



4 novembre 2013

## Le niveau cellulaire et intercellulaire

La recherche sur les télomères prend son origine sur la question de la protection de l'extrémité des chromosomes, une question très fondamentale étudiée à l'origine chez la levure, le maïs et plusieurs organismes protozoaires. En fait la conservation des mécanismes et des structures fait que ces travaux ont ouvert des espaces à nombre de question d'importance médicale. C'est souvent le cas. Je vous rappelle que l'interférence à ARN a été découverte à partir de travaux sur la couleur des pétales de pétunia (recherche d'un violet profond) et la rétrotransposition à partir des études sur la variéation des couleurs des grains de maïs au sein d'un même épi. Aucun de ces travaux, si riches en applications médicales, n'aurait été financé par un plan anti-cancer ou un programme destiné à lutter contre la maladie d'Alzheimer. En ces temps, hélas pas nouveaux, où les politiques, sans distinction de couleur, semblent incapables de comprendre la nécessité de préserver et de développer la recherche fondamentale, certaines évidences doivent être rappelées. Quand nous aurons été définitivement distancés par nos voisins, il sera trop tard pour pleurnicher sur notre perte de compétitivité. On se consolera en allant visiter les parcs de loisir.

Les télomères sont définis comme l'extrémité des chromosomes linéaires. Ils sont constitués de séquences répétées protégées par des protéines spécifiques. Chez *sapiens* la séquence télomérique TTAGGG est répétée sur plusieurs milliers de bases (10 kb dans le sang du cordon ombilical, soit plus de 1500 répétitions de la séquence de base). Les complexes protéiques constituent la shelterin (de shelter ou abri) et leur rôle est d'éviter que les télomères soient reconnus comme de l'ADN cassé et d'empêcher des fusions entre fragments d'ADN (préservation de l'intégrité du génome).

De nombreuses études ont confirmé le rôle des télomères dans le vieillissement cellulaire. En fait le machinerie de réplication ne peut aller jusqu'au bout du chromosome et encore moins au-delà et se

reproduire, pour ainsi dire sous elle. Ce qui fait que la fin de l'ADN ne peut être copiée et qu'à chaque division le télomère diminue de taille. D'où l'idée que la taille des télomères constitue une horloge moléculaire et qu'au bout d'un certain nombre de divisions, les cellules entrent en sénescence. Il existe cependant un mécanisme de compensation qui repose sur la télomérase, une enzyme qui, comme son nom l'indique, rallonge les télomères.

En fait, Armanios et Blackburn (*Nature Reviews Genetics*, 13: 693-xxx, 2012) rappellent qu'au-delà des études de départ auxquelles il vient d'être fait allusion, c'est dans les années 1990 que les télomères ont été considérés dans le contexte des pathologies en particulier le cancer puisque l'activité de la télomérase est augmentée dans la plupart des cancers ce qui fait que cette enzyme est une cible pharmacologique importante en oncologie. Ça se comprend d'ailleurs assez facilement puisque les cellules tumorales peuvent se multiplier indéfiniment alors que, normalement, chaque division entraînant un raccourcissement, le nombre des divisions est limité et que les cellules devraient entrer en sénescence et apoptose assez rapidement (au bout de 24 divisions environ). On retrouve le même problème pour les cellules souches, dont les cellules souches neurales sur lesquelles je m'attarderai en fin de cours. S'épuisent-elles où sont-elles protégées par une forte activité télomérase ? C'est important puisque, comme vous vous en souvenez, faire du sport augmente la prolifération des cellules souches neurales (**DIA V.2**) en jouant sur le compartiment d'amplification puisque les cellules souches ne se divisent que très lentement, c'est une de leurs propriétés. De là à dire que faire du sport est mauvais pour la santé, il y a un pas que je ne franchirai pas, surtout après avoir déjà suggéré que courir fait des trous dans les membranes musculaires et que penser casse l'ADN. Il ne resterait plus qu'à vous conseiller de fumer le cigare et ce serait le pompon (**DIA V.3**).

Au début des années 2000, la base génétique d'une maladie appelée dyskeratosis congenita 1 (DKC1) fut découverte avec l'identification d'un



gène encodant une protéine appelée dyskerin dont il fut démontré rapidement qu'il s'agissait d'une sous-unité de la télomérase. Ce travail pionnier fut suivi de nombreuses autres études et, depuis quelques années, le nombre de maladies expliquées par un problème de télomères a énormément augmenté ce qui a amené à les regrouper toutes sous le terme de « telomere syndromes ». Ces syndromes sont prioritairement associés à l'âge et marquées par un vieillissement prématuré, puisque le raccourcissement des télomères et un « acquis » de l'âge.

