe acétyle) dépendante du NAD⁺ (Nicotinamide dinucléotide) nous vient d'études sur la longévité des levures. Une copie additionnelle de Sir2 chez cet organisme augmente sa longévité. Elle le fait aussi chez les métazoaires via un mécanisme similaire à la restriction calorique, sur laquelle nous reviendrons. Dans leur article, les auteurs partent de l'hypothèse selon laquelle SIRT1 (il existe 7 sirtuins) pourrait avoir une action protectrice contre la neurodégénération. Je viens de le rappeler, l'induction de p25 chez les souris promeut une forte dégénération corticale avec des symptômes rappelant la maladie d'Alzheimer. Ce modèle a été utilisé par les auteurs, ainsi qu'un modèle de sclérose amyotrophique latérale (ALS) consistant en la surexpression par les motoneurons d'une forme mutée de la superoxyde dismutase (SOD) qui forme des agrégats et induit un modèle d'ALS sans rapport avec la perte d'activité dismutase (laquelle activité doit être importante dans la mesure où elle diminue les niveaux en superoxydes O₂⁻). Les auteurs ont observé une augmentation de l'expression de SIRT1

dans le cortex des souris p25 (déacétylation de la cible PGC1-alpha), 2 semaines après induction et dans les motoneurons des souris ALS à 10 mois, c'est-à-dire quand la neurodégénération commence (**DIA II.12**). L'explication fournie est qu'il s'agit d'un mécanisme de protection. Des souris exprimant une forme familiale mutée du BAPP mais sans perte neuronale (des plaques néanmoins) ne montrent pas d'augmentation de SIRT1, suggérant que ce phénotype est associé à la mort cellulaire. Les auteurs ont alors vérifié que la dérégulation de l'homéostasie calcique (ionomycin) ou un stress oxydatif ont des effets similaires sur des neurones corticaux en culture (**DIA II.12**).

Afin de comprendre la signification de l'augmentation de SIRT1, l'article décrit les effets du resveratrol, un polyphénol activateur de SIRT1 (STAC pour *SIRT1-Activator-Compound*) et démontrent que la drogue réduit les modifications morphologiques et la mort induites *in vitro* par p25 ou la SOD mutée (**DIA II.13**). Ce qui conduit aux expériences *in vivo* sur l'effet du resveratrol dans la modèle p25 inducible. La drogue est introduite dans les ventricules cérébraux (ICV) de souris p25 3 semaines après induction et son effet Sirtuin est suivi à travers la déacétylation de pGC1-alpha, laquelle est diminuée d'environ 50 % (**DIA II.14**). PGC1-alpha est un co-activateur de la transcription qui se fixe à des récepteurs nucléaires et régule l'expression de gènes du métabolisme (j'y reviendrai). Après 5 semaines d'expression de p25, on note une forte dégénérescence au niveau de l'hippocampe accompagnée d'une gliose (GFAP) et de l'activation de la caspase 3 (enzyme qui est un marqueur de la mort apoptotique) (**DIA II.14**). Cette même **DIA II.34** montre la forte protection par le resveratrol activateur de la Sirtuin. Ce sauvetage partiel par le STAC est corroboré sur le plan comportemental dans un test de conditionnement à la peur (**DIA II.14**).

Ce travail va un peu plus loin sur l'analyse moléculaire du phénomène en suivant la protéine p53 dont nous avons vu à plusieurs reprises que son expression entraîne la mort cellulaire, une bonne



chose dans les cellules cancéreuses, une moins bonne dans les neurones, en tout cas tant qu'ils fonctionnent correctement (un neurone mort peut être est préférable à un mauvais neurone). p25/Cdk5 phosphoryle p53 augmente son activité de facteur de transcription. La **DIA II.15** illustre le plus haut niveau de p53 dans la souris p25 en A) donc de p53 phosphorylée. Augmentation qui s'accompagne aussi d'une augmentation de son acétylation sur la lysine 382 (en B), modification qui stabilise la protéine et augmente son action pro-apoptotique. On voit d'ailleurs en C et D que le fait de diminuer p53 par un RNAi spécifique diminue aussi le nombre de neurones qui meurent. Finalement, en E, on constate que le resveratrol diminue l'acétylation de p53 (par activation de SIRT1 qui est une déacétylase), ce qui peut fournir un mécanisme à son effet bénéfique sur la mort des neurones.

