

Processus morphogénétiques

M. Alain PROCHIANTZ, membre de l'Institut
(Académie des sciences), professeur

ENSEIGNEMENT

Cours : Longévité cérébrale, suite et fin^a

Rappel du cours 2013-2014 et nouveautés sur les thèmes abordés

Le cours est disponible en texte intégral, avec les supports visuels, sur le site web du Collège de France : le lecteur désireux d'en savoir plus peut s'y reporter.

J'ai d'abord rappelé que la question de la longévité doit être abordée sous l'angle d'un renouvellement permanent des structures vivantes, aux niveaux moléculaires et cellulaires et présenté les 9 marqueurs du vieillissement définis par Lopez-Otin et ses collègues (Lopez-Otin *et al.*, 2013) :

- 1) l'instabilité génomique ;
- 2) le raccourcissement des télomères ;
- 3) les altérations épigénétiques ;
- 4) les atteintes à l'équilibre protéique (protéostasie) ;
- 5) la dérégulation des systèmes de mesure des nutriments (dont le glucose) ;
- 6) les dysfonctions mitochondriales ;
- 7) la sénescence cellulaire ;
- 8) l'épuisement des cellules souches ;
- 9) l'altération des communications intercellulaires.

Chaque jour, les cellules sont soumises à plusieurs centaines de milliers de lésions qui touchent protéines, lipides, ADN. Pour s'en tenir au système nerveux, on compte environ 200 déaminations de cytosines, 3 000 méthylations de guanines,

a. Les cours sont disponibles en audio et vidéo, ainsi que le texte intégral et les supports de cours, sur le site internet du Collège de France : <http://www.college-de-france.fr/site/alain-prochiantz/course-2014-2015.htm> [NdÉ].

10 000 dépurations spontanées, jusqu'à 100 000 lésions par oxydation, 10 000 cassures simple brin et de 10 à 50 cassures double brin (DSB) par jour et par cellule. Pour les DSB, cela semble peu, mais ce sont les plus toxiques des cassures probablement la base de la plupart des « maladies » du vieillissement cérébral. Avec l'âge, s'accumulent les lésions non réparées ou réparées avec des modifications de séquences et épigénétiques défavorables.

L'analyse des gènes exprimés dans le cerveau humain (*post mortem*) démontre, dès 40 ans, une baisse de l'expression de gènes impliqués dans la mémorisation et une augmentation de l'expression de gènes liés au stress (Lu *et al.*, 2004) avec une nette détérioration entre 60 et 70 ans. Les gènes dont l'expression diminue présentent des guanines oxydées dans leurs promoteurs.

Des modifications physiologiques peuvent être induites en aigüe par des agents DNA-toxiques. Par exemple, l'exposition de cellules à H₂O₂, et la formation qui s'ensuit de DSB, induit un recrutement de la sirtuine 1 (SIRT1) sur les sites lésés. Cette relocalisation – essentielle pour la réparation de l'ADN – a, si elle se poursuit, des effets globaux sur la transcription. Les changements transcriptionnels observés dans ces conditions sont similaires à ceux observés dans le cerveau de souris au cours du vieillissement.

Des manquements à la réparation de l'ADN ont été observés dans des maladies neurodégénératives qui ne se déclarent qu'avec l'âge. En effet, même dans leurs formes génétiques, ces maladies se déclarent tardivement. Cela est vrai de la maladie de Huntington, de la maladie de Parkinson (PD) ou de la maladie d'Alzheimer (AD). On proposera que les modifications, avec l'âge, de l'hétérochromatine sensibilisent aux mutations présentes. Dans cette idée, Suberbielle et ses collègues (Suberbielle *et al.*, 2013) proposent que l'AD serait associée à une déficience de la réparation des cassures normalement provoquées dans l'ADN par l'activité cérébrale.

Introduisons la souris p25/Cdk5. Cdk5 est une kinase (phosphoryle les serines et thréonines) dont l'activité nécessite une association avec la protéine p35. Dans les cerveaux AD, p35 est clivée en p25 et l'association p25/Cdk5 change à la fois la localisation de Cdk5 et la nature des protéines qu'elle phosphoryle. Une souris dans laquelle p25 est induite dans le cerveau antérieur récapitule de nombreux traits AD, dont l'accumulation du peptide β A4 et des *neurofibrillary tangles* composés d'agrégats de la protéine Tau d'assemblage des microtubule. Mais, ce qui apparaît en premier est une augmentation des DSB (Kim *et al.*, 2008 ; Kim *et al.*, 2007). Ces cassures pourraient être attribuées à une inhibition des histone-déacétylases de classe I (HDAC1).

L'action anti-âge des déacétylases, dont les sirtuines, est présente chez tous les métazoaires. Les histone-déacétylases (HDAC) retirent une fonction acétyle des histones, ce qui induit une compaction de la chromatine. La première HDAC identifiée, HDAC1, joue un rôle dans la répression de gènes du cycle cellulaire. Parallèlement, l'inactivation expérimentale de HDAC1 induit une décompaction de la chromatine et l'expression illégitime de gènes.

Neurogenèse adulte

Dans un article récent, Peter J. McKinnon (McKinnon, 2013) rappelle que les humains fabriquent 700 nouveaux neurones par jour dans l'hippocampe (turnover de 1,75 %). Jonas Frisen et ses collègues avaient démontré que la neurogenèse est importante dans l'hippocampe humain, où elle dure toute la vie, mais très faible

dans son bulbe olfactif. Cela nous distingue des souris et des rats chez qui les neurones GABA du bulbe olfactif sont renouvelés à partir des cellules souches neurales de la zone subventriculaire (SVZ).