Pour revenir à la structure des télomères, la séquence TTAGGG répétée sur plusieurs milliers de bases est recouverte par un ensemble de protéines (collectivement shelterin) qui, chez *sapiens*, inclue 6 protéines (**DIA V.4**) :

- Telomere repeat binding factor 1 (TRF1)
- Telomere repeat binding factor 2 (TRF2)
- Repressor/activator protein 1 (RAP1)
- TRF1-interacting nuclear protein 2 (TIN2)
- TIN2-interacting protein (TPP1)
- Protection of telomeres 1 (POT1)

Ces protéines et leur interaction avec les télomères sur une longueur suffisante est nécessaire pour protéger le bout du chromosome et l'empêcher de déclencher les DDR (DNA Damage Response), de subir une dégradation ou de participer à des événements comme la fusion chromosomique (les extrémités télomériques de deux chromosomes fusionnent). À ce complexe s'ajoute un autre complexe CST qui comprend trois protéines le Conserved telomere protection component 1 (CTC1), le Suppressor of cdc thirteen 1 (STN1) et Telomeric pathway with STN1 (TEN1). La fonction de CST est moins claire même si des mutations dans ce complexe sont à l'origine de certains « telomere syndromes ».

Pour ce qui est de la télomérase, il s'agit d'une DNA polymérase, donc une enzyme qui synthétise de l'ADN, et qui ajoute de nouveaux motifs télomériques à l'extrémité des chromosomes. La télomérase a deux composantes très conservées, la télomérase elle-même ou TERT qui a une activité trans-

criptase reverse (faire de l'ADN à partir de l'ARN) et un composant ARN, TR ou TERC, qui fournit le substrat à copier par la transcriptase reverse. Ces complexes ribonucléoprotéiques sont présents dans une structure nucléaire appelée corps de Cajal (Cajal bodies). D'autres protéines dont le rôle est moins important sont associées à ce complexe et dans la **DIA V.4** est représentée la Dyskerin elle-même associée à NHP2 et NOP10, le tout stabilisant l'ARN et nécessaire à l'activité transcriptase reverse. Je passe sur deux ou trois autres composants, mais il est évident qu'une mutation affectant l'un quelconque de ces composants aura des effets plus ou moins importants sur l'activité enzymatique de la télomérase et donc sur le maintien de la longueur des télomères.

L'élongation des télomères est régulée de façon fine entre les phases S et M du cycle cellulaire (**DIA V.4**). Les télomérases allongent les télomères les plus courts et donc à chaque cycle cellulaire tous les télomères ne sont pas allongés de façon égale. Ce sont d'ailleurs les télomères les plus courts qui déclenchent la réponse de la télomérase (son recrutement) et pas la moyenne des longueurs des télomères dans une cellule (c'est important quand on veut mesurer la taille des télomères de distinguer la moyenne et la distribution des longueurs). On comprendra donc que dans ce processus de reconstruction des télomères, la stœchiométrie entre télomères à allonger et télomérase joue un rôle essentiel. En fait, même dans les cellules très riches en télomérase, comme les cellules souches hématopoïétiques, les télomères raccourcissent à chaque division. Une exception notable est celle des cellules souches germinales mâles humaines chez lesquelles on peut observer une stabilité, voire un allongement des télomères avec l'âge. Le mécanisme de cette anomalie n'est pas connu.

Je l'ai déjà signalé, des travaux récents soulignent l'importance des télomères dans plusieurs pathologies humaines, non seulement au cours de l'enfance mais aussi chez l'adulte. Certains de ces syndromes peuvent ne se déclarer que tardivement,



après 50 ans, comme la fibrose pulmonaire idiopathique, mais je ne veux pas entrer dans les détails des maladies répertoriées aujourd'hui puisqu'elles ne touchent pas le cerveau, notre organe préféré. Cependant, une réflexion sur les cellules souches neurales, au cours du développement et chez l'adulte s'impose et nous allons nous y pencher à partir du petit nombre d'articles traitant cette question. Ces études sont en effet peu nombreuses pour la raison, sans doute, que l'existence de ces cellules n'est reconnue que depuis peu du fait de la résistance à l'idée que le cerveau n'est pas une structure pérenne. Heureusement, vous vous en souvenez certainement, que certains collègues s'intéressaient au chant des oiseaux, puisque ce sont ces études qui ont permis de remettre sur le devant de la scène l'hypothèse proposée dès 1964 de l'existence d'une neurogenèse adulte (je vous renvoie aux cours des années précédentes). Il reste que tous les travaux indiquent qu'un des premiers signes de malade d'Alzheimer est la perte l'odorat. Étant donné le rôle joué par le sAPP dans la profération des cellules de la zone subventriculaire qui renouvellent les cellules GABAergiques du bulbe olfactif chez l'adulte (**DIA V.5**), on ne peut exclure qu'un raccourcissement des télomères de ces cellules souches neurales adultes se trouve à l'origine de certaines formes « sporadiques » de cette maladie. On ne peut l'exclure, mais on ne peut non plus l'affirmer puisque les travaux du groupe de Frisén, comme vous le verrez dans un instant, suggèrent que les neurones du bulbe olfactif, contrairement à ceux de l'hippocampe, ne sont pas renouvelés chez les humains (à la différence de ce qui se passe chez les rongeurs). Mais je ne suis pas convaincu que l'affaire soit close pour autant.