Je reviendrai plus tard dans le cours sur les sir-tuins. Pour l'instant, j'aimerais discuter avec vous le papier de 2008 du même groupe (Kim *et al.*, *Neuron*, 60 : 803-817, 2008), et aller un peu plus loin sur ce modèle p25 et sur le lien qu'il suggère entre une activité de cycle cellulaire aberrante et la neuro-dégénération. Je rappelle, en effet, que p25 est un produit de clivage de p35 qui s'associe à Cdk5, une kinase (à activité de phosphorylation) cycline dépendante, activée au cours du cycle cellulaire. De ce point de vue, il est intéressant de constater que dans de multiples conditions associées à la mort neuronale (comme la maladie d'Alzheimer, l'ischémie ou la maladie de Parkinson), on constate que les neurones s'engagent – ou semblent s'engager – dans un processus de division cellulaire alors que ce sont des cellules en Go, post mitotiques, parfois depuis de plusieurs dizaines d'années. C'est ainsi qu'ils se mettent à des « marqueurs » de la division, comme Ki-67 ou PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*) une enzyme qui se complexe à la DNA polymérase.

Mais revenons à nos affaires (si tant est que nous nous en soyons éloignés) pour porter notre regard sur la question de l'acétylation des histones,

phénomène important dans la régulation de l'expression génétique, en particulier dans le contexte du contrôle de la différenciation et de la prolifération. Les histones déacétylases (HDAC) retirent une fonction acétyle des histones, ce qui résulte en une compaction de la chromatine qui devient ainsi moins accessible, en particulier aux facteurs de transcription ce qui réprime localement l'expression de certains gènes. La première HDAC identifiée, HDAC1, joue un rôle important dans la régulation du cycle cellulaire et est nécessaire à la répression de gènes du cycle cellulaire comme p21, E2F1 et les Cyclines A et E. Cette répression passe par l'association de HDAC1 avec les régions promotrices des gènes réprimés. Dans l'article dont nous parlons, les auteurs ont utilisé leur souris p25 inductible (un modèle de maladie) et montré qu'à la suite de l'expression de p25, les neurones expriment de façon aberrante certains marqueurs du cycle cellulaire et forment des DSB, tôt dans le processus qui les conduit à la mort. Ils montrent que p25 s'associe à HDAC1 et l'inactive. Parallèlement, l'inactivation expérimentale de HDAC1 conduit à l'expression de gènes du cycle cellulaire, à la formation de DSB et à la mort des neurones. Bref, ils proposent que la pathologie p25 est explicable par l'inhibition de HDAC1 et donc une décompaction de la chromatine menant à l'expression illégitime de gènes entraînant la mort. Ce qui nous ramène un peu, par la base, à la question de l'hétérochromatine et du vieillissement associé à la perte de l'hétérochromatine (rappelez-vous les lamines et progeria).

Entrons pour un instant dans les détails de cet article. Deux semaines après l'induction de p25 dans le cerveau antérieur, en l'absence de signe visible de dégénérescence, les auteurs ont fait une analyse du transcriptome par μ array (nous sommes en 2008) et identifié environ 225 gènes significativement modifiés dans leur expression, des gènes du cycle cellulaire et de la réparation de l'ADN pour 65 d'entre eux. Sur ces 65 gènes, 63 sont régulés à la hausse dont Cyclines A et E, E2F1, Ki-67 et PCNA comme je viens de l'indiquer (**DIA II. 16** panneau A). Je rappelle aussi que ces mêmes régulations



