

Processus morphogénétiques

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

ENSEIGNEMENT

Cours : Longévité cérébrale^a

Introduction générale sur la question de longévité

La longévité a été abordée sous l'angle d'une instabilité et d'un renouvellement permanent des structures vivantes, aux niveaux moléculaires et cellulaires. À quoi il faut ajouter une évolution des individus modifiés dans la structure de leur chromatine et la géométrie des réseaux de neurones. Cette identification de la part d'adaptation incluse dans le vieillissement distingue les organismes qui ont une histoire et une mémoire de ceux qui vivent dans l'immédiateté.

Certes, la distinction n'est jamais aussi tranchée et on trouve de l'adaptation individuelle dans tous les organismes, même les plus simples. Dans cette approche dynamique de la longévité, nous devons distinguer les organes qui sont l'objet d'un renouvellement cellulaire continu (l'intestin, la peau ou le système hématopoïétique...) de ceux qui ne sont que partiellement renouvelés comme le cerveau. Cet organe, en effet, est un mélange de neurones post-mitotiques et de neurones qui se renouvellent à partir de cellules souches, sans parler des cellules gliales ou vasculaires.

Lopez-Otin et ses collègues (Lopez-Otin *et al.*, 2013) proposent de faire le lien entre cancer et vieillissement du point de vue de l'accumulation de lésions génétiques, cellulaires et organiques. Ils se sont efforcés de repérer une série de marqueurs du vieillissement, au nombre de 9 :

- 1) l'instabilité génomique ;
- 2) le raccourcissement des télomères ;
- 3) les altérations épigénétiques ;

a. Le cours est disponible en audio et en vidéo sur le site Internet du Collège de France, avec le texte intégral et le support de cours : <http://www.college-de-france.fr/site/alain-prochiantz/course-2013-2014.htm> [NdÉ].

- 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.

Le raccourcissement des télomères et l'épuisement des cellules souches ne concernent que les cellules en division. Pour le cerveau, ces deux marqueurs ne concernent que les cellules souches neurales, celles de la zone sous-ventriculaire (SVZ) et du gyrus denté (DG), et non les éléments neuronaux. Les télomères définissent une région chromosomique dont le raccourcissement à chaque division cellulaire mesure « l'âge de la cellule ». Sauf intervention d'une télomérase qui maintient constante la taille des télomères, les cellules ne peuvent se diviser qu'un certain nombre de fois, puis soit entrer en sénescence et/ou en apoptose, soit devenir immortelles.

Les interactions entre les neuf marqueurs sont nombreuses. Par exemple, le verrouillage de l'instabilité appelle des opérations épigénétiques (méthylation de l'ADN ou modifications des histones). Ou encore, le raccourcissement des télomères induit des phénomènes de cassure de l'ADN double-brin et participe à l'épuisement des cellules souches. Ces interactions déclinables à l'infini sont bénéfiques tant qu'elles maintiennent le système général dans les bornes de la physiologie normale.

En 2009, j'avais suggéré qu'une trop grande activité cérébrale pourrait créer des lésions (« On pense trop et ça fait des trous ! »). Un article récent (Suberbielle *et al.*, 2013) et le *News and Views* qui l'accompagne (Herrup *et al.*, 2013) donnent du poids à cette idée. Les auteurs avancent que les lésions de l'ADN neuronal contribuent au vieillissement cognitif. Certains neurones ont notre âge et leur ADN a subi de nombreuses lésions, réparées pour nombre d'entre elles. Mais cette réparation se fait plus ou moins bien, le mécanisme impliqué – aboutage des brins non homologues (NHEJ) – introduisant des erreurs, donc des mutations. Le vieillissement neuronal s'accompagne d'une augmentation du nombre des marqueurs de cassures, dont l'histone H2A phosphorylée sur la sérine 139 (γ H2AX) qui entoure les cassures double-brin (DSB).

L'exploration d'un nouvel environnement provoque chez les souris une forte activité cérébrale qui s'accompagne d'une augmentation des DSB (spots γ H2AX). À partir d'un modèle murin de maladie d'Alzheimer (la souris transgénique J20), ils ont observé la même augmentation des DSB que chez les souris sauvages (WT), en particulier dans le gyrus denté (hippocampe), mais le retour à la normale observé 24 heures plus tard chez les WT ne se fait pas, ou mal, chez les J20.

L'hypothèse est que les cassures sont un phénomène naturel qui pourrait faciliter les modifications de la chromatine et modifier l'expression de gènes impliqués dans l'apprentissage ou la cognition. La différence entre souris J20 et WT suggère que si le vieillissement pathologique n'est pas bon pour l'intégrité de l'ADN, cela ne veut pas dire que cette intégrité soit conservée dans les organismes jeunes ou qui vieillissent en bonne santé. La question est plutôt du côté de la réparation et de son vieillissement.

Ce qui amène à la réparation de l'ADN et à l'instabilité génomique. Discutons à partir de 2 articles (Iyama and Wilson, 2013 et Lord and Ashworth, 2012) la différence entre cellules en division et cellules post-mitotiques pour la réparation de l'ADN. Pour le cerveau, cela veut dire : distinguer les cellules souches et les

progéniteurs, des neurones matures. Pour les neurones, dont la vie est très longue, il est nécessaire que soient mobilisées des réparations qui permettent d'échapper à la sénescence et à la mort. D'où la contradiction entre la nécessité d'éviter la transformation cellulaire qui rend les cellules tumorales éternelles (alors qu'il faudrait les faire entrer en sénescence et les tuer) et éviter la mort des neurones qui doivent être réparés et rester relativement alertes jusqu'à la fin.

Le génome est constamment modifié par les agents endogènes et exogènes : respiration mitochondriale, réponse inflammatoire, erreurs au cours de la réplication, agents physiques et chimiques. Ce qui peut conduire à la formation d'environ 100 000 lésions par cellule et par jour chez les mammifères. Ces lésions sont très diverses, incluant mutations ponctuelles, oxydations de l'ADN, cassures créées par les rayonnements, translocations et intégrations de virus ou de transposons. Parmi les types de lésion, on peut énumérer les bases modifiées (oxydation, déamination, alkylation...), les cassures simple ou double-brin (SSB et DSB), les liaisons intra-brin ou inter-brins. En l'absence de réparation, des mutations apparaissent : substitution de bases, petites insertions et délétions, réarrangements chromosomiques, etc.). C'est en partie inévitable et, au cours du temps, on constate l'accumulation de ces lésions à l'origine du développement de cancers, ainsi que du vieillissement, dont le vieillissement cognitif.

Cette année, nous avons mis de côté l'ADN mitochondrial dont les mutations sont facilitées par un environnement riche en molécules oxydantes (phosphorylation oxydative et synthèse d'ATP) et par l'absence d'histones protectrices. Ces mutations sont impliquées dans de nombreuses pathologies et dans le vieillissement, même s'il faut relativiser cette implication, du fait de la grande hétérogénéité des mitochondries au sein d'une même cellule (hétéroplasmie). Cependant, il peut arriver qu'un génome mutant devienne majoritaire, voire « totalitaire » (homoplasmie). La cause majeure des mutations mitochondriales est la réplication de l'ADN plutôt que le stress oxydatif.

La variété et la fréquence des lésions de l'ADN nucléaire est en adéquation avec la complexité des *DNA damage response* (DDR). Les DDR diffèrent selon le type de lésion mais tous les systèmes de réparation impliquent plusieurs étapes dont (i) la détection de la lésion, (ii) l'accumulation de facteurs de réparation au niveau des sites de lésion et (iii) la réparation de la lésion. Dans ce résumé, on se concentrera sur les DSB, en renvoyant pour les autres types de cassure au cours complet (publié sur le site du Collège de France). Les DSB représentent la catégorie la plus importante des lésions de l'ADN.

Cassures de l'ADN et leur réparation, structure de la chromatine

Les DSB représentent la forme la plus délétère des lésions de l'ADN. Ils activent les mécanismes de mort cellulaire et, en l'absence de réparation, s'accompagnent d'une instabilité du génome (translocations). Souvent induits par les radicaux oxygénés (ROS) produits du métabolisme mitochondrial, les DSB interviennent aussi dans des processus physiologiques normaux, comme la recombinaison au cours de la génération des immunoglobulines, ou de la méiose. Il n'existe que deux systèmes de réparation : la recombinaison homologue (HR) et le *non homologous end joining* (NHEJ). La HR nécessite la copie d'une séquence homologue sur l'autre chromatide. Elle fait donc peu d'erreurs, mais ne peut opérer que dans les cellules en division, en phase S et G2 (synthèse d'ADN) alors que NHEJ, simple

raboutage des extrémités brisées, peut intervenir à toutes les étapes du cycle cellulaire et dans les cellules post-mitotiques mais est propice aux erreurs.

