



28 octobre 2013

Mitochondries, stress oxydatif, radicaux libres

Avant de m'engager dans la question de l'architecture du noyau et de l'instabilité génétique, je vais revenir quelques instants sur la fin du cours de la semaine dernière que j'ai un peu expédié faute de temps.

Je vous rappelle (**DIA IV.2**) que chez la *Drosophile*, le vieillissement s'accompagne de l'induction de l'expression de rétrotransposons, que ce soit des rétrotransposons à LTR (comme *gypsy*) ou des rétrotransposons plus classiques comme les LINEs et que cette expression s'accompagne d'une baisse de la performance comportementale et d'une augmentation de la mortalité surtout quand Argonaute est inactivé ce qui diminue l'activité de répression par les piRNA (**DIA IV.3**).

Mais évidemment ce ne sont là que des mouches et je vais clore cette section avec un travail du même groupe sur les humains et les souris (Li *et al.*, *PLOS One* 7, 9, e4409, 2012). Partant de la constatation que l'expression d'éléments transposables (TE) spécifiques a été observée dans plusieurs désordres de type neurodégénératif, les auteurs ont démontré que nombre des transcrits d'éléments transposables se lient à une RNA-binding protein appelée TAR DNA-binding protein 43 (TDP-43) qui joue un rôle dans la sclérose latérale amyotrophique (SLA) et les dégénérescences fronto-temporales (FTLD). D'où les expériences et hypothèse qui suivent sur le rôle des TE et de leur répression dans la régulation de la neurodégénérescence et du vieillissement chez les mammifères.

L'accumulation d'inclusions cytoplasmiques contenant TDP-43 est une caractéristique de plusieurs maladies neurodégénératives dont l'ALS, la FTLD et l'AD. Des mutations dans cette protéine sont à l'origine de quelques cas de formes familiales ou sporadiques d'ALS. Les auteurs ont donc repris les données déjà publiées sur les ARN immunopré-

cipités avec un anti TDP-43 (rat et humain) et trouvé un enrichissement spectaculaire en séquences dérivées de chaque classe de TE (**DIA IV.4**, en haut à gauche). En comparant entre humains sains et humains avec une dégénérescence fronto-temporale (FTLD), les auteurs constatent un enrichissement presque général chez les individus sains (**DIA IV.4** en haut à droite). Ces résultats pouvaient suggérer chez les patients une diminution de la régulation des TE. Cette hypothèse a été testée de deux façons différentes.

Dans un premier temps les auteurs ont analysé le nombre de « reads » de séquences répétitives (les TE sont des séquences répétitives) dans des données de séquençage d'ARN à partir de modèles murins de pathologie TDP-43. Deux modèles ont été utilisés, un de gain de fonction de TDP-43 humaine dans une souris transgénique et l'autre de perte de fonction (oligonucléotides antisens) dans le striatum de souris. Le gain de fonction de cette protéine qui s'agrège est censé exercer un effet dominant négatif sur la fonction normale de TDP-43 et est donc identique, par ses effets, à une perte de fonction. Dans les deux modèles (**DIA IV.4**, en bas) on constate en effet une forte augmentation de 86 (gain de fonction) et 223 (perte de fonction) de l'expression des TE de toutes les familles.

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

Je commencerai ce chapitre de notre promenade dans la longévité par des protéines qu'on appelle les lamines nucléaires. Ces lamines appartiennent à la classe des filaments intermédiaires et participe donc au cytosquelette cellulaire (je développerai dans un moment) et constituent un



échafaudage auquel s'accrochent la chromatine et d'autres protéines jouant un rôle important dans la stabilité du génome. Des mutations dans les lamines ou des facteurs permettant leur maturation sont à l'origine de syndromes de vieillissement précoce (Hutchinson-Gilford, Néstor-Guillermo progeria) et plusieurs changements d'expression de lamines (lamines A/C et lamine B1/B2) ont été observés au cours du vieillissement cellulaire (encore faut-il distinguer la cause de l'effet). Je commencerai donc par expliquer ce que sont les lamines en m'appuyant essentiellement sur la revue de Burke & Stewart (*Nature Reviews MCB*. 14: 13-24, 2013).

L'enveloppe nucléaire qui sépare le noyau du cytoplasme joue évidemment un rôle régulateur du trafic nucléocytoplasmique (le transport de molécules entre noyau et cytoplasmes et dans les deux directions) via, en particulier, les complexes formant les pores nucléaires ou NPC (**DIA IV.5**). Mais cette enveloppe a aussi une fonction essentielle d'ancrage du noyau dans la cellule (nous y reviendrons) et d'ancrage de la chromatine dans le noyau, tout particulièrement l'hétérochromatine enrichie en gènes silencieux et fortement enrichie à la périphérie du noyau, en contact donc avec l'échafaudage des lamines. L'enveloppe nucléaire se divise entre membrane interne (INM) et membrane externe (OMN) séparées par un espace périnucléaire (PNS) de 40 à 50 nm et traversées par le complexe du pore nucléaire (NPC) (**DIA IV.5**). L'ONM est fortement connectée au réticulum endoplasmique (ER) et enrichie en composants de l'ER. En revanche l'INM même si elle est en continuité avec l'ONM au niveau des pores nucléaires a une composition très spécifique en lipides et en protéines. Chez les métazoaires, il existe en plus une forme de lame basale ou lame nucléaire (nuclear lamina) qui consiste en un assemblage de protéines (15 à 20 nm de d'épaisseur) qui sous-tend l'INM. Cette lame est essentiellement composée de protéines, les lamines, dont le rôle dépasse très largement le seul maintien de la structure nucléaire. Dans cette **DIA IV.5**, notons aussi la présence du récepteur à la lamine B (LBR) qui interagit directement avec HP1 (hétérochromatine Protéine 1).