Frisen et ses collègues viennent de proposer (Ernst et Frisen, 2015) que chez les humains les neurones générés dans la SVZ ne vont pas dans le bulbe olfactif mais dans le striatum, où ils donnent naissance à des interneurons. On peut donc proposer l'existence de voies de migration différentes entre les souris et les humains. Cette interprétation a été mise en doute par des chercheurs chinois (Wang *et al.*, 2014).

L'affaiblissement de la neurogenèse avec l'âge est abordé dans l'article de Behrens et de ses collègues (Behrens *et al.*, 2014) à travers les questions des niches et de la vascularisation. Les altérations épigénétiques qui répondent aux lésions de l'ADN induisent la protéine p16^{Ink4a}, marqueur de la sénescence cellulaire. Au cours du vieillissement (souris), l'expression de p16^{Ink4a} augmente alors que la délétion du gène stimule la capacité régénérative des cellules souches neurales. C'est un mécanisme intrinsèque, mais les cellules souches vieillissantes affectent aussi leur propre niche via les facteurs qu'elles sécrètent. À commencer par des cytokines pro-inflammatoires et des protéases qui détruisent l'architecture du tissu, ce qui porte le nom en anglais de SASP ou *Senescence-Associated Secretory Phenotype*. Le système immunitaire joue là un rôle très important. Efficace pour éliminer les cellules sénescents, il perd cette capacité avec le temps.

Par-delà les niches, le système physiologique entier répond aux lésions du génome et influe sur la physiologie des cellules souches. Avec l'âge, les systèmes endocriniens qui contrôlent la croissance déclinent. L'axe de la croissance somatique (somatotropique) est contrôlé par l'hormone de croissance (GH) et l'IGF-1. La GH sécrétée par l'hypophyse stimule la production d'IGF-1 dans les tissus cibles. Laquelle IGF-1 stimule la survie et la croissance cellulaire. On peut donc prévoir que le renforcement de l'axe somatotropique aurait des effets positifs sur le vieillissement. Mais il faudrait aussi, dans cette approche, bloquer la formation de tumeurs induites par l'augmentation de l'activité somatotropique.

Vieillesse précoce

Je reviens sur le phénotype progeria et les laminopathies traités en 2013 pour étendre à d'autres syndromes de vieillissement pathologique (Ghosh et Zhou, 2014). Nombre de mécanismes cellulaires qui conduisent à un vieillissement normal ou pathologique soulèvent la question de l'intégrité du génome. De ce point de vue, le *Hutchinson-Gilford Progeria Syndrom* (HGPS) est paradigmatique. Cette maladie est causée par une mutation dans le gène de la lamine A. Les premiers effets touchent la morphologie nucléaire avec une suite d'effets catastrophiques aux niveaux nucléaire, cellulaire et systémique, qui prennent tous leur origine dans la déficience des systèmes de réparation de l'ADN. Cette instabilité génomique comme source du vieillissement a été constatée dans d'autres syndromes.

Le HGPS touche fortement le remodelage de la chromatine nécessaire à la réparation de l'ADN. L'activité d'un grand nombre de facteurs chromatiniens dépend de l'ATP. Le complexe NURD (*Nucleosome Remodeling Deacetylase*) de remodelage de la chromatine joue là un rôle essentiel. Ce complexe intervient dans la déacétylation d'histones (HDAC1 en fait partie) et dans la fixation aux CpG méthylés. Cette méthylation contribue souvent à la répression de l'expression des

gènes au voisinage de ces îlots CpG méthylés. Un mode d'action de la répression est la fixation de MeCP2, une protéine mutée dans le syndrome de Rett.

Ce vieillissement pathologique peut servir de modèle au vieillissement normal. En effet, la progérine, forme pathologique de la lamine A, existe chez les individus sains et s'accumule avec le temps. La lamine A est peu exprimée dans les neurones mais le cerveau n'est pas constitué que de neurones et nous connaissons l'importance des macrophages et des cellules vasculaires dans la physiologie cérébrale. De là à suggérer une composante vasculaire dans le vieillissement cérébral, il n'y a qu'un pas.

Il a récemment été démontré que la rapamycine, un antibiotique, abolit les phénotypes nucléaires dans des fibroblastes HGPS en culture et diminue leur sénescence en éliminant la progérine par voie d'autophagie. La rapamycine a pour cible les deux complexes mTORC1 et mTORC2 (TOR pour *Target/cible of Rapamycin*). C'est dans le domaine du cancer que la rapamycine, ou ses analogues, ont été utilisés en premier. En effet, les cellules transformées ont un fort métabolisme et donc une demande importante en nutriments dont la capture et le métabolisme sont directement contrôlés par mTORC1. En période de diète, mTORC1 favorise la glycogénolyse musculaire et hépatique et la libération des acides gras à partir des réserves lipidiques. En présence de nutriments, il a l'effet inverse.

La rapamycine a été utilisée pour certaines maladies du système nerveux. L'inhibition de mTORC1 est protectrice dans des modèles d'AD et PD. Cet effet a été lié à l'importance des protéines mal conformées ou agrégées dans ces maladies, mais aussi au fait que mTORC1 stimule leur biosynthèse et bloque l'autophagie qui contribue à s'en débarrasser. Cela nous conduit à la longévité : l'inhibition de la signalisation par mTOR augmente la survie des invertébrés, de la levure à la mouche. Chez des souris traitées à partir de 4, 13 ou 20 mois, et 12 mois durant, on constate une diminution de signes classiques du vieillissement, dont la diminution de l'activité exploratoire, de l'apprentissage spatial ou de la mémorisation.