Des mutations dans les systèmes HR et NHEJ ont des conséquences sur le plan des pathologies. Pour s'en tenir au système nerveux, les mutations du système HR concernent seulement les cellules souches et entraînent des microcéphalies d'origine développementale. On retrouve aussi des cas de microcéphalie dans des mutations de la voie NHEJ (cette réparation touche les cellules en mitose et post-mitotiques) mais aussi des ataxies caractérisées par des désordres neuromusculaires d'origine nerveuse initiés après la maturation initiale du système nerveux.

Avant d'en venir aux pathologies, synthétisons les données sur le rôle de la structure de la chromatine dans la réparation. Price & D'Andrea (Price et D'Andrea, 2013) le rappellent, la réparation de l'ADN se situe dans le contexte de l'organisation de la chromatine. Les cellules des mammifères contiennent plusieurs structures chromatiniennes, par exemple les régions actives de l'euchromatine, les télomères, les régions intergéniques, les fourches de réplication, les régions compactes de l'hétérochromatine pauvres en transcription. Ces régions se distinguent par des patterns différents de protéines qui se fixent à la chromatine, dont les histones.

Le nucléosome, unité de base de la chromatine, est composé de 147 nucléotides enroulés autour d'un octamère d'histones (2 dimères H3-H4 et 2 dimères H2A-H2B). Les queues N-terminales des histones s'étendent éventuellement hors du nucléosome et sont riches en lysines dont les modifications (acétylation, méthylation, ubiquitination) changent leurs propriétés (structure de la chromatine, interaction avec d'autres partenaires protéiques). L'organisation de la chromatine peut aussi être modifiée par des complexes multiprotéiques organisés autour d'une ATPase. L'hydrolyse de l'ATP fournit l'énergie nécessaire pour que ces complexes déplacent le nucléosome et donnent ainsi accès à l'ADN. Il existe une inégalité des différentes régions de la chromatine devant les cassures et leur réparation. Certaines régions sont mieux protégées contre les agents délétères ou moins accessibles à la machinerie de réparation.

La structure de la chromatine influence la nature des gènes exprimés. Elle joue aussi sur la réparation de l'ADN, en régulant son accès. D'où le modèle « *access-repair-restore* » qui rappelle qu'il faut détecter les cassures dans les différentes architectures de la chromatine et modifier ces architectures locales pour donner accès aux enzymes de réparation. Ce qui implique une réorganisation du nucléosome pour qu'en fin de course le système soit remis en place (*restore*).

Une fois formé le DSB, le complexe MRN composé de trois protéines (Mre11, Rad50 et Nbs1) est amené au site de lésion où il recrute et active la kinase ATM (mutée dans *ataxia telangiectasia*). ATM activée phosphoryle des centaines de protéines. Les cibles classiques et bien vérifiées sont les protéines de *checkpoint* comme p53 et chk2 et des protéines de réparation de l'ADN comme BRCA1 actif dans la HR et 53BP1 actif dans la NHEJ. Une cible très importante d'ATM est H2AX, dont la forme phosphorylée (par ATM) γ H2AX crée un site d'ancrage pour la protéine MDC1 ce qui permet de recruter des complexes MRN/ATM additionnels et contribue à l'amplification du recrutement du système de réparation.

L'ouverture de la chromatine au niveau des DSB est associée à l'augmentation de l'acétylation des histones H2A et H4. Ce phénomène concerne plusieurs centaines de milliers de bases (un millier de nucléosomes). Les acétylations des queues des histones dépendent des acétyltransférases. L'acétyltransférase Tip60 fait partie du complexe NuA4 qui contient plusieurs enzymes dont deux hélicases (Ruvb11, Ruvb12) et la

p400 motor ATPase, importantes pour ouvrir la chromatine et donner accès aux protéines de réparation. En amont du recrutement de Tip60, la modification observable la plus précoce est la polyADP-ribosylation par PARP1 des lysines des histones (H2A/B, H3, H4) du cœur du nucléosome. Ces poly(ADP-riboses) (PAR) sont reconnus par NurD (une déacétylase) et ALC1 (une enzyme qui favorise le glissement du nucléosome), aussi (probablement) par HP1/kap-1 (méthylation de H3K9 par *docking* de la méthyltransférase). La déacétylation des histones (H2A, H3 et H4) par NurD et la méthylation de H3 sur K9 par KJMT qui se *dock* sur HP1/kap-1 créent une structure répressive temporaire de la transcription nécessaire pour que la réparation précède la formation des ARN messagers. Ces structures répressives sont ensuite levées par une dePARylation par la poly(ADP-ribose) glycohydrolase ou PARG.

Nous avons donc à la fois un très grand nombre d'acteurs moléculaires locaux et des modifications qui touchent de grandes parties de la chromatine (plusieurs millions de bases parfois) dont la structure tridimensionnelle s'en trouve remodelée. Les mutations qui touchent une quelconque des enzymes de réparation peuvent avoir des conséquences sur la réparation et être à l'origine de maladies génétiques. Mais, même sans mutation des enzymes de réparation, une cassure locale de l'ADN a en plus des effets locaux, des conséquences plus larges *via* les modifications de la structure de la chromatine. Par-delà les mutations ponctuelles qui sont à l'origine de maladies génétiques, la chromatine est donc un modulateur du vieillissement.

O'Sullivan et Karlseder (O'Sullivan et Karlseder, 2012) rappellent que le vieillissement s'accompagne de la perte des systèmes de régulation compensant les lésions créées par des agents toxiques. Comme toute structure vivante, la chromatine est soumise à ces stress et à leurs conséquences sur sa structure et sa fonction. Les acteurs essentiels du stress augmentent avec l'âge (ROS, lésions de l'ADN, stress réplicatif, bruit transcriptionnel, altération de la chromatine), et – à l'inverse – les processus régulateurs diminuent avec l'âge.

Un exemple de dérégulation de l'hétérochromatine responsable de vieillissement est le syndrome HGPS (*Hutchison-Gilford progeria syndrom*) qui se manifeste par un vieillissement accéléré et une mort avant la 2^e décennie. HGPS est causé par une forte détérioration de l'enveloppe nucléaire due à la mutation C1824T dans le gène de la lamine A (LMNA). Les lamines sont des protéines nucléaires qui participent au maintien de la structure nucléaire. Elles ont aussi un rôle de signalisation.

Cette mutation active un site cryptique d'épissage et produit une protéine tronquée de 50 acides aminés en position C-terminale. Entre autres défauts, les cellules HGPS en culture présentent un grand nombre de lésions de l'ADN et une perte des structures caractéristiques de l'hétérochromatine, dont une baisse des histones triméthylées H3K9me3 et H3K27me3, un fort niveau d'acétylation des histones et une baisse de HP1. HGPS illustre donc la façon dont la dérégulation de l'hétérochromatine peut promouvoir le vieillissement. Curieusement, la progérine a été retrouvée dans les tissus de personnes âgées normales qui ont aussi une baisse de H3K9me3 et HP1 au niveau de l'hétérochromatine. Le lien causal n'est pas démontré mais l'hypothèse selon laquelle un « relâchement » de l'hétérochromatine serait associé au vieillissement est très raisonnable.

Ce relâchement de l'hétérochromatine s'inscrit dans le mouvement plus général de fluidité nucléaire. Susan Gasser et ses collègues (Seeber *et al.*, 2013) s'intéressent aux « remodeleurs » du nucléosome dans le cas de la formation de DSB. Ils rappellent que la famille SWI/SNF d'ATPase joue un rôle important dans le recrutement de γ H2AX et l'acétylation des histones aux sites DSB. Mais surtout,

ils rappellent qu'après résection (dans le cas de la réparation par HR) et recrutement de Rad51 sur le simple brin, cette même protéine recrute Rad54 et que ces deux protéines sont nécessaires à la mobilité du simple brin à la recherche d'un homologue à copier. La perte de l'une ou l'autre inhibe la mobilité de la chromatine et la réparation par HR.