à la hausse ont été observées dans les cerveaux post-mortem de patients Alzheimer ou de modèles animaux de la maladie. Dans les panneaux C-E de la même **DIA II.16**, on constate que l'induction de p25 s'accompagne de la réapparition de Ki-67 et PCNA au niveau de l'hippocampe mais pas de l'histone phosphorylée pH3 (la SVZ est là comme contrôle de cellules en prolifération normale), ce qui suggère l'absence de mitoses réelles, c'est en tout cas l'explication donnée et je vous la livre même si elle ne colle pas avec ce que nous avons nous même observé dans les neurones dopaminergiques soumis à un stress oxydatif. Parmi les autres gènes régulés à la hausse, on note des gènes impliqués dans la réparation des DSB, dont Rad51, BRAC1 et Chk1. La formation de cassures est confirmée par l'expression de gamma-H2AX *in vivo* (dans la souris p25, panneaux A et B de la **DIA II.17**) et *in vitro* par infection des neurones par un virus porteur de p25 ou du gène neutre de la β -galactosidase (panneau C/D) et le test comète (en dessous). On se souvient en effet que la forme phosphorylée par ATM de H2AX (gamma-H2AX) est recrutée au niveau des DSB (**DIA II.17, en haut**).

Venons en à HDAC1 et à sa possible interférence dans l'expression aberrante des gènes du cycle cellulaire et dans la formation de cassures ADN. Les auteurs se sont intéressés à HDAC1 dont on sait, qu'à travers son activité déacétylase, elle réprime l'expression de gènes du cycle cellulaire. Ils ont démontré une interaction directe entre p25 et le domaine N-terminal de la déacétylase, qui contient l'activité catalytique. Cette interaction diminue l'activité de HDAC1 et son association avec certains promoteurs dont ceux de p21 et E2F1. On peut donc dire que p25/Cdk5 antagonise à la fois l'activité enzymatique de HDAC1, mais aussi son association avec certains promoteurs et son activité répressive de la transcription de plusieurs gènes. Pour suivre directement l'effet de HDAC1, il a été fait usage d'un siRNA et aussi de l'inhibiteur des HDAC de classe I, le MS-275 actif sur HDAC1, mais moins sur HDAC3 ou HDAC8. Ces traitements augmentent les DSB et, à l'in-

verse, la surexpression de HDAC1 réduit les DSB induits par p25 *in vitro* et par une ischémie *in vivo*. Ces travaux mènent au modèle présenté dans la **DIA II.18**

Logiquement, il nous faut maintenant examiner la possibilité d'une baisse avec l'âge de la fonction par NHEJ (seule modalité de réparation dans les cellules post-mitotiques, donc les neurones). À cette fin nous allons suivre l'article récent de Vaidya *et al.* (*PLoS Gen.* 10 : e1004511, 2014). Les auteurs ont généré une souris dans laquelle le gène de la GFP (protéine fluorescente) a été inséré dans le locus ROSA26 exprimé dans toutes les cellules. Des DSB dans les gènes GFP sont induits par l'expression d'une endonucléase (I-scel nucléase) et la réparation peut être mesurée par la réapparition de cellules vertes (**DIA II.19**, panneau du bas). Les auteurs, on va le voir, démontrent que la réparation par NHEJ dans des astrocytes et des fibroblastes de cœur, rein, poumon et peau décline entre 1,8 et 3,8 fois au cours du vieillissement.

Pour tester l'efficacité de la NHEJ et ses changements avec l'âge, les auteurs ont pris 4 souris jeunes (5 mois) et 4 souris âgées (25 mois) hétérozygotes pour le vecteur et isolé les différents types cellulaires mentionnés plus haut en maintenant en dessous de 3 le nombre de passages afin d'éviter une sélection clonale. Les cellules ont alors été transfectées avec I-Scel pour créer des DSB et DsRed pour suivre les cellules transfectées. L'efficacité de réparation est alors simplement suivie par cytométrie de flux en faisant le rapport vert/rouge. On peut voir dans la **DIA II.19** (en A) que l'efficacité de réparation diffère entre les tissus et que les animaux âgés sont moins efficaces. Le papier est loin d'être parfait car on aurait aimé voir ce qui se passe *in vivo* et dans les neurones, mais pour cela il aurait été nécessaire d'introduire un gène inductible codant pour l'endonucléase. Il reste qu'il donne du poids à l'idée que si les DSB sont plus fréquentes avec l'âge, c'est sans doute parce qu'elles s'accumulent, mais aussi parce que leur réparation est moins efficace, comme dans le cas de la souris J20 mainte fois mentionné.