Les sirtuines

Les sirtuines de mammifères (déacétylase NAD⁺ dépendante) sont au nombre de 7, chacune avec une localisation cellulaire propre et un rôle physiologique singulier (Choi et Mostoslavsky, 2014). Ce qui les lie est la fonction de déacétylation et une dépendance au NAD⁺ d'origine mitochondriale, ce qui marque une relation avec le métabolisme énergétique de la cellule. Les sirtuines jouent aussi un rôle dans la réparation de l'ADN par recombinaison homologue (RH) en régulant l'activité de plusieurs protéines dont Rad51 et par NHEJ (raboutage de l'ADN dans les cellules post-mitotiques), via une coopération avec ATM et HDAC1 qu'elles déacétylent sur les sites des DSB (voir le cours 2013-2014^b). SIRT6 est assez proche de SIRT1 dans sa double fonction de réparation par RH et NHEJ.

Chez l'adulte, SIRT1 module la plasticité synaptique et la mémorisation, et son action est positive dans des modèles animaux de maladies neurodégénératives dont

b. Le résumé du cours 2013-2014 est disponible dans l'*Annuaire du Collège de France 2013-2014, Résumé des cours et travaux*, 114^e année, Paris, Collège de France, 2015, p. 341-361, et aussi en édition électronique : <http://annuaire-cdf.revues.org>, à paraître. Les enregistrements audio et vidéo des cours, ainsi que le texte intégral et les supports de cours, sont disponibles sur le site internet du Collège de France : <http://www.college-de-france.fr/site/alain-prochiantz/course-2013-2014.htm> [NdÉ].

AD, PD et Huntington (Herskovits et Guarente, 2014). Les souris invalidées pour SIRT1 ont des dendrites plus courts et de moindre complexité, ainsi que de nombreux gènes importants pour les fonctions synaptiques et métaboliques dérégulés. L'explication moléculaire actuelle est que SIRT1 interagit avec le facteur de transcription YY1 qui réprime l'expression de miR-134, un micro-ARN qui réprime la traduction des ARN messagers codant pour le BDNF (*Brain Derived Neurotrophic Factor*) et CREB (*cAMP Response Element Binding Protein*), deux protéines importantes dans l'apprentissage. Au-delà des fonctions synaptiques, il faut introduire les fonctions endocriniennes à travers le rôle de SIRT1 dans l'hypothalamus, une structure cérébrale qui régule des fonctions physiologiques essentielles dont la reproduction, la thermorégulation, le rythme circadien et la prise alimentaire.

Mitchell et ses collègues (Mitchell *et al.*, 2014) s'intéressent à l'influence de SIRT1 sur la longévité de souris nourries normalement (SD) ou soumises à une diète à haute teneur en gras (HFD). On constate une augmentation de la durée de vie moyenne en présence de SIRT1720 (agoniste), particulièrement pour les souris HFD. Pour les souris SD, on remarque une petite augmentation de la durée de vie, mais surtout un retard de l'âge auquel les souris commencent à mourir. Leur état de santé général est meilleur et elles sont plus résistantes, sans que la durée de vie maximale soit affectée de façon dramatique.

L'horloge centrale d'adaptation au cycle circadien est localisée, pour les vertébrés, dans le noyau suprachiasmatique (SCN) de l'hypothalamus (Orozco-Solis et Sassone-Corsi, 2014). L'horloge recrute un réseau de facteurs de transcription aux régulations rétroactives. Pour l'essentiel, on citera *Circadian Locomotor Output Cycles Kaput* (CLOCK) et *Brain Muscle ARNT-Like1* (BMAL1) qui forment un hétérodimère et régulent l'expression de plusieurs gènes de la famille des CCG (pour *clock-controlled genes*). Parmi ces gènes, *Period 1-3* (*Per1*, *Per2*, *Per3*) et *Cryptochrome 1-2* (*Cry1* et *Cry2*) inhibent l'expression de CLOCK et BMAL1, boucle de rétroaction à l'origine des oscillations. Nombre des gènes CCG encodent des facteurs de transcription, ce qui augmente – par un effet en cascade – le nombre de gènes régulés par les cycles circadiens. En fait, les données de génomique fonctionnelle laissent entrevoir que ce sont entre 10 et 20 % des gènes qui sont « circadiens » et sous la dépendance des entrées nutritionnelles et métaboliques.

L'activité HDAC de SIRT1 oscille de façon circadienne avec une déacétylation rythmique de H3K9/K14 au niveau des promoteurs des CCG, ce qui réprime leur expression en augmentant la formation locale d'hétérochromatine. D'autres cibles de SIRT1 sont FOXO1 (un facteur de transcription régulateur de l'oxydoréduction) et un certain nombre de facteurs du métabolisme énergétique. L'activité de SIRT1 est modulée par NAD⁺ et donc liée à la production d'ATP et au métabolisme. SIRT1, par sa dépendance au NAD⁺ mitochondrial, est un excellent candidat pour lier le cycle circadien au métabolisme. Le vieillissement qui diminue la synthèse de NAD⁺ a donc des effets sur l'acétylation de nombre de cibles, mais aussi sur l'activité du complexe BMAL1/CLOCK, donc sur la synthèse oscillante des CCG. Via la régulation de l'activité HNF1A, un facteur de transcription fortement exprimé dans le foie, la baisse de NAD⁺ résulte en une baisse de la transcription de gènes mitochondriaux nucléaires. On voit là l'esquisse d'un lien entre activité nucléaire et mitochondriale, avec une oscillation synchronisée de cette interaction, modulable par le métabolisme et pouvant s'altérer avec l'âge ou les conditions physiopathologiques.