Le composant majoritaire de cette lamina sont les lamines de type A et de type B. Il est aujourd'hui acquis que ces protéines ont certes un rôle structurel mais aussi des fonctions physiologiques importantes. Ces protéines appartiennent à la catégorie des filaments intermédiaires (plus gros que l'actine, mais moins que la tubuline) dont ils sont les précurseurs évolutifs (une lamine B est trouvée chez les cnidaires (par exemple les hydres) avec un domaine central hélicoïdal (rod domain) et deux domaines C-ter et N-ter non hélicoïdaux (**DIA IV.6**). La région N-ter est très courte et la C-ter avec sa NLS (signal de localisation nucléaire qui permet, par fixation aux importines un passage à travers le pore nucléaire et de ce fait l'import dans le noyau de la protéine synthétisée dans le cytoplasme) a une structure Ig-like globulaire (du type trouvé dans les immunoglobulines). On sépare les lamines en deux classes, les lamines de type-A et celles de type-B. Chez les mammifères les type-A incluent la lamine A, la lamine C, la lamine C2 et la lamine AΔ10. Elles sont toutes encodées par un même gène (*LMNA* chez les humains) et générées par épissage différentiel du prémessager. La lamine C2 est uniquement testiculaire et AΔ10 est minoritaire. Je me concentrerai donc, pour les produits du gène *LMNA*, sur les lamines A et C. Pour les lamines B, elles se séparent en B1 et B2 encodées par deux gènes distincts *LMNB1* et *LMNB2*. On ignorera B3 dérivée de *LMNB2* par épissage alternatif et essentiellement testiculaire. Les lamines A et B ont un CaaX terminal (C est une cystéine, a un acide aminé aliphatique (Glycine, Alanine, Valine, Leucine, Iso-leucine, Proline et Méthionine) et X le plus souvent une méthionine). Ces sites CaaX permettent une farnésylation ou une carboxyméthylation, c'est-à-dire l'addition d'une queue lipidique. La farnésylation permet l'adressage membranaire et l'ancrage dans la bicouche lipidique de la membrane nucléaire interne (**DIA IV.5**). Les lamines B gardent le groupement farnésyl mais la lamine A le perd par clivage enzymatique par la protéase ZMPSTE24 (**DIA IV.6**).

Malgré leur découverte déjà assez ancienne (35 ans) la fonction des lamines est toujours objet de débats. Elles sont dépourvues d'activité enzyma-



tique et peu solubles, ce qui suggère une fonction de type structurel. Il est d'ailleurs évident que cela est en partie le cas, puisqu'elles contribuent au maintien de l'intégrité de l'enveloppe nucléaire. Mais leur influence est plus profonde puisqu'elle se fait sentir au niveau de l'organisation de la chromatine et de nombreux aspects du métabolisme nucléaire dont la transcription et la réplication. Par ailleurs, le lien avec le cytosquelette (**DIA IV.5**) suggère des effets possibles sur le comportement cellulaire et une implication dans la signalisations entre cytoplasme et noyau (je reviendrai peut-être sur cette possibilité), sans oublier un rôle possible sur l'organisation de la matrice extracellulaire via une interactif avec la voie Wnt (nous avons beaucoup parlé de cette voie de signalisation dans les années précédentes et je vous rafraîchirai la mémoire dans un moment). L'expression des lamines B est ubiquitaire (partagée par toutes les cellules), ce qui n'est pas le cas des lamines A. Ces dernières ne sont donc pas absolument indispensables à la bonne structuration du noyau ni à sa physiologie.

Sur le plan des pathologies, 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'emeryn (**DIA IV.5**) qui code pour une protéine de la membrane nucléaire interne qui interagit avec lamine A. Une autre mutation sur *LMNA* (autosome) 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. Ce qui pose une question intéressante étant donné que la *LMNA* est exprimée dans des tissus autres que musculaires. Ou bien la mutation affecte une interaction avec une protéine spécifiquement exprimée dans le muscle strié (ou cardiaque), ou bien nous sommes ramenés à la question du stress auquel l'activité physique soumet les cellules musculaires (rappelez-vous l'affaire MG53 et la rupture des membranes liée à l'activité phy-

sique). Cette dernière possibilité est exploitée par un article récent (Russell *et al. Science* 341, 1240104, 2013) sur lequel je vais m'attarder un moment avant de revenir à notre propos principal.