Rôle régulateur des ARN, éléments transposables (TE)

Les domaines régulateurs comptent pour environ 98 % du génome et les ARN non codants (ncRNA) en sont les produits les plus nombreux. Ces ARN transcrits à partir de l'ADN n'encodent pas des protéines mais régulent l'expression génétique à tous les niveaux : transcription, épissage, transport, stabilité et traduction en protéines des ARN messagers (mRNA). Ces fonctions peuvent être, ou non, associées à la régulation de la stabilité des génomes, comme dans le cas des piRNA qui répriment la transcription des rétrotransposons.

Les microRNAs (miRNA), constituent une classe importante de ncRNA. Plus de 60 % des mRNA sont des cibles des miRNA, qui régulent leur stabilité et leur traduction, le plus souvent en s'associant à leur extrémité 3' terminale (3'UTR). Les miRNA sont générés à partir de précurseurs plus longs, les Pri-miRNA transcrits grâce à la RNA polymérase II (ou III) puis maturés par deux RNases III (Drosha et Dicer) qui agissent respectivement au niveau du noyau et du cytoplasme, générant un ARN double-brin (dsRNA) de 20 à 25 nucléotides lié à une protéine de la famille Argonaute.

De nombreuses protéines de réparation des DSB sont associées à des ncRNA (par exemple p53BP1 ou le complexe Ku). À l'inverse, les DSB peuvent réguler l'expression de ncRNA. Ces points sont abordés par Chowdhury et ses collègues (Chowdhury *et al.*, 2013) avec des compléments d'information dans Sharma & Misteli (Sharma et Misteli, 2013). Il est bien démontré que les lésions de l'ADN induisent l'expression de miRNA, mais ces changements d'expression dépendent du type de dommage et de l'intensité du dommage. À l'inverse, il semble que l'initiation de la DDR est en partie régulée par des modifications après DD de l'expression de miRNA spécifiques. Ces considérations attirent notre attention sur la régulation post-transcriptionnelle des concentrations en protéines spécifiques reposant sur l'intervention d'un miRNA, avec des effets de dose importants sur la DDR. Cette régulation a des effets (bénéfiques ou maléfiques) selon les systèmes.

Continuons sur ce thème, avec les piRNA qui régulent l'expression des rétrotransposons et, de ce fait, la formation de cassures double-brin. Les éléments transposables (TE) constituent de l'ordre de 45 % du génome humain. Ces séquences, distribuées en sous-types distincts, quand elles sont mobilisées, peuvent sauter d'une région du génome à une autre et y inscrire des modifications irréversibles. Les transposons de la famille des LINE sont transcrits sous la forme d'un ARN polycistronique qui code pour deux protéines ORF1 et ORF2. ORF1 a une fonction *packaging* protégeant le transcrit et permettant le transport de la particule dans le noyau. ORF2 porte une fonction de transcription inverse (refaire un ADN à partir de l'ARN) et une fonction endonucléase qui coupe un brin d'ADN. À la suite de ces événements, le nouveau fragment d'ADN est inséré au site de coupure, ce qui introduit une mutation. ORF1 et ORF2 peuvent aider à la mobilisation d'une autre classe de TE, les SINE qui, quand ils sont transcrits, ont besoin de ORF1 et ORF2 des LINE pour se réintégrer dans le génome.

Les LINE sont pour la plupart fossilisés, ce qui veut dire que des mutations les empêchent de sauter, même si leur transcription partielle, sans réinsertion, peut avoir une action régulatrice de l'expression génétique (ils agissent alors comme de longs ncRNA). On estime le nombre de LINE sauteurs à 100 chez *sapiens* et 3000 chez la souris. Finalement, on rappellera que la transcription des LINE est réprimée par complexe Piwi-piRNA, PIWI étant une protéine Argonaute (Ago) qui transporte les piRNA et réprime la transcription des LINE en se fixant à HP1 (une protéine de l'hétérochromatine). Les piRNA liés à PIWI empêchent la transposition. *A contrario*, une inactivation du complexe PIWI/piRNA libère l'expression des LINE au niveau de l'hétérochromatine.

Jusqu'à récemment, on pensait que seules les cellules germinales abritaient une activité de rétrotransposition. Tel n'est pas le cas, et des données récentes suggérant que les piRNA régulent l'expression de CREB2 dans les neurones d'Aplysie (Rajasethupathy *et al.*, 2012) sont à mettre en regard de la forte expression des piRNA dans le système nerveux (75 000 séquences dans l'hippocampe). Même si ce nombre global est de 10 à 100 fois inférieur à celui des transcrits dans les gonades, de nombreux auteurs entrevoient un rôle neurophysiologique des LINE.

St Laurent III et ses collègues (St Laurent *et al.*, 2010) replacent cette question dans le contexte de la longévité. Ils rappellent qu'au cours du vieillissement, l'accumulation des lésions de l'ADN et des altérations plus globales de la structure de la chromatine peuvent induire des transcriptions illégitimes, dont, très probablement, celle de TE. Ceci est particulièrement intéressant pour nombre de maladies neurodégénératives, comme Alzheimer, Parkinson ou Huntington, qui, même quand elles sont d'origine génétique pure (ce qui est toujours vrai pour la maladie de Huntington, mais l'est pour 5 % seulement des cas d'Alzheimer et de Parkinson), ne se déclarent pas avant un âge relativement avancé, ce qui confirme que le vieillissement est un facteur de risque.

Parmi les éléments endogènes qui altèrent l'intégrité des génomes, pouvons-nous inclure les TE ? Les SINE étant mobilisés par les LINE, on s'en tiendra aux LINE tout en gardant en tête que LINE et SINE sont liés. Le transcrit peut être soit complet, le messenger bicistronique encodant ORF1 et ORF2, soit limité à ORF2. Dans les deux cas, la transcription de ORF2 est suffisante pour générer des cassures double-brin (ORF2 est une endonucléase) qui s'accumulent dans le génome, sauf réparation. Cela peut induire des modifications de la chromatine et des changements d'expression génétique, mais aussi des mutations associées à la réparation des DSB induits par l'insertion, en particulier si c'est le système NHEJ qui est utilisé. Et même s'il y a moins d'erreurs quand les cellules en division utilisent la HR, l'insertion de séquences identiques répétées dans le génome induit des appariements illégitimes et introduit des variations en nombre de copies de certains gènes (délétions ou copies supplémentaires), source importante de désordres physiologiques.

D'où l'abondance des mécanismes de contrôle de l'expression des TE, tout d'abord les modifications épigénétiques et la formation de l'hétérochromatine. La méthylation de l'ADN joue là un rôle important avec, au niveau des promoteurs des LINE, entre 20 et 100 % de CpG méthylés. La régulation épigénétique peut s'affaiblir avec l'âge, par exemple à travers l'oxydation des CpG. Un autre mécanisme de régulation est la polyadénylation prématurée à l'intérieur d'un transcrit codant. Cette polyadénylation prématurée touche les enzymes encodées par ORF2 empêchant la « prolifération » du transposon.

À ces mécanismes de contrôle, on ajoutera les antisens endogènes et l'interférence ARN. L'hybridation entre le sens et l'antisens génère des ARN interférentiels, des miRNA et des piRNA qui ont une activité répressive en partie liée au renforcement de la méthylation des promoteurs des LINE. Ces mécanismes sont très actifs dans les cellules adultes. Il est aussi connu que l'expression des LINE se fait en réponse au stress cellulaire, en particulier en réponse à l'exposition à de nombreux agents qui provoquent des lésions de l'ADN. Une explication de ce paradoxe est que la fonction initiale de la transposition serait d'inventer des solutions génétiques à une situation qui met l'organisme ou la cellule en danger. D'où la contradiction entre le rôle adaptatif des TE pour l'espèce et le danger qu'ils représentent pour les individus. On peut donc proposer que la longévité des humains est liée à la répression de la transposition et à la fossilisation progressive des transposons (100 LINE mobiles seulement).

Avant de clore ce chapitre, on décrira le contenu de deux articles. Le premier (Rajasethupathy *et al.*, 2012) démontre une activité physiologique de la transposition et celui de Li et ses collègues (Li *et al.*, 2013) décrit, à l'inverse, une activité pathologique de cette même transposition. Rajasethupathy et ses collègues partent de la contradiction apparente entre le *turnover* rapide des structures biologiques, en particuliers les ARN et les protéines, et une certaine forme de stabilité au niveau de notre mémoire. Les auteurs rappellent trois hypothèses, celle des prions, celle des boucles enzymatiques de *feedback* positif et les modifications épigénétiques qui, au niveau du génome, permettent de stabiliser une information, par exemple sous la forme d'une méthylation de l'ADN.