Ces considérations métaboliques permettent d'introduire un lien entre nutrition et horloges circadiennes. S'il est exact que le vieillissement a une forte composante

généétique, illustrée par les durées de vie différentes observées entre différentes espèces, il n'en est pas moins vrai qu'il existe une composante épigénétique qui traduit le rôle de l'environnement dans le vieillissement. Dans cet esprit, j'introduis ici le thème de la restriction calorique, outil démontré de la longévité chez les levures, vers, mouches et souris.

La restriction calorique réduit l'activité mTORC1 et l'amointrissement génétique ou pharmacologique de mTORC1 est suffisant pour augmenter la durée de vie (invertébrés et souris). Il est intéressant que, dans le SCN, mTOR montre une activité cyclique. Cycle circadien, restriction calorique et interventions pharmacologiques agissant sur le SCN jouent sur l'horloge centrale et les horloges périphériques propres à chaque tissu. Ce qui nous permet de terminer sur le rôle de SIRT1 comme régulateur du cycle circadien au niveau du noyau SCN et des effets du vieillissement sur ce contrôle par SIRT1 (Chang et Guarente, 2013, 2014).

L'utilisation d'une lignée cellulaire neuronale – le neuroblastome murin N2a – permet de suivre l'expression des différents gènes du cycle circadien et de constater une diminution de leurs oscillations en réponse à une baisse d'expression de SIRT1. L'élimination de PGC1-alpha, une cible de SIRT1, a les mêmes effets, et il était raisonnable qu'on se demande si PGC1-alpha n'est pas un élément central de cette régulation des oscillations. La diminution de l'expression de PGC1-alpha induit effectivement celle de pratiquement tous les gènes régulateurs des oscillations. Ce même modèle a permis de montrer que *BMAL1* et *PER2* sont sous le contrôle transcriptionnel de SIRT1 et PGC1-alpha.

Est ainsi démontrée une interaction directe entre SIRT1 et PGC1-alpha. Les protéines de la famille PGC1 sont co-activatrices de récepteurs nucléaires, protéines cytoplasmiques qui – une fois activées par leur ligand - passent dans le noyau et se fixent sur leurs cibles transcriptionnelles. On doit constater que les PGC1 activent la transcription nucléaire de gènes mitochondriaux. Du coup, leur rôle est décisif dans les tissus à fort métabolisme (muscles, tissu adipeux brun et cerveau) et, via leur lien avec SIRT1, dans le couplage entre activité métabolique et activité circadienne.

Un autre exemple d'activité systémique

Le facteur de transcription Mnt chez la drosophile, orthologue du facteur MNT/MAD chez les humains, réprime l'expression de gènes de la biogenèse des ribosomes et de l'anabolisme. La protéine est présente dans le noyau des cellules de nombreux tissus, dont le muscle, et les mouches mutantes pour *Mnt* ont une durée de vie réduite. La surexpression de *Mnt*, exclusivement dans les muscles squelettiques, prolonge la vie des mouches et améliore leur coordination motrice à un âge avancé (Demontis *et al.*, 2014). Cela suggère que le nucléole joue un rôle dans la longévité et que la surexpression de *Mnt* dans les seuls muscles squelettiques retentit sur la survie de l'animal.

Ce point souligne le rôle des communications entre tissus dans le vieillissement. Sur cette base, les auteurs ont mesuré la taille du nucléole dans le tissu musculaire et le tissu adipeux, et démontré une baisse de la taille des nucléoles dans les deux tissus, après surexpression de *Mnt* dans le muscle. Ils ont identifié plusieurs facteurs sécrétés par les muscles et responsables de cette activité systémique. Parmi ces myokines, une des plus actives est la myoglianin, de la famille TGF- β dont les orthologues humains sont GDF8 et GDF11.

On fera ici le lien avec l'hétérochromatine. Le modèle « perte d'hétérochromatine » proposé dès 1997 par Villeponteau (Villeponteau, 1997) est associé à une expression illégitime de gènes liés au vieillissement. L'hétérochromatine est essentielle – cela a été démontré chez la drosophile –, pour la stabilité des séquences répétées et de gènes codant pour l'ARN ribosomal, et sa perte induit une déstructuration du nucléole. Pour comprendre le rôle de l'hétérochromatine dans le vieillissement animal, Larson et ses collègues (Larson *et al.*, 2012) ont manipulé génétiquement chez la mouche les niveaux de HP1, un régulateur central de la formation de l'hétérochromatine. Leurs résultats suggèrent que l'hétérochromatine empêche un vieillissement prématuré.

Mitochondries

Nous partons de l'article de Nunnari et Suomalainen (Nunnari et Suomalainen, 2012). Les mitochondries ont une membrane externe (OM) et une membrane interne (IM) séparées par l'espace inter-membranaire (IMS). Le génome mitochondrial est circulaire et a été réduit au cours de l'évolution par transfert nucléaire des gènes mitochondriaux. Chez les mammifères, la transmission du génome mitochondrial est presque exclusivement maternelle. Les mitochondries de mammifères contiennent environ 1500 protéines dont 13 sont codées par le génome mitochondrial. Les protéines mitochondriales sont donc, pour l'essentiel, importées par la mitochondrie et distribuées dans ses différents compartiments.