À partir du raisonnement selon lequel un tissu mou, comme le cerveau ou le gras, est en général moins soumis à des tensions qu'un tissu dur (les os et dans une moindre mesure les muscles), les auteurs se sont intéressés à la rigidité et l'élasticité des cellules, à leur capacité de répondre à des forces, y compris au niveau de leur noyau. Ce qui les a conduit à s'intéresser aussi aux lamines, non seulement en tant que protéines de structure (ce sont des filaments intermédiaires) mais aussi en tant que régulateurs transcriptionnels. Une simple étude de protéomique (analyse de toutes les protéines d'un tissu) permet de constater que la lamine A est dominante dans les tissus « durs » et que les lamines B le sont dans les tissus mous (**DIA IV.7**).

De façon encore plus étonnante les mêmes cellules expriment des ratios de lamine A:lamines B différents selon que leur environnement est rigide ou mou. Cela est démontré dans cet article pour une cellule de type gliome (U251) implantée dans le cerveau ou dans le flanc (plus de matrice collagénique et de rigidité que dans le cerveau comme on peut l'observer en I sur la **DIA IV.8**). Cela veut dire que l'environnement a un effet sur la transcription des gènes des lamines. Et aussi que la lamine A s'accommode plus facilement d'un environnement exerçant un stress mécanique. Cette réactivité de la lamine A est confirmée (en même temps que cela donne une idée du mécanisme) par la démonstration qu'une phosphorylation entraîne un changement de conformation du domaine globulaire (de type Ig) et surtout que la mutation R453W retrouvée dans certaines formes de dystrophie musculaire s'accompagne d'une stabilité plus faible de ce domaine globulaire quand on augmente la température. Cela se voit bien dans le panneau F de la **DIA IV.8** avec une moindre accessibilité des cystéines et une modification de la fluorescence des tryptophanes (insert). Les effets sont d'autant plus importants qu'ils s'amplifient du fait



que si l'environnement physique modifie les taux de lamine A (et le rapport A:B), la lamine A elle-même a un rôle transcriptionnel. Ce qui va nous ramener à nos affaires de vieillissement.

Il existe un grand nombre de laminopathies conduisant à une pathologie précise ou à un vieillissement prématuré (Atypical Progeria Syndrom) et liées à des mutations ponctuelle dans le gène de la lamine A. Elles sont toutes listées dans la **DIA IV.9** mais je vais passer rapidement pour me concentrer sur la mutation la plus classique, celle qui induit le Hutchinson-Gilford Progeria Syndrom (HGPS), maladie rarissime marquée par un vieillissement prématuré (je ne montre pas d'images) et une mort précoce (avant la fin de la 2^e décade). Cette mutation dans l'exon 11 du gène *LMNA* fait apparaître un site cryptique d'épissage et induit l'élimination de 50 acides aminés dans la région C-terminale (**DIA IV.9**). Le domaine CaaX est maintenu, mais le site de clivage par ZMPSTE24 est perdu et la protéine reste farnésylée de façon permanente ce qui conduit à des défauts de prolifération cellulaire et à une augmentation de lésions de l'ADN. Cette forme courte et farnésylée de la lamine est appelée progerin et son expression conduit à des déformations nucléaires du type de celui illustré sur cette même **DIA IV.9** (formation de « bulles »). En dehors de ces malformations, l'expression de la progerin interfère avec la progression mitotique, induit une ségrégation anormale des chromosomes ainsi qu'une instabilité du génome et finit par un vieillissement prématuré des cellules.

Cette affaire de progerin nous ramène directement au centre de nos préoccupations puisqu'on ne trouve pas la progerin seulement chez les individus porteurs de la mutation, mais aussi chez les individus normaux. Son expression augmente de façon régulière, cela a été vérifié dans les artères coronaires, entre 1 mois (le vieillissement commence tôt) et 97 ans (il peut se finir tard) avec une augmentation d'environ 3.34 % par an (quelle précision !). La progerin s'accumule dans tous les tissus, en fonction de l'âge, et constitue en fait un excellent marqueur biologique du vieillissement humain.

Pour revenir aux phénotypes cellulaires et moléculaires que je viens d'indiquer, les mécanismes en sont mal connus. L'analyse du transcriptome démontre que 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. Ces changements pourraient, à leur tour, expliquer l'incapacité de répondre à un stress, en particulier le stress causé par les lésions de l'ADN.

Cette possibilité est renforcée par l'observation selon laquelle le défaut de DDR (DNA Damage Repair) corrèle avec l'accumulation de progerin ou de la forme farnésylée de façon permanente (par exemple dans la mutation nulle de *Zmpste24*). Le noyau des souris mutantes chez qui la lamine A n'est plus clivée en C-ter, accumule gammaH2AX et présente un pattern anormal de méthylation de H3 et H4, plus une augmentation de HP1 (**DIA IV.10**). Par ailleurs on note une augmentation d'ATM, ATR, p53 et des kinases de checkpoint. Dans les cellules HGPS, le recrutement de 53BP1, Rad50 et rad51 est retardé, ce qui pourrait conduire à une accumulation des cassures de l'ADN non réparé (**DIA IV.11**). Pour anticiper sur un chapitre futur, on notera aussi une augmentation du niveau basal des ROS et une plus grande sensibilité à leurs effets délétères, effets qui peuvent être traités par des éliminateurs de ROS comme la n-acetylcysteine qui réduit de façon significative le nombre de DSB. Pour résumer, on peut dire que l'augmentation des ROS, la modification des histones et un recrutement déficient des enzymes de réparation de l'ADN sont à l'origine du vieillissement causé par l'accumulation de progerin, sans que le mécanisme soit encore identifié dans ses détails.