Il s'agit donc du lien entre ce qui se passe à la synapse et les modifications épigénétiques stables de la chromatine qui rendent compte d'une mémorisation de longue durée. Le modèle utilisé est celui de l'apprentissage de la rétraction des branchies chez l'aplysie. La libération de sérotonine par un interneurone facilite l'apprentissage de ce réflexe « drivé » par le motoneurone. Les auteurs de l'article ont observé la présence de piRNA synaptique dans le neurone sensoriel qui établit un contact avec le motoneurone et montré que le complexe PIWI/piRNA conduit à la méthylation du promoteur de CREB2, un facteur de transcription répresseur de la mémorisation à long terme, en s'hybridant avec le transcrite naissant. Cette méthylation bloque l'expression de CREB2 et augmente donc la mémorisation par modification épigénétique de la chromatine.

L'article de Li et ses collègues (Li *et al.*, 2013) nous ramène au « désastre ». Les auteurs ont examiné l'expression des TE dans les *mushroom bodies* au cours du vieillissement des drosophiles. Les *mushroom bodies* sont impliqués dans l'apprentissage et la mémoire chez les insectes. Les éléments choisis sont R1 et R2 qui appartiennent à la famille des LINE, et gypsy, de la famille des transposons à LTR (des rétrovirus domestiqués qui constituent chez *sapiens* 8 % du génome, contre 17 % pour les LINE). Ils ont observé une augmentation de ces transcrits TE au cours du vieillissement. Cette expression tardive s'accompagne d'une capacité de réintégration dans les *mushroom bodies*. La rétrotransposition augmente donc avec l'âge.

Ago2 est la protéine de la famille PIWI qui réprime la rétrotransposition dans les tissus adultes. Nous l'avons vu, l'expression de R1, R2 et gypsy augmente avec l'âge. Mieux, la mutation 51B dans Ago2 augmente la transcription de R2 et de gypsy (la mutation 414 ayant un effet faible sur R2 mais fort sur gypsy). On observe une absence de déclin comportemental entre le jeune et l'âgé dans la situation WT, mais une forte diminution chez les deux dans le mutant 414. La survie de la drosophile

diminue significativement chez les mutants. La dérégulation de la rétrotransposition a donc un effet délétère sur les performances cognitives des mouches âgées.

Ce groupe a aussi travaillé sur les humains et les souris (Li *et al.*, 2012). Constatant que l'expression de TE spécifiques est observée dans plusieurs désordres neurodégénératifs, les auteurs ont démontré que nombre des transcrits TE se lient à la protéine *TAR DNA-binding protein 43* (TDP-43). L'accumulation d'inclusions cytoplasmiques contenant TDP-43 est une caractéristique de plusieurs maladies neurodégénératives dont la sclérose latérale amyotrophie (ALS), la démence frontotemporale (FTLD) et l'Alzheimer, et des mutations dans cette protéine sont à l'origine de quelques cas de formes familiales ou sporadiques d'ALS. Reprenant les données sur les ARN immunoprécipités avec un anti TDP-43 (rat et humain), les auteurs ont trouvé un enrichissement spectaculaire en séquences dérivées de chaque classe de TE. En comparant entre humains sains et humains avec FTLD, ils ont constaté un enrichissement presque général chez les individus sains. Ces résultats suggèrent une diminution de la régulation des TE chez les patients.

Architecture du noyau et instabilité génétique

Les lamines sont des protéines nucléaires qui constituent un échafaudage auquel s'accrochent la chromatine et des protéines au rôle important dans la stabilité du génome. Des mutations dans les lamines ou dans des facteurs permettant leur maturation sont à l'origine de syndromes de vieillissement précoce. Plusieurs changements d'expression de lamines (lamines A/C et lamines B1/B2) ont été observés au cours du vieillissement cellulaire. Développons en nous appuyant sur la revue de Burke & Stewart (Burke and Stewart, 2013).

L'enveloppe nucléaire sépare le noyau du cytoplasme et régule le trafic nucléocytoplasmique *via* les complexes formant les pores nucléaires (NPC). Cette enveloppe a aussi une fonction d'ancrage du noyau dans la cellule et de la chromatine dans le noyau, tout particulièrement l'hétérochromatine enrichie en gènes silencieux à la périphérie du noyau, en contact avec l'échafaudage des lamines. L'enveloppe nucléaire se divise entre membrane interne (INM) et membrane externe (ONM) séparées par un espace périnucléaire (PNS) de 40 à 50 nm et traversées par le NPC. L'ONM est connectée au réticulum endoplasmique (ER) et enrichie en ses composants. En revanche l'INM a une composition très spécifique en lipides. Le récepteur à la lamine B (LBR) qui interagit directement avec HP1 (hétérochromatine protéine 1) est ancré dans l'INM.

Les lamines ont une fonction structurelle et contribuent au maintien de l'intégrité de l'enveloppe nucléaire. Mais leur influence se fait aussi sentir au niveau de l'organisation de la chromatine et dans plusieurs fonctions nucléaires, dont la transcription et la réplication. Par ailleurs, leur lien avec le cytosquelette suggère une fonction dans la signalisation entre cytoplasme et noyau. L'expression des lamines B est ubiquitaire, ce qui n'est pas le cas des lamines A. La première indication d'un lien entre lamine A et maladies humaines vient de l'étude d'une dystrophie musculaire liée à l'X (*X-linked Emery-Dreifuss muscular dystrophy* ou EDMD) qui trouve son origine dans la mutation du gène de l'émerine qui code pour une protéine de la membrane nucléaire interne interagissant avec la lamine A. Une autre mutation sur le gène de la lamine A (*LMNA*) conduit à une maladie très proche. Ce ne sont pas moins de douze maladies qui sont aujourd'hui liées à des

mutations de *LMNA*, dont une neuropathie périphérique (Charcot-Marie type 2), mais principalement des pathologies musculaires.

À partir du raisonnement selon lequel un tissu mou, comme le cerveau, est en général moins soumis à des tensions qu'un tissu dur, comme un os, Swift et ses collègues (Swift *et al.*, 2013) se sont intéressés à la capacité des cellules de répondre à des forces, y compris au niveau de leur noyau. Ce qui les a conduits à constater que la lamine A est dominante dans les tissus « durs » et que les lamines B le sont dans les tissus mous et que le type dominant (A ou B) est dicté par l'environnement. On comprend donc pourquoi le cerveau exprime principalement les lamines B. C'est à elles que nous nous intéresserons en priorité, limitant la discussion sur la lamine A à la seule progérine.

Il existe un grand nombre de laminopathies conduisant à une pathologie précise ou à un vieillissement, liées à des mutations ponctuelles dans le gène de la lamine A. La mutation la plus classique induit le *Hutchinson-Gilford progeria syndrom*, maladie rarissime marquée par un vieillissement et une mort prématurés. Cette mutation dans l'exon 11 du gène *LMNA* induit l'élimination de 50 acides aminés dans la région C-terminale. Cette forme courte de la lamine est appelée progérine. Son expression conduit à des déformations nucléaires, interfère avec la progression mitotique, induit une ségrégation anormale des chromosomes et provoque une instabilité du génome.

La progérine ne se trouve pas seulement chez les individus porteurs de la mutation, mais aussi chez les individus normaux. Son expression augmente de 3,5 % par an dès la naissance. Elle s'accumule dans tous les tissus et constitue un excellent marqueur biologique du vieillissement humain. La majorité des gènes dérégulés sont impliqués dans le métabolisme lipidique, la croissance cellulaire, la réplication de l'ADN et sa réparation. Cette variété dans les cibles pourrait s'expliquer par la modification des histones observée chez le mutant ainsi que par la réduction spectaculaire de l'hétérochromatine.

Il existe une corrélation entre un défaut de DDR et l'accumulation de progérine. Le noyau des souris mutantes accumule γ H2AX et présente un pattern anormal de méthylation de H3 et H4, plus une augmentation de HP1. On note aussi une augmentation d'ATM, ATR, p53 et des kinases de *checkpoint*. Le recrutement de 53BP1, Rad50 et Rad51 est retardé, d'où l'accumulation des cassures de l'ADN. On note aussi une augmentation du niveau basal des ROS. L'augmentation des ROS, la modification des histones et un recrutement déficient des enzymes de réparation de l'ADN semblent donc à l'origine du vieillissement causé par l'accumulation de progérine.