Auparavant je vais brièvement rappeler quelques maladies qui se déclenchent dans l'enfance et sont liées à des « désordres des télomères ». Elles sont incluses dans la liste présentée dans la **DIA V.6** et impliquent un certain nombre de mutations touchant des composants du système télomère/téomérase (**DIA V.4**). Je n'entre pas dans les détails, qui ne sont pas forcément plaisants, juste assez pour

signaler que le syndrome Hoyeraal-Hreiderasson outre un délai développemental et une déficience immunitaire montre une hypoplasie du cervelet. Le Revesz syndrome nous concerne aussi puisqu'il est marqué par une atteinte des vaisseaux de la rétine. Pour ce qui est des déclenchements adultes, ils semblent épargner le système nerveux, mais – on l'aura sans doute compris – ce n'est peut-être pas si clair, ni si définitif, que ça.

Dans le contexte des télomères et des maladies liées à l'âge, je vais maintenant m'appuyer sur l'article de Mary Armanios (*JCI*: 991236-1002, 2013). Après avoir rappelé que la longueur des télomères parentaux détermine celle des enfants, chez les souris comme chez les humains (ce qui pose la question de l'hérédité de la longévité), cette auteure souligne que quand les télomères atteignent une taille critique (courte), cela active une réponse de type « DNA-Damage » qui ressemble à celle qui suit la formation de cassures double brin dans l'ADN (je n'y reviens pas). Il en résulte une mort cellulaire (apoptose) ou un arrêt permanent du cycle (considéré pour les cellules mitotiques comme une entrée en sénescence) suivi souvent de la mort par apoptose.

En fait, ces cellules qui entrent en sénescence présentent aussi une forte modification de leur transcriptome conduisant à la sécrétion de cytokines, chemokines et protéases, un phénotype connu sous le nom de Senescence Associated Secretory Phenotype (SASP), qui joue un rôle dans l'élimination des cellules sénescents mais aussi, possiblement, dans une action sur d'autres types cellulaires. Si nous revenons au schéma général du premier cours, le SASP entre dans la catégorie « altération de la communication cellulaire » (**DIA V.7**). Mais il est notable que le dysfonctionnement des télomères est associé avec une diminution du métabolisme énergétique et une baisse de la sécrétion d'insuline, donc de l'homéostasie glucidique. Bref, comme nous le soulignons dès le 7 octobre, de nombreux items de cette **DIA V.7** sont en interaction puisque qu'à propos de raccourcis-



saient des télomères nous venons d'évoquer l'instabilité génétique (cassure de l'ADN), les dysfonctions mitochondriales, la perte ou sénescence de cellules souches, l'altération des communications cellulaires et une dérégulation de la mesure des nutriments, du glucose en particulier. Je reviendrai sur cette intégration des mécanismes du vieillissement dans le dernier cours de cette année, le 18 novembre.

Les maladies liées au raccourcissement des télomères sont classiquement divisées entre les tissus à renouvellement rapide et les tissus à renouvellement lent (**DIA V.8**). Les désordres des tissus à renouvellement rapide apparaissent plus tôt avec des formes plus sévères. C'est le cas des déficiences immunitaires ou des maladies du système digestif. Rappelons que l'intestin grêle se renouvelle tous les 5 jours chez les humains. Dans les tissus à renouvellement plus lent, comme le poumon ou le foie, les maladies se révèlent plus tardivement et les mécanismes impliqués, même s'ils mènent l'apoptose et à la sénescence sont distincts (**DIA V.8**). Cette différence d'apparition tient au fait que plus une cellule se divise plus elle raccourcit ses télomères et donc plus elle est dépendante de l'activité télomérase. Cela indique très clairement que les cellules souches, ou leur compartiment d'amplification, sont en première ligne quand il s'agit de longévité.

Avant d'en arriver au système nerveux proprement dit, j'aimerais faire un lien entre le stress au début de la vie et la longueur des télomères. Pour ce, je renvoie à l'article de Idan Shalev (*Bioessays* 34: 943-952, 2012). On sait en effet qu'un stress au début de la vie peut avoir des conséquences importantes et négatives sur la santé aux périodes ultérieures de l'existence. Cela implique des modifications durables des structures biologiques, modifications dont une composante épigénétique semble évidente. Il existe aujourd'hui de nombreuses études qui s'efforcent de caractériser de telles modifications épigénétiques, dans des cas de « child abuse » conduisant à des tendances suicidaires plus tard dans l'existence ou à la reproduction de ces conduites abusives une fois atteint l'âge adulte.

Selon cet auteur, des télomères plus courts et subissant une érosion plus rapide sont associés à un risque élevé de morbidité et de létalité. Il semble par exemple que des individus de plus de 60 ans avec des télomères courts au niveau des cellules sanguines présentent un plus haut risque de mortalité associées à des maladies cardiaques ou infectieuses. Inversement, des études faites sur des centenaires et leurs descendants suggèrent que les télomères de leurs leucocytes sont plus longs – en moyenne – que ceux d'individus contrôles. Des télomères longs ont aussi été associés à une protection contre des maladies liées à l'âge, dont certaines détériorations cognitives.