Pour les cellules en division, la sénescence prématurée peut-être liée au raccourcissement accéléré des télomères et l'induction d'une dysfonction de cette structure ainsi que des lésions de l'ADN. Je rappelle que les télomères, sur lesquels nous nous



attarderons la semaine prochaine, sont des régions de l'ADN qui se raccourcissent à chaque division cellulaire du fait de l'encombrement de la DNA polymérase quand elle arrive en fin de son trajet répliatif (elle ne peut pas réguler la division d'un fragment qu'elle occupe physiquement). Cette situation crée une instabilité et des cassures au niveau des télomères et il est connu que la réparation par le mécanisme NHEJ des télomères dysfonctionnels nécessite les lamines A/C. Curieusement, les lésions des télomères pendant la sénescence répliatif de fibroblastes normaux induit la production de progerin ce qui suggère l'existence d'une synergie entre la structure des télomères et la production de progerin, ce qui pointe vers un phénomène d'amplification de la sénescence.

Les lamines A et C (qui dérivent de l'épissage alternatif d'un même gène *LMNA*), la lamine C étant dépourvue d'une séquence CaaX de farnésylation, sont exprimées de façon contrastée dans le cerveau. Une faible expression de la lamine A constitue la raison probable de ce que les patients HGPS sont préservés des maladies neurodégénératives ou des démences séniles. Plus précisément, dans le cerveau des souris, la lamine C est abondante dans les neurones et les cellules gliales, alors que la lamine A est confinée préférentiellement aux cellules des méninges et endothéliales vasculaires (ce qui n'est pas rien, évidemment quand on considère l'importance physiologique de ces structures). Mais cette absence « en général » ne veut pas dire que la lamine A ne peut pas être exprimée, donc la progerin aussi, dans des situations particulières.

En effet la faible expression de lamine A est la conséquence de la fixation de miR-9 (un micro-RNA) dans le domaine 3'UTR de la pré-lamine, ce qui inhibe sa transcription et sa traduction. De fait l'expression de miR-9 dans des fibroblastes réduit à la fois la transcription et la traduction de la pré-lamine. La **DIA IV.12** décrit l'activité de miR-9. On constate d'abord (en A) que la lamine A est peu exprimée dans le cortex et le cervelet (elle l'est un peu, peut-être dans le système vasculaire ?)

et on constate aussi l'apparition de progerin dans le modèle murin de progeria. En B on suit l'activité répressive de miR-9 (eGFP) sur l'expression de lamine A mais pas de lamine C, point bien résumé en C. On ne peut donc exclure que l'expression de la lamine A soit possible au niveau cérébral en réponse à un stress puisque, comme cela a été discuté d'entrée de jeu, l'expression des lamines est fortement régulée par l'environnement.

Mais comme nous l'avons vu plus haut les lamines B1 et B2 (deux gènes distincts) sont exprimées dans toutes les cellules, à commencer par les cellules du système nerveux. De nombreuses études suggèrent que la perte de lamine B conduit à une sénescence précoce des cellules mais je voudrais laisser cette question pour annoncer (nous y retournerons) celle plus importante et non sans rapport (même du point de vue de la longévité) de l'organisation de la chromatine, en particulier de sa périphérie enrichie en hétérochromatine, et de la régulation de l'expression génétique. Les études de microscopie électronique portant sur la localisation de la lamine B dans des cellules en culture suggèrent un rôle important de cette molécule dans l'organisation de l'hétérochromatine (**DIA IV.12**). D'autres études suggèrent un rôle dans la formation du fuseau mitotique, dans la répliatif de l'ADN, la transcription génétique, la formation des nucléoles ou encore la réponse au stress oxydatif. C'est un point sur lequel je vais revenir, en attendant je vais illustrer une fonction biologie cellulaire de la lamine B en passant un peu de temps sur son rôle dans le développement du cortex

Récemment Coffinier et ses collègues (Coffinier *et al.*, *PNAS* 107: 5076-5081, 2010) on décrit le rôle de la lamine B dans la migration neuronale au cours du développement. Pour s'en tenir à la lamine B2 (le phénotype B1 nul est plus drastique), les auteurs ont inactivé lamine B2 en introduisant un gène *LacZ* dans sa séquence. Les souris se développent normalement avec un phénotype purement cérébral. Elles présentent un cerveau plus petit que la normale (5 à 10 % de réduction) mais surtout une organisation



anormale des couches du cortex (le cervelet est lui aussi petit et mal organisé) et meurent immédiatement après la naissance. Je rappelle que le cortex des mammifères a 6 couches (sauf pour le cortex olfactif à 3 couches) et que les couches les plus externes se développent avant les couches internes ce qui veut que les neurones générés tardivement migrent en passant par dessus les neurones générés plus précocement (développement en « inside out » que je vais illustrer très rapidement). La **DIA IV.13** montre l'expression de lamine B2 chez l'hétérozygote (on peut la suivre avec l'expression de *LacZ*). On constate qu'à E16.5 l'expression est hétérogène, avec une expression forte dans la zone ventriculaire. De A à D, on voit la légère diminution d'épaisseur du cortex, mais surtout un désordre évident dans l'organisation des couches corticales. À E.16,5 et à la naissance (G-I), l'expression est particulièrement importante dans la zone ventriculaire là où les précurseurs neuronaux se divisent avant de migrer de façon radiaire dans le mode inside-out sur lequel j'attirai votre attention il y a un instant (**DIA IV.14**).