Les lamines B1 et B2 sont exprimées dans toutes les cellules, dont les neurones. La perte de lamine B induit une sénescence précoce des cellules. La localisation de la lamine B suggère un rôle important dans l'organisation de l'hétérochromatine. D'autres études proposent un rôle dans la formation du fuseau mitotique, la réplication de l'ADN, la transcription génétique, la formation des nucléoles et la réponse au stress oxydatif.

Les souris *lamin B2*^{-/-} étudiées par Coffinier et ses collègues (Coffinier *et al.*, 2010) présentent un cerveau plus petit que la normale (5 à 10 % de réduction), une organisation anormale des couches du cortex et meurent à la naissance. La désorganisation des couches résulte d'un défaut de prolifération et de migration. Comme le rappellent Burke et Stewart (Burke et Stewart, 2013), au cours de la migration, le prolongement qui se forme à l'avant est envahi par le centre organisateur des microtubules (MTOC) lui-même « rattrapé » par le noyau puis la cellule. Dans

les deux cas, division et migration, le mouvement du noyau et son rapport au cytosquelette jouent un rôle important, suggérant que la liaison du noyau au cytosquelette est affectée chez les mutants.

Il existe un lien entre une lamina dysfonctionnelle et une modification pathologique des mécanismes redox, mais les voies impliquées sont mal connues. Les lames tamponnent les ROS, mais trop de ROS conduisent à une lamina dysfonctionnelle avec des effets sur la connexion entre le noyau et le cytoplasme. À l'intérieur même du noyau, ces oxydations conduisent à une déplétion de l'hétérochromatine et une morphologie nucléaire pathologique. La modification de l'hétérochromatine induit des modifications transcriptionnelles et des perturbations de la DDR.

L'expression de la lamine B1 est fortement réprimée au cours de la sénescence, au point d'être quasiment indétectable. Cette baisse est accompagnée par une baisse des niveaux d'expression d'autres protéines interagissant avec les lames ou participant à l'organisation de la chromatine. En fait, la perte de lamine B1 a le même effet que celle de EZH2 (H3K27me3 méthylase), ce qui lie de nouveau sénescence et dérépression transcriptionnelle. Bref, la sénescence cellulaire s'accompagne d'une profonde réorganisation de l'épigénome et cette réorganisation est liée à des altérations des domaines associés aux lames avec transcription illégitime de gènes normalement réprimés.

Raccourcissement des télomères

Les télomères, extrémités des chromosomes linéaires, sont constitués de séquences répétées (chez *sapiens*, la séquence TTAGGG est répétée sur plusieurs milliers de bases) protégées par des protéines spécifiques formant le complexe *shelterin*. Au cours de la division cellulaire, la machinerie de réplication ne peut aller jusqu'au bout du chromosome et encore moins au-delà. De ce fait, la fin de l'ADN ne peut être copiée et à chaque division le télomère diminue de taille. Au bout d'un certain nombre de divisions, les cellules entrent en sénescence. Il existe un mécanisme de compensation qui repose sur la télomérase, une enzyme qui rallonge les télomères.

Comme le rappellent Armanios et Blackburn (Armanios et Blackburn, 2012), l'expression de la télomérase est augmentée dans la plupart des cancers. En effet, les cellules tumorales se multiplient indéfiniment alors que, normalement, le raccourcissement des télomères entraîne sénescence et apoptose après un nombre limité de divisions. 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 est 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*, inclut six protéines :

- *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 protègent le bout du chromosome et empêchent sa dégradation ou sa participation à des fusions chromosomiques. 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 télomérase est une DNA polymérase. Elle a deux composantes très conservées, la télomérase elle-même ou TERT qui a une activité transcriptase reverse (faire de l'ADN à partir de l'ARN) et un composant ARN, TR ou TERC, qui fournit le substrat à copier. Ces complexes ribonucléoprotéiques sont présents dans une structure nucléaire, le corps de Cajal (*Cajal bodies*). D'autres protéines sont associées à ce complexe et une mutation affectant un quelconque de ces composants a des effets sur l'activité enzymatique de la télomérase et le maintien de la longueur des télomères.

L'élongation des télomères est régulée entre les phases S et M du cycle cellulaire et à chaque cycle cellulaire tous les télomères ne sont pas allongés de façon égale, avec une priorité aux plus courts qui déclenchent la réponse de la télomérase. Dans le 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 !

Dans les maladies liées au raccourcissement des télomères, 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. 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 à l'apoptose et à la sénescence, sont distincts. Cela justifie que les cellules souches, ou leur compartiment d'amplification, soient ici en première ligne.

Pour l'illustrer, nous nous attarderons sur les cellules souches neurales à travers quelques articles. Un premier traite du lien possible entre neurogenèse, télomères et schizophrénie. La neurogenèse adulte chez les humains concerne en premier lieu l'hippocampe, structure impliquée dans nombre de fonctions cognitives. Ce sont les cellules glutamatergiques qui se renouvellent et ce renouvellement modulable par le comportement a été quantifié par le groupe de Jonas Frisé (Spalding *et al.*, 2013). Une première surprise est que, contrairement à ce qu'on observe chez le rat ou les souris, l'hippocampe humain génère des neurones du gyrus denté à un taux relativement constant jusqu'à des âges avancés et que tous les neurones de cette structure sont sujets au renouvellement, et pas seulement une sous-population. Les mesures suggèrent que 700 cellules sont renouvelées par an, soit un *turnover* de 1,75 % avec un déclin modeste au cours du vieillissement. On doit donc 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 au vieillissement.

Nous nous penchons maintenant sur un modèle murin de schizophrénie avec tous les *caveat* imaginables liés à la pertinence des modèles animaux et à l'hétérogénéité de la maladie. Ce modèle (Wolf *et al.*, 2011) consiste en l'injection de Poly I:C pendant la gestation (induction d'une inflammation maternelle touchant l'embryon). Les auteurs proposent qu'un raccourcissement des télomères dans les NPC (*neural precursor cells*) pourrait avoir un rôle dans la maladie.

La télomérase (TERT) est fortement exprimée dans les NPC au cours du développement et chez l'adulte. Chez les souris déficientes en TERT, les télomères raccourcissent avec l'âge et la neurogenèse est interrompue dans les NPC de la zone subventriculaire (SVZ). Parallèlement, les comportements qui dépendent de la neurogenèse, y compris de celle qui a lieu dans l'hippocampe, sont affectés. Donc, 50 jours après l'injection de Poly I:C, les animaux ont été soumis à un test de course volontaire sur la roue et au test « schizophrénie » de *prepulse inhibition* (un léger signal diminue la réponse de sursaut à un signal plus fort et ultérieur). La baisse de l'inhibition après Poly I:C est effacée par l'exercice physique. Les souris sont normales sur le plan moteur mais désorientées et hyperactives, phénotype aussi corrigé par l'exercice physique.

Les auteurs ont mesuré la neurogenèse au niveau de l'hippocampe en déterminant le nombre et le phénotype des cellules nouvellement générées quatre semaines après la dernière injection de BrdU, à la fin de la période de course. Les marqueurs utilisés (Nestin, DCX, NeuN) ont permis de constater, chez les souris Poly I:C, une baisse du nombre des cellules en prolifération et une restauration par la course. Un autre effet concerne la maturation des cellules. En effet, le Poly I:C a un effet surtout sur les cellules DCX et NeuN, donc sur la maturation des cellules générées. Chez les cellules DCX (neuroblastes en division tardive), l'activité TERT baisse entre le premier et le 60^e jour (P60) chez les animaux contrôles et les animaux Poly I:C, avec une légère restauration liée à l'exercice physique. La longueur des télomères diminue sur la même période, sans effet de l'exercice, ce qui suggère que l'augmentation faible de l'activité TERT n'est pas suffisante, ou que cette augmentation touche seulement quelques télomères (les plus courts).