Plusieurs travaux publiés depuis 2010 suggèrent un lien entre stress au cours de l'enfance et raccourcissement des télomères dans les cellules sanguines. Ces études sont cependant fragiles et parfois battues en brèche du fait de multiples limitations dont trois semblent importantes aux auteurs de cet article. D'une part les faits (stress, abus sexuel, etc.) sont le plus souvent rapportés par l'individu qui dit les avoir subis et peuvent être sujets à caution. D'autre part, on ne peut pas suivre le raccourcissement des télomères dans la durée et surtout tout au long de la période qui sépare le stress du stade adulte auquel les cellules ont été prélevées. Enfin, du fait même de cette durée et des conditions de vie (par exemple une santé altérée à la suite de cette perturbation au cours de l'enfance), le raccourcissement de la longueur des télomères pourrait être une conséquence de ces conditions, ultérieures au stress lui-même.

De ce point de vue, une expérience longitudinale récente sur des enfants exposés à un environnement violent est intéressante en ce qu'elle suggère que les effets du stress sont cumulatifs et donc supérieurs chez des individus ayant subi plusieurs types de violence (familiale, à l'école, etc.) avec une forte érosion de la longueur des télomères (prélevement au niveau de la muqueuse buccale) entre 5 et 10 ans. Si ces données vont dans le sens d'une corrélation, les mécanismes restent très difficiles à



identifier. En fait, ce qu'il faudrait, là encore je suis les auteurs, est identifier le lien entre stress infantile, stress tout court et raccourcissement accéléré des télomères, avec une focalisation sur les modifications génétiques et épigénétiques. Une voie de recherche intéressante est la maturation du système immunitaire cérébral, avec l'implication possible (certains travaux le suggèrent) de processus inflammatoires et du stress oxydatif.

La réponse inflammatoire est en effet induite par le stress et cela a été observé chez les enfants, de même qu'il a été observé que des stress dans l'enfance augmentent chez l'adulte la réponse inflammatoire aux stress psychologiques. L'inflammation est associée à une augmentation de la prolifération des cellules immunitaires et donc pourrait expliquer très simplement le raccourcissement des télomères dans les cellules de ce système, si souvent utilisées. On ne peut non plus ignorer que le raccourcissement des télomères et l'entrée en sénescence entraîne la sécrétion des interleukines et chemokines (senescence-associated secretory phenotype ou SASP), ce qui amplifie le phénomène. Le stress oxydatif constitue une autre voie potentielle pour l'érosion des télomères (**DIA V.9**) avec un lien avec les cassures de l'ADN et l'activité mitochondriale. En fait la lecture de l'article indique beaucoup de pistes mais nous laisse sur notre faim en soulevant plus de questions encore, à commencer par la caractérisation des types de stress, la méthode de mesure de la longueur des télomères dans une population de chromosomes, et le type cellulaire choisi pour effectuer cette mesure. Cela ne veut pas dire qu'il faut se désintéresser d'une question à laquelle nombre d'études y sont consacrées, dont je vous illustre un échantillon (**DIA V.10**).

Nous y reviendrons donc peut-être au cours des prochaines années, mais en attendant je vais m'attarder sur quelques articles se concentrant sur des cibles qui me semblent importantes si l'on parle de troubles mentaux, c'est-à-dire les celles souches neurales, même si on ne peut totalement éliminer un rôle important des macrophages céré-

braux, ou microglies, en relation avec la réponse immunitaire et l'inflammation, les troubles psychiatriques aussi. Je vous renvoie aux cours des années 2011 et 2012.

Le premier article est un peu à part et traite du lien possible entre neurogenèse, télomères et schizophrénie. Je voudrais d'abord revenir sur la neurogenèse adulte chez les humains, tout particulièrement au niveau de l'hippocampe, structure qui est le siège d'une telle neurogenèse et dont nous savons qu'elle est impliquée dans nombre de fonctions cognitives. La **DIA V.11** vous rappelle que les cellules glutamatergiques de l'hippocampe se renouvellent et que ce renouvellement peut être modulé par le comportement, par exemple l'exercice physique. Ce renouvellement est continué chez l'adulte et a été quantifié par le groupe de Jonas Frisen (Spalding *et al.*, *Cell* 153: 1219-1227, 2013), travail commenté par Kheibek et Hen (*Cell* 153: 1183-1184, 2013).

Lequel commentaire commence par rappeler l'histoire de la découverte de la neurogenèse adulte (et des résistances que cette découverte a rencontré) sur laquelle je ne reviens pas pour y avoir consacré plusieurs heures en 2010. Mais même si le fait est acquis, deux questions restaient en suspens, celle de l'impact de ce renouvellement et celle de son déclin éventuel au cours du vieillissement. Pour évaluer l'étendue de la neurogenèse chez les humains, les auteurs ont utilisé une technique qui leur a permis de publier en 2012 que les neurones du bulbe olfactif ne sont pas renouvelés chez l'adulte (ou très peu), contrairement à ce que l'on constate chez la souris ou le rat. Cette technique repose sur les hauts niveaux de  $^{14}\text{C}$  atmosphérique générés par les essais nucléaires à l'air libre entre 1955 et 1963 avant que ceux-ci ne soient bannis. Ces niveaux ont donc baissés depuis 1963 et comme le  $\text{CO}_2$  atmosphérique radioactif entrant dans la chaîne alimentaire via la photosynthèse permet au  $^{14}\text{C}$  d'être incorporé dans l'ADN au cours de la division cellulaire, cela permet de dater les cellules et de mesurer leur taux de prolifération.