Cette désorganisation des couches suggérait un problème de migration des cellules depuis la zone sub-ventriculaire vers les régions corticales. Afin de tester cette hypothèse, les auteurs ont fait des marquages de BrdU (un analogue de la thymidine qui s'incorpore dans l'ADN au cours de la division cellulaire et est reconnu par des anticorps spécifiques) qui permettent de déterminer à quelle date la cellule naît (division des progéniteurs) et où elle se trouve dans le cortex au moment où on fait l'examen de la structure cérébrale. Les souris ont reçu du BrdU à E13.5 ou E15 (le BrdU s'incorpore dans la cellule en division ce qui date sa naissance) et les embryons analysés à E18.5 et E19.5. Plus le marquage est fait tard et plus les cellules se retrouvent normalement dans les couches supérieures du cortex (inside-out). L'examen des cellules marquée au BrU suggère que, contrairement à ce qui se passe normalement, les cellules générées tardivement sont incapables de passer par dessus les cellules générées plus tôt. Il y a aussi une baisse de la prolifération (marquage Ki67 qui identifie toutes les cellules en division à un

moment donné) ce qui indique à la fois un défaut de prolifération à E15.5 et un défaut de migration. Un défaut de migration des cellules des grains et de positionnement des cellules de Purkinje est aussi évident dans le cervelet.

L'interprétation de ce résultat, reposant sur la migration nucléaire, est bien résumée dans la revue de Burke et Stewart (*Nature Reviews MCB* 14: 13-24, 2013) à la lumière de ce qui est connu chez la Drosophile (**DIA IV.15**). En a et b sont illustrés les deux types connus de migration nucléaire. D'une part le mouvement intercinétique nucléaire IKNM (en a) qui se produit au cours de la division, de l'autre (en b) le mouvement nucléaire (Nuclear Kinesis, NK) qui se produit au cours de la migration. IKNM est synchronisé avec le cycle cellulaire et la division correspond au positionnement apical du noyau. Le mouvement du noyau demande une association au cytosquelette et implique des moteurs moléculaires (kinesin et dynein). NK décrit le processus qui permet aux cellules de quitter le neuroépithélium pour accéder au cortex et le construire. On voit d'abord un prolongement qui se forme à l'avant de la cellule puis une migration du centre organisateur des microtubules (MTOC) qui est « rattrapé » par le noyau et la cellule qui l'entoure. Dans les deux cas, division et migration, le mouvement du noyau et son rapport au cytosquelette et au MTOC jouent un rôle important. Ce qui est connu chez la drosophile concernant le mouvement nucléaire au cours de la formation de l'œil permet de comprendre le rôle possiblement joué par les lamines, ici les lamines B. La migration nucléaire requiert Klarsicht, une protéine de la membrane externe du noyau qui interagit avec le cytosquelette via le moteur moléculaire dynein et avec la lamina nucléaire (composée de lamines) via la protéine SUN. Des orthologues de SUN et de KASH existent chez les mammifères et les mutants de SUN (SUN 1 ou 2) ont un phénotype très proche de celui des souris lamine B2 *-/-* que nous venons de décrire. En conclusion, prolifération et migration demandent une liaison au cytosquelette perdue ou amoindrie chez les mutants dépourvus de lamine B2.



Pour passer du développement à la sénescence et revenir à la question importante de la réparation de l'ADN, il a été remarqué que des fibroblastes de malades atteints de ataxia télangiectasia (AT) et dont la sénescence prématurée est couplée à un défaut de la DDR, expriment des niveaux très élevés (3 fois plus que la normale) de lamine B1. ATM, l'enzyme mutée dans AT, en plus de sa fonction de kinase, se trouve être un « senseur » des ROS qui sont, eux aussi, très élevés dans AT. Il a donc été suggéré que l'augmentation de lamine B1 est une conséquence de ce taux élevé de ROS et que la sénescence des cellules est elle-même une conséquence de cette augmentation de lamine B1 (**DIA IV.15**). Comme on peut le constater dans cette dernière **DIA IV.15**, l'affaire est diamétralement opposée dans les cellules normales, puisque la sénescence est associée à la perte de lamine B1. Dans les deux situations cependant, il est acquis que les ROS augmentent la synthèse de lamine B1.