Terminons par un article sur les cellules souches de la SVZ. Chez la souris, ces cellules contribuent au renouvellement des cellules periglomérulaires et des cellules des grains du bulbe olfactif. Elles expriment un marqueur astroglial, la GFAP et des facteurs de transcription dont Sox2 et Pax6. Comme toutes les cellules souches, elles se divisent lentement, ce qui peut préserver leurs télomères. Mais elles sont amplifiées au niveau d'un compartiment d'amplification où l'on imagine facilement un raccourcissement important des télomères. Ce qui signifie que les neuroblastes qui continuent de se diviser poursuivent cette action de réduction jusqu'à ce qu'on passe à un neurone post-mitotique (stabilité des télomères), mais aussi, nécessairement, avec des inégalités entre neurones, ce qui peut avoir des conséquences fonctionnelles si les télomères jouent un rôle dans la différenciation des neurones.

Ferron et ses collègues (Ferron *et al.*, 2009) mettent l'accent sur la différenciation des neurones ayant de petits télomères « nés vieux » et sur le « trouble » que cela peut induire. Dans un article plus ancien (Ferron *et al.*, 2004), le même groupe avait utilisé les souris mutantes pour TERC (*Terc* *-/-*), l'ARN copié par TERT. Ces souris sont viables et se reproduisent mais, du fait de la perte d'environ 5 kb de télomère par génération, la survie diminue au fil des générations. On travaille généralement sur la génération 4 (G4). La prolifération au niveau de la SVZ est fortement réduite chez les souris G4 comme l'est le nombre de progéniteurs (DCX). On note aussi une atrophie du bulbe. La prolifération des cellules SVZ est très diminuée chez les souris mutantes G4 âgées de 4 à 5 mois. Il n'en va pas de même des cellules de souris embryonnaires (E14,5) ce qui suggère que les cellules adultes, passées par un grand nombre de divisions, ont des télomères plus courts que chez l'embryon. La longueur des télomères n'est pas homogène dans les cellules et diminue (en

moyenne) entre l'embryon et l'adulte WT. Chez les mutants, la longueur des télomères est diminuée aux stades embryonnaire et adulte et les télomères sont plus courts chez l'adulte que chez l'embryon, ce qui expliquerait pourquoi les cellules embryonnaires des mutants (qui ont l'âge télomérique des cellules adultes sauvages) prolifèrent correctement, contrairement aux cellules mutées adultes.

Une fois générés, les nouveaux neurones se différencient et s'intègrent dans les réseaux neuronaux préexistants. En comparant le marquage BrdU avec les marqueurs de différenciation, Ferron et ses collègues (Ferron *et al.*, 2009) ont observé que la densité de cellules marquées est plus faible chez les souris âgées. Au-delà, les dendrites sont plus courtes à 12 mois qu'à 2 mois. Quand de tels phénomènes de modification de la différenciation ont été observés, par exemple au niveau des follicules pileux, il a été difficile de les séparer des troubles du cycle cellulaire. Ici, ce n'est pas le cas puisque, d'une part, les cellules prolifèrent normalement, et de l'autre, nous avons essentiellement affaire à des cellules en G0. D'où une interrogation sur le rôle des télomères dans la différenciation des cellules post-mitotiques. L'étude de ce point en culture suggère que les cellules aux petits télomères peinent à s'engager dans la voie d'une différenciation neuronale, avec une baisse de la différenciation dendritique chez les mutants.

Cela indique que le raccourcissement des télomères a une fonction indépendante du cycle cellulaire. La possibilité de l'intervention de p53 a donc été avancée, d'autant plus que le pourcentage de cellules ayant du p53 nucléaire passe de 5 à 50 entre le sauvage et le mutant (cellules en culture) et que l'activité de p53 augmente chez les mutants, non seulement dans les cellules en prolifération, mais aussi dans les cellules en cours de différenciation. Cette augmentation de p53 ne s'accompagne ni d'une modification du taux de division (BrdU) ni d'une augmentation à ce stade de la mort cellulaire, suggérant une action directe de p53 sur la formation de dendrites. Afin de vérifier ce point, les auteurs ont mis des neurones du striatum en culture à partir d'embryons (E14,5) normaux ou *p53*^{-/-} et observé que la mutation augmente la dendrogenèse.

Pour conclure, on proposera que les cellules souches adultes n'ont probablement pas une capacité illimitée de se répliquer sans que cette réplification ne soit marquée par la réduction des télomères. Même si ce raccourcissement n'a pas de conséquence sur la survie des cellules souches parce que le nombre de leurs divisions ne permet pas d'atteindre le seuil critique de sénescence et d'apoptose, les étapes suivantes sont rendues plus problématiques. D'une part, il y a le compartiment d'amplification, et si l'on amplifie des cellules qui sont déjà raccourcies au niveau de leurs télomères, alors cette amplification peut permettre d'atteindre un seuil critique de sénescence. Ensuite, à supposer que tel ne soit pas le cas et que nous passions la phase d'amplification, les cellules aux télomères raccourcis ne se différencient pas de façon satisfaisante, sans aucun doute avec des conséquences physiologiques une fois que ces cellules se sont intégrées aux réseaux de neurones.

Conclusion provisoire et annonce du cours suivant

La chaîne respiratoire localisée sur la membrane interne de la mitochondrie est le site principal de production des superoxydes, une espèce oxygénée réactive (définition globale des ROS) très abondante. Les superoxydes (O_2^-) sont générés au niveau des complexes I et III de la chaîne respiratoire puis, pour une part importante, transformés en H_2O_2 par la superoxyde dismutase (SOD). H_2O_2 n'est pas toxique

en lui-même mais peut le devenir suite à la réaction de Fenton catalysée par les métaux de transition dans la classification de Mendeleïev et la génération de radicaux hydroxyle qui sont les agents les plus réactifs et créateurs de lésions oxydantes touchant lipides, protéines et acides nucléiques.

Il existe des preuves solides d'une augmentation du nombre de mutations de l'ADN mitochondrial (mtDNA) avec l'âge. Elle résulte de lésions non réparées de l'ADN, du fait des ROS, et des erreurs introduites au cours de la réplication de l'ADN. Une cellule somatique humaine contient des milliers de copies de mtDNA et les mitochondries se dupliquent sans lien avec le cycle cellulaire. Une même cellule peut contenir des mitochondries distinctes sur le plan génétique (hétéroplasmie) et pour une mutation à effet pathologique, l'apparition de la maladie dépendra des niveaux respectifs des populations saines et « atteintes ». Cette tolérance peut osciller selon la pathologie, et la distribution inégale des mitochondries bien portantes et « malades » peut varier entre les tissus, voire les cellules d'un même tissu.

Pour étudier le rôle de ces mutations dans le vieillissement, des souris ont été produites, chez lesquelles une sous-unité de la polymérase mitochondriale chargée de la correction des erreurs est déficiente (*mtDNA mutator mice*). Ces souris *mutator* vieillissent précocement et ont une durée de vie réduite. Le développement de leurs cellules souches hématopoïétiques et neurales est affecté dès la période embryonnaire et les cellules souches neurales, réduites en nombre *in vivo*, prolifèrent mal *in vitro*. Le dysfonctionnement de la chaîne respiratoire n'apparaît que tardivement dans les tissus somatiques post-mitotiques, rendant possible que ce phénotype trouve sa cause première dans l'atteinte des cellules souches à travers des erreurs de réplication au cours du développement plutôt que dans des lésions qui s'accumuleraient au cours de la vie adulte. Un traitement avec l'antioxydant N-acetylcystéine rétablit la capacité des cellules souches neurales à se renouveler, indiquant que des changements subtils dans l'état redox et/ou le niveau des ROS régulent la fonction des cellules souches, même si leur mesure n'en démontre pas une forte augmentation chez cette souris.

Ces travaux semblent en contradiction avec l'idée dominante que les lésions oxydatives ont un rôle causal et les auteurs mettent en doute la validité d'une théorie du vieillissement fondée sur une production anormale de radicaux libres par les mitochondries. Tout en conservant l'idée qu'il peut y avoir une dysfonction mitochondriale primaire, ils proposent qu'une altération métabolique plus large pourrait avoir des effets secondaires sur la production énergétique de la mitochondrie ou même sur leur biogenèse. Ils invoquent la possibilité de défauts de la signalisation rétrograde *via* des facteurs et gènes nucléaires ou des produits du métabolisme mitochondrial (ATP, Ca⁺⁺, ROS, NO, NAD⁺/NADH). En effet, dans plusieurs organismes, le métabolisme mitochondrial régule la longévité *via* le *nutrient sensing pathway* et la restriction calorique. La signalisation par insuline ou *insulin-like growth factor* (IGF-1), dite signalisation IIS (mesure du glucose), et la signalisation *via* mTOR (mesure des acides aminés) sont les deux systèmes de mesure des nutriments.