La première surprise est que, contrairement à ce qu'on observe chez les rats ou les souris chez qui la neurogenèse décline avec l'âge, l'hippocampe humain génère des neurones du gyrus denté à un taux relativement constant jusqu'à des âges avancés (**DIA V.12**) et que tous les neurones de cette structure sont sujets au renouvellement, et pas seulement une sous population. Les mesures et leur modélisation suggèrent que 700 cellules sont renouvelées par an, soit un turnover à 1,75 % avec un déclin modeste au cours du vieillissement. Sur cette même **DIA V.12**, vous constaterez que le renouvellement semble nul dans le bulbe olfactif humain et qu'il diminue considérablement chez les rongeurs, même s'il part d'un niveau plus élevé. De toute façon ces comparaisons entre espèces sont très délicates et il serait plus informatif d'avoir des données chez d'autres primates que *sapiens*. Il reste qu'on doit se poser la question de la fonction de ce renouvellement et de la porte qu'il ouvre pour des interventions thérapeutiques face aux troubles cognitifs et psychologiques liés – ou non – au vieillissement.

Cette constatation réconfortante nous ramène à nos télomères et aux quelques articles que je vais vous présenter. Ils sont intéressants mais se fondent sur des modèles animaux et nous venons de voir que tout ce qui est vrai pour l'humain ne l'est pas forcément pour la souris, et réciproquement. C'est une donnée qu'il faut toujours avoir en tête dès lors qu'on s'intéresse aux pathologies proprement humaines. Ce qui est le cas pour le premier article, puisque nous nous penchons sur un modèle murin de schizophrénie. Je ne reviens pas sur ce que j'ai raconté au cours des deux dernières années et des difficultés à comprendre la signification réelle des modèles animaux (ce qui veut dire leurs limites) quand il s'agit de maladies psychiatriques aussi complexes que la schizophrénie, ou plutôt les schizophrénies.

Le premier article (Wolf *et al.*, *Brain, Behavior, and Immunity* 25: 971-980, 2011), part d'un modèle murin de schizophrénie qui consiste en l'injection de poly rI:rC pendant la gestation (induction d'une inflammation maternelle touchant l'embryon

selon un modèle déjà discuté en 2011 et 2012 à propos des travaux de Paul Patterson). Les auteurs partent de l'observation de changements positifs dans les symptômes de patients à la suite de programmes d'exercices physiques. Ils spéculent aussi à partir de papiers théoriques liant certains symptômes de la maladie à la physiologie de l'hippocampe et la neurogenèse adulte dans l'hippocampe. Ils proposent qu'un raccourcissement des télomères dans les NPC (neural precursor cells) pourrait avoir un rôle dans la maladie.

Il est connu que la télomérase (TERT) est fortement exprimée dans les NPC au cours du développement et chez l'adulte (chez les rongeurs). Chez les souris déficientes en TERT, les télomères raccourcissent avec l'âge et la neurogenèse est interrompue dans les NPC de la zone subventriculaire. Parallèlement les comportements qui dépendent de la neurogenèse, y compris de celle qui a lieu dans l'hippocampe, sont affectés. Finalement, toujours dans le sens de l'hypothèse, mais de façon encore plus directe, il existe des publications qui documentent un raccourcissement accéléré (ils raccourcissent avec l'âge) des télomères dans les leucocytes périphériques de patients souffrant de troubles de l'humeur ou de schizophrénie, avec pour ces derniers une diminution de TERT.

Donc 50 jours après l'injection de rI:rC les animaux ont été soumis à un test de course volontaire sur la roue au test de pre-pulse inhibition (un léger signal (68, 72, 76, 80 db) diminue la réponse de sursaut à un signal plus fort (100 db) et ultérieur de 30 à 500 msec). La **DIA V.13** (A) illustre que la course diminue légèrement la réponse au signal utilisé dans le test de pre-pulse inhibition (PPI), mais le point important est que la baisse de l'inhibition (utilisée comme un des tests du phénotype schizophrénie) qu'on observe après PolyI:C (en B) est effacé par l'exercice physique (ici la course dans la roue). Le panel C démontre que les souris sont normales sur le plan moteur mais désorientées et hyperactives (mesuré le nombre de redressements) et que cet phénotype est aussi corrigé par l'exercice physique.