Ce dernier point va nous amener à considérer deux ou trois articles qui tournent autour du stress oxydatif et de la structure de la chromatine. Le premier est une mini revue de Sieprath et collègues (*BBRC* 421: 635-639, 2012) portant sur les lamines comme médiatrices du stress oxydatif. Les auteurs rappellent que les lamines, par-delà leur fonction structurelle, jouent un rôle dans la régulation de l'expression génétique, la transduction du signal, le contrôle du cycle cellulaire et la réparation de l'ADN. Les mutations affectant ces protéines, la lamine A tout particulièrement, conduisent à une grande variété de maladies rangées sous le terme de laminopathies, nous en avons rencontré certaines sur notre route. Malgré leur diversité, les laminopathies partagent des traits communs dont une déformation du noyau, une désorganisation de l'hétérochromatine et des défauts de la DDR.

Les ROS (reactive oxygen species) sont de petites molécules à vie courte qui régulent un grand nombre de réponses cellulaires, incluant la division, la différenciation, l'expression génétique, ou la migration des cellules. Elles ont donc un rôle

physiologique. Par delà ces fonctions normales de signalisation sur lesquelles je reviendrai amplement, un excès de ROS est toxique menant en particulier à des lésions de l'ADN et à l'oxydation irréversible de protéines. La source majoritaire des ROS est la mitochondrie et les NADPH oxydases (NOX). Les mitochondries produisent les ROS comme sous produits de la phosphorylation oxydative (synthèse d'ATP) et les NADPH oxydases catalysent directement la formation de O_2^- (**DIA IV.16**). Les cellules répondent au stress oxydatif par une modification de l'expression génétique. Les ROS altèrent l'expression génétique à travers des mécanismes génétiques et épigénétiques. Pour l'épigénétique, il s'agit essentiellement, de modification de la méthylation des CpG. Pour la part génétique, il existe un grand nombre de facteurs de transcription qui sont sensibles à l'état redox des cellules, dont Rb, p53, FoxO and NFkB. L'oxydation de résidus spécifiques se produisant au niveau du cytoplasme entraîne l'import nucléaire, une réduction dans le noyau (thioredoxin 1 ou redox factor 1) est nécessaire à l'activité transcriptionnelle.

Il existe de nombreuses indications d'un lien entre une lamina dysfonctionnelle et une modification pathologique des mécanismes redox (**DIA IV.16**), mais les voies impliquées sont mal connues. Une vue très simplifiée des possibles mécanismes est donnée dans la **DIA IV.17**. Une lamina dysfonctionnelle peut être la conséquence de mutations dans les lamines ou dans leurs gènes de maturation (dysfonction innée) ou résulter d'un traitement par des drogues, par exemple les inhibiteurs de protéases comme les HIV-IP (dysfonctions acquises de la lamina). On peut voir dans la **DIA IV.17** que les lamines peuvent agir comme des tampons contre les ROS. Il reste que trop de ROS peuvent conduire à une lésion irréversible des lamines et à une lamina dysfonctionnelle. Cette dysfonction peut avoir de fortes conséquences sur le LINC complexe et la connexion mécanique entre le noyau et le cytoplasme avec les conséquences sur la signalisation nucléocytoplasmique, la division cellulaire et la migration (**DIA IV.15**). À l'intérieur même du noyau ces oxydations conduisent



à une modification pathologique de l'expression génétique, à une déplétion de l'hétérochromatine et une morphologie nucléaire pathologique (comme dans la progeria). Bien entendu, la modification de l'hétérochromatine induit des modifications transcriptionnelles délétères et des perturbations la DDR.

Du côté cytoplasmique, des changements peuvent se produire dans la concentration des boucliers anti-ROS (de nombreux enzymes très présents autour du noyau et le protégeant contre les ROS). Ces protéines et enzymes sont assemblées autour du noyau grâce à un échafaudage de Nesprin (**DIA IV.15**), protéines géantes qui lient directement le cytosquelette d'actine à la lamina (via LINC). Les lamines A/C sont nécessaires à la bonne localisation des Nesprin et leur mutation peut donc conduire à une perturbation de ce bouclier antioxydant. On voit aussi sur le schéma de la **DIA IV.17** que l'oxydation des lamines peut conduire à une véritable rupture de la membrane nucléaire. Cette rupture ouvre à des échanges peu orthodoxes entre cytoplasme et noyau avec des localisations anormales de petites molécules ou de protéines, mais aussi de complexes multiprotéiques importants comme les corps PML (pour corps promyelocytic leukemia, ce sont des corps nucléaires générés par la polymérisation de PML en réponse à un stress oxydatif) ou même les mitochondries, lesquelles peuvent se retrouver dans le noyau ce qui ne peut qu'augmenter les oxydations pathologiques de ses composants.