Une altération de IIS et une inhibition de mTOR (par la rapamycine) augmentent la longévité des mouches, des vers et des mammifères. De même, pour la restriction calorique, depuis la levure jusqu'aux primates (sur *sapiens*, il y a des doutes). Nous y reviendrons l'année prochaine non sans avoir, au préalable, tenté une réhabilitation des ROS à travers une revue de Nathan et Cunningham-Bussel (Nathan et Cunningham-Bussel, 2013). Le terme de ROS subsume ici toutes les espèces

oxygénées réactives, espèces qui participent à un grand nombre de phénomènes biologiques et qu'il est parfois difficile de séparer ou de quantifier séparément, même si des outils se mettent en place pour permettre aussi de localiser les ROS dans la cellule. Ajoutons que les ROS ne sont pas les seules petites molécules réactives et qu'il faut compter avec les espèces azotés (NO^* , NO_2^*) ou carbonées (CO), ou les sulfures (H_2S , HS^-) qui ont des effets parfois proches de ceux des ROS.

Les ROS sont générés par les NADPH oxydases (NOX) au niveau mitochondrial, du réticulum endoplasmique et des membranes plasmiques. Leur production est très précisément régulée, avec plusieurs points de contrôle. Les NOX sont des enzymes transmembranaires qui peuvent être activées par la fixation à leur récepteur d'un grand nombre de ligands (insuline, NGF...). La régulation de la concentration en ROS se fait au niveau de leur synthèse et de leur dégradation, et à des concentrations faibles, les ROS ont une fonction physiologique. Les auteurs distinguent plusieurs types de cibles des ROS. D'abord, les cibles atomiques à travers une liaison covalente, souvent réversible, avec certains atomes positionnés correctement au sein de macromolécules. Ces modifications physiologiques, du fait de la diffusion des ROS, peuvent toucher de façon synchrone plusieurs voies physiologiques qui sont ainsi modifiées en réponse à l'état métabolique de la cellule. Une des cibles atomiques privilégiées est le sulfure des cystéines et des méthionines placées dans un environnement acide. Peu de travaux ont été consacrés à cette question. Parmi les protéines cibles (connues) des ROS, on citera de nombreuses kinases et phosphatases, de nombreux facteurs de transcription aussi.

Au-delà du ciblage d'atomes spécifique, les ROS touchent nombre de macromolécules, au premier rang desquelles l'ADN. Par exemple, les ROS produits par la mitochondrie périmoléculaire peuvent oxyder les résidus guanine au niveau de promoteurs spécifiques et modifier la transcription de gènes régulés par ces promoteurs. Exemple éloquent, l'oxydation d'une guanine dans le promoteur du VEGF (à l'origine du bourgeonnement des vaisseaux et d'une meilleure oxygénation du tissu) stimule la fixation du *hypoxia-induced-factor* et la transcription du gène encodant le VEGF. L'oxydation s'inscrit ici dans une régulation physiologique qui apporte une réponse à une situation d'hypoxie. Dans la même veine, la cassure de l'ADN qui suit le mécanisme de *base excision repair* donne accès à des facteurs de transcription qui initient une réponse aux androgènes ou aux œstrogènes.

Où l'on voit le plaisir pris ici à clore un cours qui commença de façon si catastrophique et qui se termine si bien. Ce qui j'espère incitera à revenir l'année prochaine pour que nous puissions continuer à faire tourner cette roue des neuf marqueurs qui a structuré l'enseignement de cette année.

Références

- Armanios M., and Blackburn E.H. (2012), The telomere syndromes, *Nat Rev Genet*, 13, 693-704.
- Burke B., and Stewart C.L. (2013). The nuclear lamins: flexibility in function, *Nat Rev Mol Cell Biol*, 14, 13-24.
- Chowdhury D., Choi Y.E., and Brault M.E. (2013), Charity begins at home: non-coding RNA functions in DNA repair, *Nat Rev Mol Cell Biol*, 14, 181-189.
- Coffinier C., Chang S.Y., Nobumori C., Tu Y., Farber E.A., Toth J.I., Fong L.G., and Young S.G. (2010), Abnormal development of the cerebral cortex and cerebellum in the setting of lamin B2 deficiency, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 5076-5081.

Ferron S., Mira H., Franco S., Cano-Jaimez M., Bellmunt E., Ramirez C., Farinas I., and Blasco M.A. (2004), Telomere shortening and chromosomal instability abrogates proliferation of adult but not embryonic neural stem cells, *Development*, 131, 4059-4070.

Ferron S.R., Marques-Torrejón M.A., Mira H., Flores I., Taylor K., Blasco M.A., and Farinas I. (2009), Telomere shortening in neural stem cells disrupts neuronal differentiation and neurogenesis, *J Neurosci*, 29, 14394-14407.

Herrup K., Chen J., and Li J. (2013), Breaking news: thinking may be bad for DNA, *Nat Neurosci*, 16, 518-519.

Iyama T., and Wilson D.M., 3rd (2013), DNA repair mechanisms in dividing and non-dividing cells, *DNA Repair (Amst)*, 12, 620-636.

Li W., Jin Y., Prazak L., Hammell M., and Dubnau J. (2012), Transposable elements in TDP-43-mediated neurodegenerative disorders, *PLoS One*, 7, e44099.

Li W., Prazak L., Chatterjee N., Gruninger S., Krug L., Theodorou D., and Dubnau J. (2013), Activation of transposable elements during aging and neuronal decline in *Drosophila*, *Nat Neurosci*, 16, 529-531.

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

Lord C.J., and Ashworth A. (2012), The DNA damage response and cancer therapy, *Nature*, 481, 287-294.

Nathan C., and Cunningham-Bussell A. (2013), Beyond oxidative stress: an immunologist's guide to reactive oxygen species, *Nat Rev Immunol*, 13, 349-361.

O'Sullivan R.J., and Karlseder J. (2012), The great unravelling: chromatin as a modulator of the aging process, *Trends Biochem Sci*, 37, 466-476.

Price B.D., and D'Andrea A.D. (2013), Chromatin remodeling at DNA double-strand breaks, *Cell*, 152, 1344-1354.

Rajasethupathy P., Antonov I., Sheridan R., Frey S., Sander C., Tuschl T., and Kandel E.R. (2012), A role for neuronal piRNAs in the epigenetic control of memory-related synaptic plasticity, *Cell*, 149, 693-707.

Seeber A., Hauer M., and Gasser S.M. (2013), Nucleosome remodelers in double-strand break repair, *Curr Opin Genet Dev*, 23, 174-184.

Sharma V., and Misteli T. (2013), Non-coding RNAs in DNA damage and repair, *FEBS Lett*, 587, 1832-1839.

Spalding K.L., Bergmann O., Alkass K., Bernard S., Salehpour M., Huttner H.B., Bostrom E., Westerlund I., Vial C., Buchholz B.A., et al. (2013), Dynamics of hippocampal neurogenesis in adult humans, *Cell*, 153, 1219-1227.

St Laurent G., 3rd, Hammell N., and McCaffrey T.A. (2010), A LINE-1 component to human aging: do LINE elements exact a longevity cost for evolutionary advantage?, *Mech Ageing Dev*, 131, 299-305.

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

Swift J., Ivanovska I.L., Buxboim A., Harada T., Dingal P.C., Pinter J., Pajeroski J.D., Spinler K.R., Shin J.W., Tewari M., et al. (2013), Nuclear lamin-A scales with tissue stiffness and enhances matrix-directed differentiation, *Science*, 341, 1240104.

Wolf S.A., Melnik A., and Kempermann G. (2011), Physical exercise increases adult neurogenesis and telomerase activity, and improves behavioral deficits in a mouse model of schizophrenia, *Brain Behav Immun*, 25, 971-980.

Séminaires (sous la forme de deux colloques)

Colloque : Development, maintenance and physiology of neural circuits^b

Le colloque s'est tenu les 29 et 30 avril 2014. Y ont participé :

- Martin Meyer, MRC, Londres, Royaume-Unis ;
- Jin Woo Kim, KAIST, Deajon, Corée ;
- Sonia Garel, ENS, Paris, France ;
- Erin Schuman, MPI, Frankfurt, Allemagne ;
- Antoine Triller, ENS, Paris, France ;
- Fekrije Selimi, Collège de France, Paris, France ;
- Tommaso Pizzorusso, CNR, Pizza, Italie ;
- Takao Hensch, Harvard University, Cambridge, États-Unis ;
- Hiroshi Kitagawa, Kobe University, Japon ;
- Alain Prochiantz, Collège de France, Paris, France.