Étant donné l'effet bénéfique du sport chez les souris les auteurs ont mesuré la neurogenèse au niveau de l'hippocampe. Ils ont déterminé le nombre et le phénotype des cellules nouvellement générées 4 semaines après la dernière injection de BrdU et à la fin de la période de course (10 jours de course volontaire). Les doubles marquages BrdU/Nestin, BrdU/DCX, BrdU/NeuN identifient respectivement les cellules en phase précoce de mitose, en phase tardive et en phase post-mitotiques. Ki67 identifie les cellules en mitose au moment du sacrifice (**DIA V.14**). Cette **DIA V.14** illustre l'existence d'une baisse du nombre des cellules en prolifération (Ki67, panel B) et une restauration par la course. Un autre effet intéressant concerne la maturation des cellules. En effet, le poly I:C a un effet surtout sur les cellules DCX et NeuN (pas sur les cellules nestin), donc un effet sur la maturation des cellules générées (voire leur survie). Cela est particulièrement visible dans les histogrammes des pourcentages cumulés (C à droite), comme est bien visible l'effet bénéfique de l'exercice physique.

Finalement, quid des télomères et de TERT ? La longueur des télomères et l'activité TERT ont été mesurées sur des cellules exprimant la protéine de surface PSA-NCAM et purifiées par FACS sur cette base. Un recouvrement de 100 % avec les cellules DCX indique qu'il s'agit de neuroblastes en division tardive (avant la maturation définitive en neurones exprimant NeuN). Quand on suit l'activité TERT entre le premier et le 60<sup>e</sup> jour post-natal, on constate une baisse de cette activité chez les animaux contrôles et chez les animaux poly I:C avec une légère restauration liée à l'exercice physique (**DIA IV.15**). Maintenant, si on regarde à P60 la longueur des télomères par hybridation in situ (FISH avec un PNA FITC-CCCTAA complémentaire de TTAGGG), on constate une diminution de la longueur des télomères, mais la course à pied est sans effets sur cette diminution ce qui suggère que l'augmentation faible de l'activité TERT n'est pas suffisante (mais alors d'où vient l'amélioration comportementale) ou, et cela nous ramène à une remarque antérieure, que cette augmentation touche seule-

ment quelques télomères (les plus courts) et que cela n'est pas mesurable même si les effets de ce rallongement limité sont bénéfiques.

Si nous reprenons l'ensemble de ces données, on constate donc un effet bénéfique sur le comportement avec une corrélation sur la neurogenèse et l'activité de la télomérase (avec des doutes sur la longueur des télomères), mais il faut bien admettre que nous restons là au niveau de corrélations. Une expérience importante eut été de vérifier que cette amélioration est perdue si on bloque la prolifération. Par ailleurs, deux éléments sont assez intéressants, le premier est qu'il existe une baisse de l'activité TERT avec le temps dans les cellules DCX des animaux contrôles et que si l'exercice physique augmente légèrement cette activité, cela n'a pas d'effets mesurables sur la longueur moyenne de leurs télomères.

Un caveat important est que cette expérience n'a été faite que sur le compartiment DCX (d'autres cellules prolifèrent comme les cellules souches, les cellules du compartiment d'amplification et les neuroblastes) et que de toute façon, chez la souris en tout cas, 90 % des neurones nouvellement formés meurent avant de s'intégrer dans le réseau de neurones, les autres devenant post-mitotiques et donc ne raccourcissant plus leurs télomères (nous en avons parlé dans les années précédentes). Et ce n'est pas parce qu'elles meurent que ces cellules ne peuvent pas avoir une activité importante, trophique et transitoire par exemple. Évidemment on peut aussi supposer que l'entraînement physique des souris est de trop courte durée (ce que suggèrent les auteurs) pour avoir un effet sur la longueur des télomères. Mais outre que cette population cellulaire n'est peut-être pas la plus intéressante, il faut avant tout, excusez la répétition, tenir compte des travaux qui contestent l'intérêt de la mesure moyenne des télomères puisque la TERT ne touche pas tous les télomères mais préférentiellement les télomères les plus courts qui doivent être rallongés en premier (sinon c'est la sénescence et l'apoptose). Si tel est le cas la mesure moyenne de la longueur des télomères n'a peut être pas de véritable signification physiologique.



Je vais finir cette discussion en revenant à la zone subventriculaire et à la question des télomères à travers un article assez ancien, mais intéressant pour ce qui est du rapport entre télomères et vieillissement, même s'il s'intéresse non pas aux cellules de l'hippocampe, mais aux cellules de la zone subventriculaire (**DIA V.16**). Chez la souris, contrairement à *sapiens* (comme nous venons de le voir si nous suivons Frisén), ces cellules contribuent au renouvellement de populations neuronales spécifiques du bulbe olfactif, les cellules periglomérulaires et les cellules des grains (flèches **DIA V.16**). Les précurseurs sont générés à partir de cellules souches qui expriment un marqueur astroglial, la GFAP, mais aussi des facteurs de transcription spécifiques comme Sox2 (présent dans toutes les cellules souches) et Pax6. Ces cellules se divisent lentement, c'est là encore une caractéristique des cellules souches et c'est important car cela peut préserver leurs télomères, surtout si elles sont riches en télomérase. Mais elles sont amplifiées au niveau d'un compartiment d'amplification où on imagine facilement un raccourcissement important des télomères. Ce qui veut dire que les neuroblastes qui continuent de se diviser poursuivent cette action de réduction jusqu'à ce qu'on passe à un neurone post-mitotique avec une stabilité de la taille des télomères, mais aussi, nécessairement, avec des inégalités entre neurones. Enfin, c'est ce qu'on peut penser sur la base de la distribution de la taille des télomères (pour l'hippocampe **DIA V.16**). Nous verrons que cette inégalité peut avoir des conséquences fonctionnelles car les télomères semblent jouer un rôle dans la différenciation et la morphologie des neurones.