Je voudrais poursuivre cette partie sur les lamines en décrivant un article qui traite du paysage chromatinien (Shah *et al. Genes & Dev.* 27: 1787-1799, 2013) et du rôle de la lamine B1 dans ses modifications. Les auteurs démarrent sur la sénescence cellulaire (sur le modèle de cellules en prolifération, ce qui diffère un peu des cellules post-mitotiques, mais avec des recouvrements suffisamment importants pour justifier que nous nous arrêtons sur cet article). Un des caractères des cellules sénescents (au-delà de l'attrition des télomères et de l'activation des oncogènes) est l'augmentation de l'expression des gènes de défense cellulaire et de

la réponse inflammatoire, encodant des protéines souvent secrétées et qui font partie du *senescence associated secretory phenotype* (SASP). Je remets la DIA de début de cours (**DIA IV.18**) pour que vous puissiez reprendre un peu de hauteur et voir que nous parlons ici d'un problème de communication entre les cellules. Le SASP, sur lequel nous reviendrons, est utile pour l'élimination des cellules sénescents, pré-tumorales en particulier. Il facilite la suppression des tumeurs, mais s'il s'installe de façon chronique, induit le vieillissement tissulaire.

Des études récentes ont décrit des modifications de la chromatine pendant la sénescence avec l'apparition de régions anormales de chromatine condensée (des foci d'hétérochromatine liés à la sénescence (SAHFs) ou au contraire des pertes de répression chromatinienne. Il n'est donc pas surprenant que la longévité soit associée à des altérations de modifications post-traductionnelles des histones. Chez la souris, par exemple, la sirtuin SIRT6 régule la longévité (la sénescence aussi) via la déacétylation de la lysine en position 9 de l'histone 3 (H3K9ac). Si on passe à *C. elegans*, on sait que l'augmentation de la répression par perte de H3K4me3 et gain de H3K27me3 (médiée par Trithorax) augmente la longévité de façon « héréditaire ». Bref, la structure de la chromatine joue un rôle dans la longévité. Je vous épargne pour aujourd'hui les travaux sur la levure.

Tous ces travaux mettent en évidence une relation entre la régulation de la chromatine et le vieillissement cellulaire mais suggère aussi une modification plus large qui pourrait atteindre presque l'entièreté du génome. L'article de Shah et collègues s'appuie sur la sénescence répllicative – donc associée à un raccourcissement des télomères – de fibroblastes de poumon humain en culture. Pour suivre les changements de la chromatine au cours de la sénescence les auteurs ont immunoprécipité la chromatine et identifié les régions associées à H3K4me3 (activation de la transcription et trithorax) ou H3K27me3 (inhibition de la transcription et polycomb). À la suite d'analyses dans le détail desquelles je ne peux pas entrer, les auteurs ont défini



des régions « mesas » (enrichies) et « canyons » (appauvries) en H3K27me3 et H3K4me3 (en prenant H3 total comme référence).

Cela a conduit à la définition de trois domaines de changements majeurs au cours de la sénescence, des K4me3 mesas, des K27me3 mesas et des K27me3 canyons. Les deux mesas sont souvent associés et les canyons occupent des régions différentes du génome. La **DIA IV.19** dans sa partie haute montre pour le chromosome 1, les changements qui s'opèrent entre prolifération et sénescence avec des régions où on voit que K27me3 ne bouge pas (K27me3 Mesas en bleu) et où K4me3 augmente (en vert) ce qui indique probablement une augmentation de la transcription dans ces régions et des régions (en rouge) où K27me3 diminue (canyons) ce qui indique aussi une augmentation la transcription par baisse de la répression. À droite est représenté le recouvrement partiel des Mesas et l'isolement des Canyons. En bas une analyse proche est menée sur le chromosome 9 mais avec la recherche de corrélation avec les domaines enrichis en lamine (LAD). D'une façon générale on observe une corrélation entre les K27me3 Mesas et l'expression de lamine B1 et, à l'inverse, des canyons de K27me3 dans les régions déplétées en lamine. Cela suggère que la perte de lamine induit une augmentation de la transcription (perte de la répression) au niveau ces canyons. Cela se voit bien si on identifie la position des enhanceurs et des gènes. La **DIA IV.20** montre ce qui se passe au cours de la sénescence pour le cluster des métalloprotéases (chromosome 11) avec une basse quasiment globale des niveaux de K27me3.

Je passe sur de longs développements à la fois sur des cellules cancéreuses et des cellules de patients atteints de progeria (mutation dans la lamine A, comme on s'en souvient sans doute) pour terminer sur la lamine B1. La **DIA IV.21** vous illustre d'abord que l'expression de lamine B1 est effectivement fortement réprimée au cours de la sénescence, au point d'être quasiment indétectable (A) alors que les lamines A et C ne changent pas (ce n'est pas sur la

DIA). Les auteurs ont aussi observé une baisse des niveaux d'expression d'autres protéines interagissant avec les lamines ou participant à l'organisation de la chromatine. C'est le cas d'un composant de la cohesin (SA1) (séparation des chromatides sœurs au cours de la division) de l'élément CTCF (une protéine à doigt de zinc jouant un rôle dans l'organisation globale de la chromatine) et de la lamin-associated deacetylase (Lap2). La suite logique était de provoquer une perte de fonction (stratégie shRNA) et de suivre (en D) la cessation rapide de la division cellulaire avec entrée en sénescence (augmentation de p16 et de β -galactosidase) mais sans apoptose (Annexin). En fait la perte de lamine B1 a exactement le même effet que celle de EZH2, la H3K27me3 méthylase, ce qui une fois encore lie la sénescence avec une dérégulation transcriptionnelle. Ce qui amène à vous présenter les panneaux I à K, dans lesquels vous constaterez sur trois chromosomes que la perte de lamine B1 augmente les Mesas H3K4me3 (augmentation de la transcription) et aussi mais plus légèrement les mesas H3K27me3 et diminue fortement les Canyons H3K27me3 (augmentation de la transcription).

