



7 octobre 2013

Les différents acteurs de la longévité

Je partirai, pour planter le décor des cours de cette année, d'une revue très complète de Lopez-Otin et ses collègues (*Cell* 153: 1194-1217, 2013) qui tâche de définir les marques du vieillissement, face moins souriante de la longévité, non pas seulement cérébrale, mais générale. La longévité est une question importante qui ne peut se penser en terme de dégradation plus ou moins rapide des organismes à partir d'un âge arbitrairement proclamé « âge idéal ». On doit au contraire se replacer dans la problématique souvent énoncée dans les années passées d'une instabilité des structures vivantes et d'un renouvellement permanent des organismes qui s'opère aux niveaux moléculaire et cellulaire. À quoi il faut ajouter une évolution des individus modifiés épigénétiquement, dans la structure de leur chromatine, celle aussi de leurs réseaux de neurones, au niveau synaptique et morphologique. Cette distinction entre vieillissement et adaptation par individuation, cette nécessité d'identifier cette part d'adaptation incluse dans le vieillissement est importante puisqu'elle trace la distinction entre les organismes qui ont une histoire et une mémoire et ceux qui vivent dans l'immédiateté de l'instant présent.

Évidemment la distinction n'est jamais aussi tranchée et on trouve de l'épigénétique et de l'adaptation individuelle dans tous les organismes, même les plus simples, comme *C. elegans* et ses quelque 300 neurones. Dans cette approche de la longévité qui repose sur la compréhension du renouvellement et/ou de l'évolution des structures, nous sommes obligés de distinguer, parmi les organes, ceux qui sont l'objet d'un renouvellement cellulaire continu, comme l'intestin, la peau ou le système hématopoïétiques et ceux qui sont seulement 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 autres types cellulaires (astrocytes, oligodendrocytes, macrophages, cellules endothéliales vasculaires) qui feront l'objet d'un ou deux cours dans les années pro-

chaines. Nous voyons que nous allons retrouver dans notre approche de la longévité cérébrale nombre de thèmes déjà abordés dans les années précédentes. Je me permettrais d'y revenir si nécessaire, même si nous allons aborder ensemble des questions nouvelles.

Dans l'article auquel je faisais allusion, Lopez-Otin et ses collègues définissent le vieillissement, sous l'angle du déclin fonctionnel qui touche tous les organismes vivants. Cet article commence par une observation que nous pourrions prendre à notre compte au cours des jours qui viennent et concerne le lien entre cancer et vieillissement du point de vue de l'accumulation de lésions au niveau génétique, cellulaire et organique ; accumulation qui ne transforme la physiologie en pathologie (pour les aspects pathologiques du vieillissement) qu'à partir d'un certain seuil. Et comme il s'agit de physiologie, d'homéostasie donc, on doit considérer que toute intervention sur ces processus entraîne nécessairement une réaction, une régulation. En effet, l'homéostasie doit se définir comme un système de régulations qui maintiennent les variations des éléments d'un ensemble physiologique dans des limites compatibles avec la normalité (la santé donc).

Reprenant une démarche utilisée en cancérologie, les auteurs se sont efforcés de repérer une série d'événements cellulaires et moléculaires qui sont des marqueurs du vieillissement. Ils se sont concentrés sur 9 marqueurs qui vont nous être très utiles pour structurer le cours de cette année, et sans doute de l'année prochaine tant le sujet est vaste. Leur identification repose sur l'établissement de trois critères principaux :

- 1) le marqueur doit se manifester pendant le vieillissement normal ;
- 2) son aggravation doit accélérer le vieillissement ;
- 3) son amélioration expérimentale, quand elle est possible, doit retarder le vieillissement normal et augmenter ce que les anglo-saxons appelle *healthy lifespan* ou « durée de vie en bonne santé ». Si je voulais ici définir la longévité je dirais que c'est un vieillissement normal augmentant la durée de vie en bonne santé.



Sur cette base, les auteurs ont identifié 9 marqueurs qui répondent plus ou moins à leurs critères et qui, pour être distincts, ne sont pas indépendants (**DIA I.2**). Ces marqueurs sont :

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

Je vais revenir sur chaque point et, au cours de ce déroulement, donnerai des explications plus approfondies sur tel ou tel aspect concernant plus particulièrement le système nerveux (mais nous en sortirons nécessairement parce que le cerveau n'est pas un organe isolé et aussi parce que nombre de modèles utiles ont été développés à partir de systèmes distincts du système cérébral, en particulier le système hématopoïétique). Par ailleurs, la levure a été très utilisée et nous serons parfois obligés de nous intéresser à cet organisme sans cerveau.