Les maladies mitochondriales, très nombreuses et hétérogènes, sont dues à des mutations qui peuvent toucher le génome nucléaire ou mitochondrial. Parmi ces maladies, on range des maladies neurodégénératives, des cardiomyopathies, des syndromes métaboliques, des cancers et l'obésité. Ces maladies peuvent toucher n'importe quel organe ou système, et se manifester à tout âge. Elles sont soit héréditaires, d'origine génétique, soit venant de la mère quand le génome touché est mitochondrial.

Les mutations nucléaires les plus communes associées à des pathologies touchent la DNA-polymérase gamma et se traduisent par des désordres hépatiques et cérébraux. La variabilité extrême des phénotypes pathologiques est explicable par le fait que les cellules contiennent un mélange de mitochondries saines et malades et que le symptôme est dépendant du rapport entre les deux populations comme de leur distribution entre tissus, entre cellules, voire au sein d'une même cellule.

Une demande accrue d'ATP se traduit par une augmentation de la masse mitochondriale et de l'oxydation phosphorylative (OXPHOS). C'est ce qui se passe après un effort physique ou une augmentation de la vascularisation. Le métabolisme mitochondrial est donc à la fois origine et cible des signaux nutritifs. Deux composés moléculaires fondamentaux dans la mesure du statut métabolique sont la kinase activée par l'AMP (AMPK) et SIRT1. AMPK est activée par l'augmentation du rapport AMP/ATP et celle des concentrations d'ADP qui accompagnent une restriction calorique ou un accroissement de la dépense énergétique. Il est intéressant que la baisse des nutriments augmente à la fois la formation de NAD⁺ et le rapport AMP/ATP du fait de la mobilisation de l'énergie. Cela a des conséquences sur l'activation de SIRT1 et la transcription via PGC1-alpha de gènes de biogénèse des mitochondries.

Un caractère important de la morphologie mitochondriale est son aspect dynamique en relation avec l'activité métabolique. Le point le plus frappant est la

capacité de division mais aussi de fusion des mitochondries. Ces deux phénomènes sont régulés par des protéines qui hydrolysent le GTP et appartiennent à la famille des dynamines, dont le rôle dans la morphologie des membranes a été bien décrit. Pour insister sur le système nerveux, il est évident que la localisation des mitochondries dans les terminaisons nerveuses, comme dans la région sous-synaptique, associée à leur capacité de produire de l'ATP et de libérer du calcium localement, a un rôle fondamental dans la physiologie cérébrale.

La fonction et la morphologie mitochondriales sont influencées par les interactions, parfois très intimes, avec le réticulum endoplasmique (RE) qui intervient directement dans la division de la mitochondrie, en même temps que ce contact très étroit se révèle être un site de libération de calcium qui sensibiliserait la mitochondrie à des agents pro-apoptotiques. Les communications entre mitochondries et autres organelles impliquent des vésicules générées par la mitochondrie et envoyées vers différents compartiments.

Sugiura et ses collègues (Sugiura *et al.*, 2014) se penchent sur ce transport vésiculaire reliant la mitochondrie aux autres organelles, voire à l'extérieur de la cellule, voie inattendue de sécrétion. Les formes de ce bourgeonnement mitochondrial peuvent inclure la seule membrane externe ou les deux membranes externe et interne, donnant naissance à des *Mitochondrial-Derived-Vesicles* (MDV) de 70 à 150 nm « envoyées » vers les endosomes, les corps multivésiculaires – voie possible de dégradation (lysosomes) mais aussi de sécrétion.

Les peroxisomes constituent un autre compartiment d'adressage des MDV. Découverts par Christian de Duve en 1965, ce sont des vésicules dérivées du RE dont le contenu protéique encodé par le noyau est importé à partir du cytoplasme. Ces protéines ou péroxines, au nombre limité (autour de 50), sont engagées dans de nombreuses fonctions dont la dégradation oxydative (à travers l'utilisation de H₂O₂) de plusieurs composés comme l'acide urique, les acides gras à longue chaîne, les acides aminés. Une autre fonction est la synthèse lipidique, dont – pour les animaux – celle du cholestérol (rôle partagé avec le RE). Enfin, les peroxisomes contiennent les enzymes nécessaires à la synthèse des plasmalogènes, composants importants de la membrane de certains tissus, dont le cerveau.

Le mécanisme de formation des MDV a probablement été hérité des archaebactéries, les ancêtres des mitochondries. Il s'agit donc d'un mécanisme primitif de communication cellulaire, ici détourné vers l'intérieur de la cellule. La formation des MDV destinées aux lysosomes demande PINK1 (une protéine kinase) et la Parkin, une E3 ligase cytosolique, deux produits de gènes mutés dans des formes familiales de la PD. Normalement, PINK1 est importée par la mitochondrie et dégradée par les protéases mitochondriales. Quand l'import est incomplet, PINK1 est bloquée à la surface et phosphoryle la Parkin qui, recrutée du cytoplasme à la surface de la mitochondrie, ajoute des ubiquitines aux protéines de surface, ce qui enclenche la phagocytose. PINK1 et Parkin sont nécessaires à la formation des MDV, d'où le modèle proposant que la formation des MDV est une réponse locale, un stress plus prolongé transformant cette réponse locale en réponse de type mitophagie. Ce mécanisme hypothétique n'est impliqué que pour les MDV à deux membranes (IMS et OMS) qui sont formées au point de contact de ces membranes, les vésicules à simple membrane ne requérant ni PINK1 ni Parkin pour leur formation.