Ce qu'il faut conclure de cette étude est que la sénescence cellulaire s'accompagne d'une profonde réorganisation de l'épigénome humain et que cette réorganisation est étroitement associée à des altérations des domaines associés aux lamines. Les dernières expériences sur la perte de fonction de lamine B1 (normale au cours de la sénescence ou induite par shRNA) le démontrent très clairement. Les conséquences fonctionnelles de ces changements de l'épigénome sont mal connues mais on peut certainement dire que la sénescence s'accompagne d'une forme d'ouverture de domaines chromatiniques et de la transcription illégitime de gènes normalement réprimés.

Pour finir avec ces histoires de lamines, j'aimerais vous décrire une série d'expériences qui ouvre sur un autre aspect de leurs fonctions, en rapport avec la signalisation cellulaire. Il s'agit du travail de Hernandez *et al.* (*Dev. Cell* 19: 413-425, 2010). Cet article repart de la lamine A et de la progeria sur



lesquelles nous ne reviendrons pas. Les auteurs utilisent une souris mutée porteuse de la délétion $\Delta 9$ (exon 9 délété) ce qui conduit à une protéine ayant les mêmes propriétés que la protéine mutée chez les humains. Les souris $\Delta 9$ semblent normales à la naissance mais montre un retard de croissance dès la première semaine postnatale. Comparant la prolifération et l'entrée en sénescence de fibroblastes embryonnaires ou prélevés chez des souris deux à trois semaines après leur naissance, il semble clair que ceux-ci (et non ceux-là) montrent une sénescence et mort accélérées en comparaison des WT (**DIA IV.22**). L'explication la plus simple étant celle de l'instabilité génomique les auteurs ont recherché des signes de ce phénotype (en particulier les cassures de l'ADN au niveau de télomères) mais n'en ont trouvé que très peu. Des analyses d'expression génétique ont en fait suggéré que les gènes dont l'expression est la plus modifiée dans les tissus adultes codent pour des protéines de la matrice extracellulaire (ECM) (**DIA IV.22**).

La plupart des gènes ECM dont l'expression est diminuée sont des composants du squelette cartilagineux et osseux avec des conséquences que j'illustre (**DIA IV.23**) mais sur lesquelles je passe rapidement quant au volume osseux et la dureté de l'os (mesurés sur le tibia et le fémur). En accord avec le fait que les patients atteints de progeria meurent souvent d'un problème cardio-vasculaire (crise cardiaque, ischémie), les auteurs ont aussi constaté un amincissement de la couche musculaire lisse des artères pulmonaires chez les animaux mutants (deux semaines après la naissance) et un grand nombre de cellules en apoptose dans cette couche (**DIA IV.23**). D'où l'idée de vérifier si la problème de l'arrêt de division cellulaire chez les fibroblastes post-nataux était induit par la perte d'ECM et donc de faire pousser ces cellules sur de l'ECM de fibroblastes WT avec le résultat important d'un sauvetage du phénotype (**DIA IV.23**).

Pour aller vite sur cette histoire, je vous passe toutes les étapes intermédiaires du raisonnement et de la démonstration mais le résultat est que la muta-

tion de la lamine A interfère avec la signalisation par Wnt. Je rappelle en **DIA IV.24** la voie canonique de signalisation par Wnt. En absence de Wnt, la β -catenin est phosphorylée par GSK3- ce qui entraîne son ubiquitination et sa dégradation par le protéosome. En présence de Wnt le complexe Axin-GSK3 est recruté via Disheveled (Dvl) au niveau des récepteurs Frizzled et LPR5/6 et la β -catenin passe dans le noyau où son association avec LEF-1 (alias TCF) permet la transcription des gènes qui répondent à l'activation de la voie Wnt. Si je reviens maintenant au papier sur la mutation de la lamine les auteurs ont conclu à une interférence avec cette voie. Parmi les expériences toutes convaincantes, je conserve la baisse de LEF-1 dans le noyau des mutants et des fibroblastes de patients atteints de progeria et la restauration d'une division normale (dans les deux types de cellules) par l'addition d'un inhibiteur de GSK3 qui bloque la dégradation de la β -catenin (**DIA IV.25**).

La conclusion générale de ce cours est que le vieillissement cellulaire est pour une part importante lié à des changements de la structure de la chromatine avec l'expression illégitime de gènes, probablement nombreux, qui participent au vieillissement. Parmi ces gènes, nous pensons que les éléments transposables sont à mettre au premier plan et que de nombreuses cassures ultérieures de l'ADN résultent de cette dérégulation. Mais ce que la fin du cours suggère aussi est que le processus engage plus que le noyau pour toucher l'ensemble de la cellule et surtout les cellules avoisinantes via la modification des voies de signalisation et l'homéostasie du milieu intercellulaire. ■