C'est à partir de cette réflexion sur la possibilité d'une signification physiologique ou physiopathologique de cette taille que j'ai retrouvé l'article de Ferron *et al.* (*J. Neurosci.* 29: 14394-14407, 2009) qui a l'intérêt de porter, en effet, l'accent sur la différenciation des neurones ayant de petits télomères et sur le « trouble » que cela peut induire, même si ces neurones n'en meurent, ou pas tout de suite (comme dans les animaux malades de la peste). En bref, la question est de savoir si certains neurones peuvent naître vieux, puisqu'après tout « on a

l'âge de ses télomères ». Cet article commence par rappeler que le vieillissement chez les mammifères est associé à une réduction de l'activité des cellules souches dans différents organes, avec pour conséquence une modification du turnover cellulaire et donc une diminution de la réparation des tissus. Les auteurs rappellent que la neurogenèse adulte décline avec l'âge (en tout cas chez les rongeurs, voir plus haut) même si les raisons de ce déclin sont peu claires et probablement variées, incluant des modifications des signaux intrinsèques et des signaux fournis par la niche.

Parce que les auteurs s'y réfèrent souvent, je vais commencer par un article plus ancien du même groupe (Ferron *et al.*, *Development* 131: 4059-4070, 2004) qui décrit le rôle du raccourcissement des télomères dans la neurogenèse adulte. Comme il y a une différence entre neurogenèse embryonnaire (peu affectée) et adulte, je discuterai principalement la neurogenèse adulte, ce qui est logique dans le contexte d'un cours sur la longévité. Je commence par rappeler que les souris mutante pour TERC (*Terc* *-/-*), le composant ARN qui est copié par la reverse transcriptase TERT (**DIA V.17**) sont viables et se reproduisent mais que du fait de la perte d'environ 5kb de télomère par génération, la survie diminue au fil des générations avec des instabilités cytogénétiques importantes. On peut cependant travailler jusqu'à la génération 4 (G4).

Sur la **DIA V.18**, on constate que le marquage BrdU au niveau de la SVZ est fortement réduit chez les souris G4 et que le nombre de progéniteurs l'est aussi (PSA-NCAM). Le comptage montre une baisse d'environ 50 % dans les régions antérieures ou postérieures. On note aussi une atrophie du bulbe, le striatum – structure cérébrale sous-corticale – restant d'un volume normal. Je passe sur certains aspects du papier consacrés à la seule neurogenèse embryonnaire, en particulier au niveau du ganglion dorsale rachidien (un ganglion sensoriel périphérique) pour discuter la réponse des cellules embryonnaires et adultes mises dans les mêmes conditions mitogéniques. La technique consiste à



prélever les cellules de la SVZ, à les dissocier, puis à observer leur prolifération sous la forme de neurosphères, la taille des neurosphères indiquant la capacité proliférative des cellules.

La **DIA V.19** compare la distribution des tailles des neurosphères (primaires, ou secondaires ce qui veut dire nées d'une dissociation des neurosphères primaires) et on constate aisément que dans la 4<sup>e</sup> génération de souris mutantes (âgées de 4 à 5 mois), les sphères sont majoritairement d'un diamètre inférieur à 60µm ce qui n'est évidemment pas le cas des sphères préparées à partir de souris sauvages. Il en va de même pour la vitesse de croissance et l'incorporation de BrdU qui illustre et quantifie la division cellulaire. Il n'en va pas de même pour des neurosphères préparées à partir de souris embryonnaires (E14,5) qui semblent parfaitement normales même si cette fois-ci c'est la 5<sup>e</sup> génération de souris mutantes qui a été testée (**DIA V.20**). Cette différence pourrait s'expliquer par le fait que les cellules adultes sont passées par un grand nombre de divisions et que leurs télomères en sont encore plus raccourcis que chez l'embryon, même quand il s'agit de souris mutantes.