D'ores et déjà, j'attire votre attention sur le fait que deux marqueurs ne s'adressent qu'aux cellules en division : le raccourcissement des télomères et l'épuisement des cellules souches. Ces deux marqueurs ne sont pas indépendants et, pour ce qui est du cerveau, ne concernent que les cellules souches neurales, celles de la zone sous-ventriculaire (SVZ) et du gyrus denté (DG), puisque nous avons décidé cette année de ne pas nous intéresser aux éléments non neuraux dont je rappelle quand même qu'ils constituent 90 % des éléments cellulaires cérébraux. La **DIA I.3** rappelle que nous avons de la neurogenèse adulte qui repose sur la prolifération de cellules souches, tout à fait comme dans le système hématopoïétique. Pour les télomères, j'y reviendrai, mais qu'on sache qu'il s'agit d'une région chromosomique dont l'ADN raccourcit à chaque division cellulaire du fait que la DNA-polymérase ne peut

aller plus loin que le télomère. Le raccourcissement des télomères est donc un marqueur du nombre de divisions qui ont précédé et de ce fait un marqueur du temps. Au-delà d'un certain point, la cellule entre en sénescence. Ce qui veut dire que, sauf intervention d'une télomérase qui maintient la taille des télomères, les cellules ne peuvent se diviser qu'un certain nombre de fois, puis soit entrer en sénescence et en apoptose, soit devenir immortelles, ce qui n'est pas bon.

Un autre point essentiel est que chaque marqueur a sa contrepartie, ou presque. Par exemple l'instabilité génomique (dont je ne donne pas une définition mais comprend les lésions, mutations et modifications de l'ADN) appelle la réparation de l'ADN ou le verrouillage de l'instabilité. En même temps les interactions entre les 9 chapitres proposés par Lopez-Otin et ses collègues sont nombreuses. Par exemple, le verrouillage de l'instabilité appelle des opérations épigénétiques (méthylation de l'ADN ou modifications des histones (niveau de méthylation, d'acétylation ou de phosphorylation, ubiquitination aussi), etc. (**DIA I.4**). Ou encore, le raccourcissement des télomères induit des phénomènes de cassure de l'ADN double brin (forme d'instabilité génétique) et participe à l'épuisement des cellules souches. Ces interactions peuvent être déclinées presque à l'infini et, même si je suis amené à segmenter les choses, il faut comprendre que nous sommes dans un système très interactif ce qui peut avoir des effets bénéfiques tant que ces interactions sont régulatrices et maintiennent le système général dans les bornes de la physiologie normale, mais peut avoir des effets pathologiques dès lors que cette régulation ne se fait plus correctement.

La longévité, c'est donc la physiologie et les pathologies du vieillissement, ou pathologie de cette longévité, ne peuvent se comprendre qu'à partir de la physiologie. Vous retrouvez là une ancienne bernardienne à laquelle vous devez être habitués désormais et j'espère que vous avez profité du bicentenaire de la naissance du physiologiste et des nombreuses célébrations qui l'ont accompagné



pour peaufiner vos connaissances sur le premier titulaire de la Chaire de Médecine expérimentale au Collège de France. Enfin il n'aura échappé à personne que les 9 marqueurs (**DIA I.2**) pourraient être divisés en marqueurs génétiques et épigénétiques (de 1 à 3), métaboliques (de 4 à 6) et intégrés (de 7 à 9) et que nous avons là une forme d'emboîtement des niveaux d'intégration. Les trois premiers sont négatifs et pour une part irréversibles. C'est clair en tout cas pour les lésions dues à l'instabilité génétique, mais moins pour les télomères et les modifications épigénétiques. Les trois suivants sont ambigus car possiblement positifs à petite dose. Les trois derniers sont systémiques. Pour m'attarder un moment sur la physiologie, je voudrais introduire ici le principe d'une altération des structures biologiques liée à leur utilisation dans un domaine qui n'est pas le système nerveux, pour l'instant, mais le système musculaire.

Ceux qui ont assisté au cours du 19 octobre 2009 se souviennent sans doute de la cassure des membranes musculaires liée à l'activité physique et au rôle de la protéine MG53 dans la réparation des membranes. Je rappelle que Cai et ses collaborateurs (Cai *et al.*, *Nature Cell Biology* 11: 56-64, 2009) ont identifié une protéine de 53KDa (MG53) purifiée à partir du muscle de lapin (**DIA I.5**). Cette protéine conservée chez *sapiens* inclut un certain nombre de domaines qui permettent de la classer dans la famille des protéines TRIM (en haut), et possède plusieurs cystéines qui peuvent s'engager dans la formation de ponts disulfures. Elle est essentiellement exprimée dans les tissus musculaire, cardiaque et squelettique. En bas sont indiqués deux mécanismes de réparation possible des membranes, avec à droite celui qui nous intéresse ici, c'est-à-dire l'insertion de vésicules qui viennent colmater la brèche.