Ce mécanisme de « contrôle qualité » s'ajoute à la mitophagie, à la dégradation des protéines dans la matrice mitochondriale et à l'adressage au protéasome

(ubiquitine-dépendent et cytosolique). On dénombre alors quatre lignes de défense des mitochondries : protéases endogènes, adressage au protéasome, formation des MDV et leur adressage aux lysosomes et corps multivésiculaire, enfin l'élimination globale par le phagosome des mitochondries « irréparables ». Pour ce qui est des corps multivésiculaires, leur fusion avec la membrane plasmique entraîne une libération extracellulaire des MVD et de leur contenu. Ce phénomène recouvre celui des exosomes et suggère que nombre d'exosomes pourraient venir des mitochondries.

La fin

Retournons pour conclure aux neuf points de notre liste de départ. Nous serons assez facilement convaincus que cette liste ne souffre pas d'être découpée en tranches. Je ne veux pas reprendre le cours ni même le résumer rapidement, mais, si nous nous contentons de considérer l'instabilité génomique, on voit immédiatement qu'elle n'est pas séparable des autres phénomènes illustrés par cette série de marqueurs et que cela est vrai indépendamment du marqueur de départ. La situation est donc beaucoup plus compliquée que ne le suggère une segmentation qui a servi de trame à ces deux années de cours. Mais c'est normal, ça s'appelle la physiologie, et ces différentes entrées dans la question de la longévité cachent une très forte présence de régulations homéostatiques qui, sauf dérapiage, ont pour effet de maintenir le système dans les limites de ce qui est physiologiquement acceptable. Mieux : elles ouvrent de nombreuses pistes pour les interventions thérapeutiques qui, d'année en année, pour certaines civilisations et certaines classes sociales, prolongent le vieillissement en bonne santé.

Références

- Behrens A., van Deursen J.M., Rudolph K.L. et Schumacher B. (2014), « Impact of genomic damage and ageing on stem cell function », *Nat Cell Biol* 16, 201-207.
- Chang H.C et Guarente L. (2013), « SIRT1 mediates central circadian control in the SCN by a mechanism that decays with aging », *Cell* 153, 1448-1460.
- Chang H.C. et Guarente L. (2014), « SIRT1 and other sirtuins in metabolism », *Trends Endocrinol Metab* 25, 138-145.
- Choi J.E. et Mostoslavsky R. (2014), « Sirtuins, metabolism, and DNA repair », *Curr Opin Genet Dev*, 26, 24-32.
- Demontis F., Patel V.K., Swindell W.R. et Perrimon N. (2014), « Intertissue control of the nucleolus via a myokine-dependent longevity pathway », *Cell Rep* 7, 1481-1494.
- Ernst A. et Frisen J. (2015), « Adult neurogenesis in humans- common and unique traits in mammals », *PLoS Biol* 13, e1002045.
- Ghosh S. et Zhou Z. (2014), « Genetics of aging, progeria and lamin disorders », *Curr Opin Genet Dev* 26, 41-46.
- Herskovits A.Z. et Guarente L. (2014), « SIRT1 in neurodevelopment and brain senescence », *Neuron* 81, 471-483.
- Kim D., Frank C.L., Dobbin M.M., Tsunemoto R.K., Tu W., Peng P.L., Guan J.S., Lee B.H., Moy L.Y., Giusti P. *et al.* (2008), « Deregulation of HDAC1 by p25/Cdk5 in neurotoxicity », *Neuron* 60, 803-817.
- Kim D., Nguyen M.D., Dobbin M.M., Fischer A., Sananbenesi F., Rodgers J.T., Delalle I., Baur J.A., Sui G., Armour S.M. *et al.* (2007), « SIRT1 deacetylase protects against neurodegeneration in models for Alzheimer's disease and amyotrophic lateral sclerosis », *EMBO J* 26, 3169-3179.

Larson K., Yan S.J., Tsurumi A., Liu J., Zhou J., Gaur K., Guo D., Eickbush T.H. et Li W.X. (2012), « Heterochromatin formation promotes longevity and represses ribosomal RNA synthesis », *PLoS Genet* 8, e1002473.

Lopez-Otin C., Blasco M.A., Partridge L., Serrano M. et Kroemer G. (2013), « The hallmarks of aging », *Cell* 153, 1194-1217.

Lu T., Pan Y., Kao S.Y., Li C., Kohane I., Chan J. et Yankner B.A. (2004), « Gene regulation and DNA damage in the ageing human brain », *Nature* 429, 883-891.

McKinnon P.J. (2013), « Maintaining genome stability in the nervous system », *Nat Neurosci* 16, 1523-1529.

Mitchell S.J., Martin-Montalvo A., Mercken E.M., Palacios H.H., Ward T.M., Abulwerdi G., Minor R.K., Vlasuk G.P., Ellis J.L., Sinclair D.A. *et al.* (2014), « The SIRT1 activator SRT1720 extends lifespan and improves health of mice fed a standard diet », *Cell Rep* 6, 836-843.

Nunnari J. et Suomalainen A. (2012), « Mitochondria: in sickness and in health », *Cell* 148, 1145-1159.

Orozco-Solis R. et Sassone-Corsi P. (2014), « Circadian clock: linking epigenetics to aging », *Curr Opin Genet Dev* 26, 66-72.

Suberbielle E., Sanchez P.E., Kravitz A.V., Wang X., Ho K., Eilertson K., Devidze N., Kreitzer A.C. et Mucke L. (2013), « Physiologic brain activity causes DNA double-strand breaks in neurons, with exacerbation by amyloid-beta », *Nat Neurosci* 16, 613-621.

Sugiura A., McLelland G.L., Fon E.A. et McBride H.M. (2014), « A new pathway for mitochondrial quality control: mitochondrial-derived vesicles », *EMBO J* 33, 2142-2156.