Ce qui nous amène à jeter un coup d'œil sur la longueur des télomères des cellules souche neurales chez les souris sauvages et mutantes. Cela peut être fait par les techniques d'hybridation d'une sonde fluorescente comme nous l'avons vu plus haut. Les mesures sont présentées dans le **DIA V.21**. On peut y constater tout d'abord que la longueur des télomères répond à une distribution, elle n'est pas homogène. Nous le savons, mais c'est évidemment un point à rappeler et à conserver en mémoire. Ensuite, chez les souris sauvages, on constate que les télomères raccourcissent, en moyenne, entre l'embryon et l'adulte, ce qui est conforme avec l'hypothèse de l'existence d'un certain nombre de divisions entre les deux stades. Si l'on regarde les mutants, il semble que la longueur de leurs télomères est diminuée aux deux stades embryonnaire et adulte (en comparaison avec les souris sauvages) mais aussi que les télomères de l'adulte muté sont plus courts que ceux

de l'embryon. Cette différence pourrait expliquer pourquoi les cellules embryonnaires des mutants, contrairement aux cellules adultes, répondent correctement aux conditions permettant la prolifération. En fait les cellules embryonnaires des mutants ont l'âge télomérique des cellules adultes sauvages. Elles sont nées adultes, et on a donc bien l'âge de ses télomères.

Nous l'avons souligné plusieurs fois, le raccourcissement des télomères, au-delà d'un certain seuil, active les voies de signalisation associées avec la lésion de l'ADN. Un des « read-out » de cette voie est l'induction de p53, protéine activée au cours de la sénescence et capable d'induire la mort cellulaire. De ce fait, les auteurs ont recherché l'expression de p53 dans des cellules en culture, adultes et embryonnaires, sauvages ou mutées. On voit clairement (**DIA V.22**) que p53 n'est pas induit chez les cellules de l'embryon (même muté) mais l'est fortement chez les cellules d'adulte muté. Cette induction est corrélée avec une perte des capacités prolifératives, donc une entrée en sénescence (graphe en haut à droite). En revanche, il ne semble pas que la mutation induise une forte augmentation de la mort cellulaire.

Je pourrais continuer sur les cellules embryonnaires et vous présenter le résultat surprenant de leur aptitude à proliférer même avec des télomères courts, la présence de p53 et de fortes altérations cytogénétiques (**DIA V.23**). J'y reviendra de façon seulement allusive car développer ce thème nous entrainerait un peu trop loin de l'axe principal du cours et je vais passer à la question des télomères et de la différenciation que j'avais commencée d'introduire avant de faire un détour par l'article que nous venons de commenter.

Je reviens donc sur Ferron *et al.* (*J. Neurosci.* **29**: 14394-14407, 2009) pour rappeler que si c'est bien de fabriquer de nouveaux neurones, il faut aussi que ces neurones se différencient et s'intègrent dans les réseaux neuronaux préexistants. Cela est vrai de l'hippocampe comme du bulbe olfactif et nous



continuerons sur ce dernier même si, selon Frisé, notre neurogenèse est plutôt à chercher du côté de l'hippocampe. Une première observation est que la neurogenèse dans le bulbe décline avec l'âge (chez les rongeurs puisque pour nous...). En comparant le marquage BrdU avec les marqueurs (calretinin pour les cellules des grains ou TH pour les cellules periglomérulaires **DIA V.24**), on remarque que la densité de cellules marquées (BrdU-LRCs pour BrdU-Label Retaining cells) est plus faible chez les souris âgées (CR+ sur **DIA V.25** en A, A' et B pour quantification). Au-delà, on constate de façon intéressante que les dendrites semblent aussi plus courts à 12 mois qu'à 2 mois. À vrai dire cela avait aussi été remarqué dans le gyrus denté de l'hippocampe en 2005 (Rao *et al.*, *Eur. J. Neurosci.* 21: 464-476, 2005) mais nous restons sur la SVZ.

Un des avantages de cette structure est qu'il est facile de préparer des cellules de la SVZ et de les mettre en culture où elles produisent des neurosphères comme nous venons de le voir (c'est moins facile pour le gyrus denté adulte). L'ensemencement sur des substrats particuliers en présence de certains facteurs de croissance induit la différenciation des cellules souches neurales de ces neurosphères en différents types cellulaires, neurones, astrocytes et oligodendrocytes et les neurones peuvent être visualisés par marquage de la  $\beta$ III-tubuline (**DIA V.25** en C). Quand on effectue cette opération à 2 mois et 12 mois, on constate que le nombre de neurones est identique dans les deux conditions mais que le celui des extrémités dendritiques est diminué, passant de 12,4 à 9,0 par neurone (c'est dans le texte du papier). Cela suggère une moindre capacité des dendrites à former des branchements.

Parallèlement à ces études morphologiques, les auteurs ont mesuré l'activité de la télomérase dans les régions neurogéniques (en fait ils ont pris les éminences ganglionnaires et la SVZ) et constaté que cette activité diminue avec le temps, comme cela est illustré dans le panneau D et E de la **DIA V.25**. Que l'activité diminue entre E14,5 et P3 n'est pas étonnant puisque les cellules des éminences gan-

glionnaires deviennent post-mitotiques pendant cette période, mais la diminution entre 2 mois et 1 an a beaucoup plus de sens, car elle suggère une érosion essentiellement au niveau des cellules souches neurales de la SVZ, confirmée par le raccourcissement des télomères (panneau E de la **DIA V.25**). Je reviendrai sur ce point car il est évident que ce sont des effets faibles, mais il y a là un biais lié à la longueur anormale des télomères des souris de laboratoire. J'y reviens immédiatement. ■