L'invalidation du gène chez la souris démontre que les souris MG53 *-/-* survivent jusqu'à 11 mois dans des conditions n'incluant pas de stress musculaire puis développent une myopathie dont la gravité augmente avec l'âge. La **DIA I.6** illustre la dégrada-

tion de la structure musculaire avec l'apparition de noyaux centraux et la diminution du diamètres des fibres. Si ces souris sont soumises à des cycles répétés d'un exercice physique intense, comme courir dans une descente pendant 30 minutes, elles font aussi bien que les WT au départ, mais deviennent progressivement moins performantes. En fait, elles ne peuvent supporter longtemps une course à la vitesse de 20 mètres par minute (1,2 km/heure). Cette incapacité est due à une altération de la membrane musculaire comme le montre l'injection de bleu Evans au niveau du muscle Tibialis anterior (**DIA I.6**).

Cette perméabilité est associée à une perte de réparation (c'est le point important dans le contexte du cours de cette année), comme cela peut être testé par induction d'une lésion par rayon laser (internalisation du marqueur fluorescent FM1-43). C'est le cas *in vivo*, mais aussi *in vitro* avec des lésions laser ou mécaniques (pipettes) (**DIA I.7**). Si on suit l'expression de MG53, on observe que la protéine s'accumule au niveau de la lésion (MG53-GFP) en moins d'une minute. MG53 est associée à des vésicules (**DIA I.8**). Après un effort physique, les vésicules s'accumulent à la surface du muscle chez la souris WT mais pas chez la mutante (microscopie électronique **DIA I.8**).

MG53 a une forte tendance à former des multimères du fait de la formation de ponts disulfures entre cystéines. La cystéine en position 242 (C242), parce qu'elle semblait bien placée pour jouer un rôle dans la formation de multimères, a été mutée en alanine (C242A), ce qui empêche la formation d'un pont disulfure. Malgré son adressage au site de lésion (**DIA I.9**), la protéine mutée ne permet plus la réparation. Une analyse de la séquence laissait aussi possible une interaction avec des phospholipides. Bref, il fut assez rapidement compris que MG53 se lie à des phospholipides chargés négativement et se co-localise avec l'annexine-V, une protéine dont c'est la fonction de reconnaître ces phospholipides chargés négativement (**DIA I.10**).



L'ensemble de ces données a conduit au modèle suivant (**DIA I.10**). À la suite d'une lésion, le calcium qui pénètre dans la cellule induit le transport de cette classe de vésicules probablement d'origine endosomale, vers la surface de la cellule (rôle des kinésines et des microtubules). Pour avoir accès à la surface, il faut aussi que l'actine corticale soit dégradée, ce qui résulte selon certains travaux de la digestion de l'actine par une protéase, la calpaïne, induite par le calcium. Finalement MG53 est lié aux vésicules par sa fonction « annexine » et dimérise avec les autres molécules. Tout se termine par une fusion des vésicules et à la réparation de la membrane.

Si j'ai fait ce rappel qui illustre la question de la réparation comme un processus physiologique permanent, c'est parce qu'à la fin de ce développement, en 2009, j'avais avancé la possibilité d'une forme de généralisation du phénomène, en particulier au niveau cérébral. Par provocation, j'avais suggéré qu'une trop grande activité cérébrale pourrait créer des lésions et que le vieillissement des mécanismes de réparation augmenterait la probabilité d'une neurodégénérescence (histoire de vous inquiéter, j'avais avancé : « Vous pensez trop et ça fait des trous ! »). Un article récent (Superbielle *et al.*, *Nature Neuroscience* 16: 613-621, 2013) et le News and Views qui l'accompagne (Herrup *et al.*, *Nature Neuroscience* 16: 518-519) me permettent de revenir aujourd'hui sur cette possibilité avec des arguments plus sérieux.

Dans leur introduction, les auteurs rappellent que les lésions de l'ADN neuronal pourraient contribuer au vieillissement cognitif et au développement de pathologies, telle la maladie d'Alzheimer. Rappelons ici que certains neurones nés avec nous mourront avec nous, bref qu'ils ont notre âge et que leur ADN a subi de nombreuses lésions qui, pour nombre d'entre elles ont été réparées. Mais cette réparation se fait plus ou moins bien à cause du mécanisme impliqué – le raboutage des brins non homologues (NHEJ) – qui introduit presque nécessairement des erreurs, donc des mutations,

nous aborderons ce point dès aujourd'hui. On sait que le vieillissement s'accompagne d'une augmentation du nombre de cassures ou, en tout cas, des marqueurs qui indiquent la présence de cassures, dont l'histone H2A phosphorylée sur la Sérine 139 (gH2AX). Nous avons introduit les histones il y a un instant et je rappelle qu'il s'agit d'une classe de protéines associées à l'ADN, donc des constituants de la chromatine définie comme l'ADN plus les protéines qui lui sont associées. gH2AX a un rôle dans le recrutement des systèmes de réparation des cassures double brin, mais aussi, et il ne faut pas l'oublier, des fonctions épigénétiques qui influent sur la structure de la chromatine et donc modifient l'expression génétique. Il reste qu'il est très majoritairement admis que les spots de gH2AX au niveau de la chromatine indiquent la présence d'une coupure double brin (DSB).