Villeponteau B. (1997), « The heterochromatin loss model of aging », *Exp Gerontol* 32, 383-394.

Wang C., You Y., Qi D., Zhou X., Wang L., Wei S., Zhang Z., Huang W., Liu Z., Liu F. *et al.* (2014), « Human and monkey striatal interneurons are derived from the medial ganglionic eminence but not from the adult subventricular zone », *J. Neurosci* 34, 10906-10923.

Séminaire : *Brain plasticity and repair*^c

Le séminaire s'est tenu sous la forme d'un colloque, les 14 et 15 avril 2015, avec les intervenants suivants :

- James Fawcett et John van Geest, centre for brain repair, Cambridge, Grande-Bretagne ;
- Jeroen Pasterkamp, UMC, Utrecht, Pays-Bas ;
- Wolfgang Wurst, Helmholtz Center, Munich, Allemagne ;
- Andreas Faissner, université de Ruhr, Bochum, Allemagne ;
- Joost Verhaagen, Netherland Institute for Neurosciences, Amsterdam, Pays-Bas ;
- Raj Ratan, université de Burke, New York, États-Unis ;
- Jessica Kwok, John van Geest, centre for brain repair, Cambridge, Grande-Bretagne ;
- Daniel Alvarez-Fisher, université de Lübeck, Allemagne ;
- Stefano Gustincich, SISSA, Trieste, Italie ;
- Clémence Bernard, Collège de France, France ;
- Alexandra Durr, ICM, Paris, France ;
- Thomas Perlmann, Karolinska Institute, Stockholm, Suède ;
- Anders Bjorklund, université de Lund, Suède ;

c. Les séminaires sont disponibles en audio et vidéo sur le site internet du Collège de France : <http://www.college-de-france.fr/site/alain-prochiantz/symposium-2014-2015.htm> [NdÉ].

Emiliana Borrelli, UC Irvine, États-Unis ;
 Brian Lau, ICM, Paris, France ;
 Frédéric Saudou, institut des neurosciences, Grenoble, France ;
 Emmanuel Brouillet, CEA, Fontenay-aux-Roses, France ;
 Alain Prochiantz, Collège de France, France ;
 Vitek Tracz, F1000, Londres, Grande-Bretagne.

RECHERCHE

Otx2 dans le développement et la plasticité du cortex cérébral

La protéine Otx2 est transportée depuis les plexus choroïdes jusqu'aux neurones PV de la couche IV du cortex cérébral à la surface desquels elle se fixe spécifiquement avant d'être internalisée. Son internalisation tout au long de la vie régule la plasticité du cortex, pas seulement visuel, comme nous venons de le démontrer (Bernard, Lee *et al.*, en préparation).

Ce mode de signalisation par transfert de facteurs de transcription de la famille des homéoprotéines (HP) a longtemps manqué de preuves génétiques. En effet, les domaines nécessaires au transfert permettent la fixation à l'ADN et ne peuvent donc pas être mutés dans le but de ne bloquer que la fonction transfert.

Pour y remédier, nous avons généré trois lignées de souris porteuses de gènes encodant de façon inductible des anticorps monocaténares (scFv) dirigés contre les HP Otx2, Engrailed ou Pax6. Nous avons ainsi montré que l'induction du scFv anti-Otx2, soit au niveau des cellules PV « receveuses », soit au niveau des plexus choroïdes « donneurs » neutralise Otx2 dans l'espace extracellulaire et modifie l'expression des gènes de plasticité dans les neurones PV. Cela constitue la preuve génétique d'une régulation transcriptionnelle paracrine par des facteurs de transcription (Vincent, Bernard *et al.*, en préparation).

Formation des bords dans le neuroépithélium

Nous avons fait l'hypothèse selon laquelle le transfert d'HP très tôt au cours de l'ontogenèse du système nerveux participe au positionnement des frontières entre les compartiments du neuroépithélium. Il s'agissait là de compléter l'hypothèse de Lewis Wolpert en considérant les HP comme des morphogènes au sens de Turing. Cette hypothèse a été modélisée en collaboration avec l'équipe de Jonathan Touboul (CIRB, Collège de France). Les simulations suggèrent qu'une diffusion des HP, même très limitée, stabilise la forme et la position des frontières (C. Quiñiao *et al.*, 2015). Sur le plan expérimental, nous avons généré la souris ScFv anti-Pax6 (voir plus haut) afin de bloquer le passage de Pax6 très tôt au cours du développement. Les résultats en cours d'analyse confirment l'hypothèse d'un rôle de la signalisation par HP dans la formation de frontières mais impliquent aussi un troisième élément consistant en l'inhibition par Pax6 sécrété de la migration des cellules de Cajal-Retzus.

Maladie de Parkinson

Les HP *Engrailed1* et *Engrailed2* (collectivement *Engrailed* ou En1/2) sont exprimées dans les neurones dopaminergiques mésencéphaliques (mDA) de la substance noire (SNpc), ceux-là même qui dégénèrent dans la maladie de Parkinson (PD). Nous avons démontré qu'*Engrailed* infusée au niveau de la SNpc est capturée par les neurones mDA (voir plus haut) et les protège dans trois modèles murins de PD. Nous avons maintenant démontré qu'*Engrailed* internalisée protège les neurones contre les dommages occasionnés aux niveaux génétique et épigénétique par un stress oxydatif chronique ou aigu (Rekaik, de Thé *et al.*, 2015, plus deux brevets). Parallèlement, nous avons observé que la fonction protectrice d'*Engrailed* passe par la répression transcriptionnelle d'éléments mobiles du génome de la famille des LINE (de Thé, Rekaik *et al.* en préparation).