Colloque : Pathophysiologie du système nerveux : nouvelles pistes, nouveaux modèles^c

Le colloque s'est tenu le 13 mai 2014, avec les participants suivants :

- Emmanuel Brouillet, CEA, Fontenay-aux-Roses, France ;
- Serge Birman, ESPCI, Paris, France ;
- Julia Fuchs, Collège de France, Paris, France ;
- Hocine Rekaik, Collège de France, Paris, France ;
- Kenneth Moya, Collège de France, Paris, France ;
- Raoul Torero-Ibad, Collège de France, Paris, France ;
- Clémence Bernard, Collège de France, Paris, France ;
- Jean-François Ghersi-Egea, INSERM U1028/CNRS UMR5292, Lyon, France ;
- Catherine Barthélémy, INSERM U930, Tours, France.

RECHERCHE

Otx2 dans le développement et la plasticité du système visuel

Nous avons poursuivi nos travaux au niveau de l'œil et du cortex visuel. Pour l'œil, nous avons produit des souris transgéniques qui ont six « forces » du facteur de transcription Otx2 : 0 %, 30 %, 50 %, 75 %, 90 % ou 100 %. Les résultats publiés dans *Human Molecular Genetics* démontrent que le vieillissement est une composante importante de l'apparition d'une pathologie associée à une mutation ou à une dérégulation légère.

b. Le colloque est disponible en vidéo sur le site Internet du Collège de France : http://www.college-de-france.fr/site/alain-prochiantz/seminar-2013-2014__1.htm [NdÉ].

c. Le colloque est disponible en vidéo sur le site Internet du Collège de France : <http://www.college-de-france.fr/site/alain-prochiantz/seminar-2013-2014.htm> [NdÉ].

Pour le niveau cortical, nous avons poursuivi les travaux sur le rôle du transport d'Otx2 du plexus choroïde aux neurones à parvulmine (*PV-cells*) du cortex visuel, mais aussi de toutes les autres régions du cortex cérébral. Les avancées les plus significatives sont la démonstration de la généralité du phénomène au-delà du cortex visuel et l'identification des cibles transcriptionnelles d'Otx2 dans les *PV-cells*. Cette identification nous permettra de mieux comprendre les mécanismes d'ouverture, de fermeture et de réouverture chez l'adulte de la plasticité corticale. Une partie du travail a été publiée dans *Cell. Reports* en 2013 et est en phase de soumission à travers deux articles rédigés en collaboration avec le groupe de Takao Hensch (Harvard Medical School).

Formation des bords dans le neuroépithélium

Nous avons proposé que les homéoprotéines (HP) agissent comme des morphogènes au sens de Turing au cours du développement précoce. De fait, la modélisation (collaboration avec Jonathan Touboul du CIRB) suggère que l'addition d'une sécrétion locale des HP au niveau de la frontière entre deux territoires, chacun exprimant une HP et les deux HP étant auto-activatrices et inhibitrices réciproques (Turing), stabilise le bord. Cet article de modélisation a été accepté pour publication. Parallèlement nous avons développé des souris transgéniques dans lesquelles nous pouvons forcer la sécrétion localisée d'anticorps anti-HP. Cette approche en collaboration avec les équipes de Shen-Ju Chou (Taiwan) et Alessandra Pierani (IJM, Paris VII) permettra de tester l'hypothèse.

Maladie de Parkinson

Nous avons publié en 2007 et 2011 que l'*HP Engrailed* (Engrailed 1 et Engrailed 2 ou En1/2) agit comme protéine thérapeutique dans plusieurs modèles murins de la maladie de Parkinson. Ce travail entre dans le cadre de la démonstration d'une mort progressive des neurones dopaminergiques dans la souris *En1+/-*. Cette souris est donc un bon modèle murin de la maladie (article publié dans *Neurobiology of Disease*, collaboration avec le groupe de Patrick Brundin, Van Andel Research Institute, Michigan).

À partir de ces souris, nous avons approfondi les mécanismes présidant à la mort des neurones et démontré l'existence de cassures double-brin de l'ADN et d'un relâchement de l'hétérochromatine menant à l'expression illégitime de gènes toxiques, dont des éléments transposables, dont l'activité endonucléase pourrait se trouver à l'origine de la formation des cassures. Dans ce système, En1/2 utilisé comme protéine thérapeutique restructure la chromatine et induit une réparation des cassures. Un article a été soumis et un autre est en préparation.

Maladie d'Alzheimer

Au cours d'un séquençage des ARN du plexus choroïde, nous avons observé que le gène de la protéine β APP, précurseur (i) du sAPP sécrété et (ii) du peptide amyloïde principal composant les plaques séniles, est très fortement exprimé dans cette structure. Comme le plexus choroïde est accessible de façon peu invasive, nous avons formé l'hypothèse (Brevet N° 13 56551) selon laquelle corriger un

défaut au seul niveau du plexus pourrait modifier le cours de la maladie. Dans un premier temps, nous avons induit des pertes et des gains de fonction du β APP dans le plexus, ce qui modifie en plus ou en moins la sécrétion du sAPP dans le liquide céphalorachidien. Cette manipulation est suffisante pour augmenter (gain de fonction) ou diminuer (perte de fonction) la neurogenèse adulte chez la souris.

PUBLICATIONS

Articles

SPATAZZA J., DI LULLO E., JOLIOT A., DUPONT E., MOYA K.L. et PROCHIANTZ A., « Homeoprotein signaling in development, health, and disease: a shaking of dogmas offers challenges and promises from bench to bed », *Pharmacological Reviews*, 65(1), 2013, 90-104, DOI : 10.1124/pr.112.006577.

DESPRAS G., BERNARD C., PERROT A., CATTIAUX L., PROCHIANTZ A., LORTAT-JACOB H. et MALLET J.-M., « Toward libraries of biotinylated chondroitin sulfate analogues: from synthesis to in vivo studies », *Chemistry*, 19(2), 2013, 531-540, DOI : 10.1002/chem.201202173.

SPATAZZA J. (*co-first*), LEE H.H.C. (*co-first*), DI NARDO A.A., TIBALDI L., JOLIOT A., HENSCH T.K.* et PROCHIANTZ A.*, « Choroid-plexus-derived Otx2 homeoprotein constrains adult cortical plasticity », *Cell. Reports*, 3(6), 2013, 1815-1823, DOI : 10.1016/j.celrep.2013.05.014.

PROCHIANTZ A., « Signaling with homeoprotein transcription factors in development and throughout adulthood », *Current Genomics*, 14(6), 2013, 361-370, DOI : 10.2174/1389202911314060009.

BERNARD C (*co-first*), KIM H.-T. (*co-first*), TORERO IBAD R. (*co-first*), 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), 2014, 1742-1753, DOI : 10.1093/hmg/ddt562.

PROCHIANTZ A., FUCHS J. et NARDO A.A.D., « Postnatal signalling with homeoprotein transcription factors », *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 26 septembre 2014, 369(1652), 20130518, DOI : 10.1098/rstb.2013.0518.

Brevets

A. Prochiantz, K. Arnaud, K. Moya & A. Di Nardo, 4 juillet 2013. Inhibition de la synthèse de la protéine bêtaAPP ou de l'activité du peptide A β dans les plexus choroïdes. N° 13 56551.

Participation à des congrès

The 4th Symposium for the Global Research Laboratory Program, 5 février 2013, Seoul, Corée.

From Brain Compartments to Functional Circuits and Behaviour, 9-10 mai 2013, King's College, Londres, Royaume-Unis.

Dopamine 2013 meeting, 24-28 mai 2013, Alghero, Sardaigne, Italie.

* Corresponding authors.

The Future of Axon Guidance, 27 mai-1^{er} juin 2013, Les Treilles, France.

European Human Genetics Conference, 8-11 juin 2013, Paris, France ; Opening lecture.

Building Beauty, The 3rd International COS Symposium, 20-22 juin 2013, Heidelberg, Allemagne ; Key note lecture.

USIAS Annual Symposium, 12-13 décembre 2013, Strasbourg, France.

Development, maintenance and physiology of neural circuits, 29-30 avril 2014, Paris, France.

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

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

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