Maladie d'Alzheimer

Au cours d'un séquençage des ARN des plexus choroïdes, nous avons observé une expression massive du gène codant pour le précurseur de la protéine amyloïde (β APP). Le β APP est une protéine transmembranaire qui, si elle est clivée correctement, libère le sAPP dans l'espace extracellulaire. Une des activités du sAPP est de réguler la neurogenèse adulte au niveau de la zone subventriculaire (SVZ) et de l'hippocampe. S'il est clivé de façon pathologique, le β APP produit un peptide β A4 toxique retrouvé dans les plaques séniles des malades souffrant de la maladie d'Alzheimer. Cette expression très forte au niveau des plexus nous a conduit à proposer qu'un traitement à ce seul niveau pourrait améliorer le décours de la maladie. Une perte ou un gain de fonction β APP spécifiquement dans les plexus choroïdes se traduit respectivement par une augmentation ou une diminution de la neurogenèse. Cela conforte notre hypothèse et nous utilisons des modèles murins de la maladie pour vérifier si remplacer le gène malade au niveau des seuls plexus choroïdes permet de restaurer la neurogenèse, de diminuer le nombre des plaques amyloïdes et d'améliorer les performances cognitives des souris.

PUBLICATIONS

Articles

BERNARD C., KIM H.-T., TORERO IBAD R., LEE E.J., SIMONUTTI M., PICAUD S., ACAMPORA D., SIMEONE A., DI NARDO A.A., PROCHIANTZ A., MOYA K.L.* et KIM J.W.,* « Graded Otx2 activities demonstrate dose-sensitive eye and retina phenotypes », *Human Molecular Genetics*, 23(7), avril 2014, 1742-1753, DOI : 10.1093/hmg/ddt562.

PROCHIANTZ A., FUCHS J. et DI NARDO A.A., « Postnatal signaling with homeoprotein transcription factors », *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 369(1652), 26 septembre 2014, DOI : 10.1098/rstb.2013.0518.

KIM N., ACAMPORA D., DINGLI F., LOEW D., SIMEONE A., PROCHIANTZ A. et DI NARDO A.A., « Immunoprecipitation and mass spectrometry identify non-cell autonomous

* Corresponding authors.

Otx2 homeoprotein in the granular and supragranular layers of mouse visual cortex », *F1000Research*, 3(178), 2014, DOI : 10.12688/f1000research.4869.1.

NORDSTRÖM U., BEAUVAIS G., GHOSH A., PULIKKAPARAMBIL SASIDHARAN B.C., LUNDBLAD M., FUCHS J., JOSHI R.L., LIPTON J.W., ROHOLT A., MEDICETTY S., FEINSTEIN T.N., STEINER J.A., ESCOBAR GALVIS M.L., PROCHIANTZ A. et BRUNDIN P., « Progressive nigrostriatal terminal dysfunction and degeneration in the engrailed1 heterozygous mouse model of Parkinson's disease », *Neurobiology of Disease*, 73, janvier 2015, 70-82, DOI : 10.1016/j.nbd.2014.09.012.

PROCHIANTZ A. et DI NARDO A.A., « Homeoprotein signaling in the developing and adult nervous system », *Neuron*, 85(5), 4 mars 2015, 911-925, DOI : 10.1016/j.neuron.2015.01.019.

QUIÑINAO C., PROCHIANTZ A.* et TOUBOUL J.*, « Local homeoprotein diffusion can stabilize boundaries generated by graded positional cues », *Development*, 142(10), 15 mai 2015, 1860-1868, DOI : 10.1242/dev.113688.

HUETTL R.-E., LUXENHOFER G., BIANCHI E., HAUPT C., JOSHI R., PROCHIANTZ A. et HUBER A.B., « Engrailed 1 mediates correct formation of limb innervation through two distinct mechanisms », *PLoS One*, 10(2), 2015, e0118505, DOI : 10.1371/journal.pone.0118505.

REKAİK H., BLAUDIN DE THÉ F.-X., FUCHS J., MASSIANI-BEAUDOIN O., PROCHIANTZ A.* et JOSHI R.L., « Engrailed Homeoprotein Protects Mesencephalic Dopaminergic Neurons from Oxidative Stress », *Cell Reports*, 13(2), 13 octobre 2015, 242-250, DOI : 10.1016/j.celrep.2015.08.076.

Brevets

PROCHIANTZ A., REKAİK H., BLAUDIN DE THÉ F.-X., JOSHI R. & FUCHS J., déposé le 31 octobre 2014. Utilisation d'un inhibiteur de transcriptase inverse dans la prévention et le traitement des maladies dégénératives. N° 14 60535.

PROCHIANTZ A., REKAİK H., BLAUDIN DE THÉ F.-X., JOSHI R. & FUCHS J., déposé le 31 octobre 2014. Reparation and restructuration of chromatin using a homeoprotein. N° 14306753.6

Participation à des congrès

Translational Control of Brain Function in Health and Disease. Wellcome Trust, 7-9 mai 2014, Londres, Grande-Bretagne.

A dynamic architecture of life, 26-27 mai 2014, Rome, Italie.

Brain extracellular matrix targeting in regeneration and rehabilitation, COST meeting, 2-4 juillet 2014, Volterra, Italie.

Learning and Memory: Cellular and Systemic Views. 23-26 février 2015, Magdebourg, Allemagne.

Groupe français des peptides et des protéines, 17-22 mai 2015, Portbail, France.

From cell-penetrating peptides to nanoparticles for cellular delivery, 1-3 juillet 2015. Paris, France.