Partant de ce constat, les auteurs ont donné aux souris la possibilité d'explorer un nouvel environnement ce qui provoque une forte activité générale du cerveau chez ces animaux. Il s'agit donc d'un comportement naturel, doublé par des expériences plus spécifiques comme la stimulation visuelle chez la souris anesthésiée ou une activation photogénétique des neurones *æædu striatum* chez la souris éveillée. J'expliquerai dans un instant cette façon de modifier les équilibres ioniques en stimulant des canaux sensibles à la lumière introduits génétiquement ou à l'aide d'un virus. Tous ces protocoles augmentent les DSB dans des régions spécifiques du cerveau ce qui peut être suivi par la présence de spots gH2AX. Les mêmes auteurs se sont intéressés à la régulation de la formation de ces DSB dans un contexte de modèle de maladie d'Alzheimer. À cette fin, ils ont utilisé la souris transgénique J20 exprimant le gène muté humain hAPP (the Swedish 670/671_{KM->NL} and Indiana (717_{V->F} hAPP mutations) (**DIA I.11**) et présentant de nombreux traits de la maladie (plaques, inflammation, déficit cognitif...).

Sur cette diapositive, on voit l'essentiel de ce qu'on doit connaître des propriétés de cette protéine dite BAPP dont les mutations peuvent amener à



des formes génétiques de la maladies d'Alzheimer. Il s'agit d'une protéine transmembranaires qui est normalement clivée en position alpha. Ce clivage libère une forme dite soluble (sAPP) qui a une action trophique sur de nombreux types cellulaires. Nous avons en particulier montré en 2004 que cette forme soluble stimule la prolifération des cellules souches neurales dans la zone subventriculaire (**DIA I.12**). On constate que les cellules de la zone subventriculaire fixe le sAPP, à la fois celles qui se divisent (EGF-R) et celles qui se divisent et migrent (PSA-NCAM) et surtout que le sAPP stimule la prolifération de ces cellules *in vivo*. Pour en revenir à la **DIA I.11**, le clivage en alpha est incompatible avec le clivage en bêta et gamma qui conduit à la formation du peptide amyloïde β A4, composante principale des plaques séniles qui sont un marqueur de la maladie. Ce clivage préférentiel et délétère en bêta et gamma est favorisé par un certain nombre de mutations indiquées sur la **DIA I.11**. La souris J20 porte, je viens de le rappeler, les mutations suédoise et indienne.

Dans un premier temps, les auteurs ont suivi la présence de gH2AX dans différentes régions cérébrales des souris WT et J20 et montré chez des souris de 6 mois, donc 3 mois avant l'apparition des plaques, une augmentation importante (x 2 à 3) du nombre de foci gH2AX chez le souris J20 (cortex pariétal, cortex entorhinal, hippocampe). L'addition de β A4 sur les cultures a le même effet avec co-localisation de 53BP1 ce qui suggère un mécanisme de réparation de type NHEJ (**DIA I.13**). Au cours de leurs expériences, les auteurs ont observé que l'exploration d'un nouvel environnement augmente le nombre de neurones avec des foci gH2AX. Ce comportement s'accompagne aussi de l'expression de Arc, un gène qui est transcrit quand l'activité neurale est fortement stimulée (*Immediate Early Gene*). Ce qui est amusant (et surprenant) est que cette augmentation se produit aussi chez les souris WT, en particulier dans le gyrus denté, avec retour à la normale 24 heures plus tard. Chez les J20, la base de départ est plus élevée et l'augmentation plus faible mais le retour à la normale ne se fait pas, ou mal (**DIA I.14**).

Parce que le concept était un peu dérangent (contraire à cette idée physicaliste d'une intégrité qui se dégrade progressivement si peu en accord avec la réalité physiologique d'un système en remaniement permanent), il fallait vérifier que l'augmentation de gH2AX correspondait bien à des DSB. Après tout, l'histone modifiée pourrait avoir d'autres fonctions, dont des fonctions de régulation de la transcription via une modification de la structure de la chromatine. D'où l'utilisation de p53BP1, un autre marqueur de DSB et l'observation de 85 % de double marquage entre gH2AX et 53BP1. D'où aussi le test de la comète qui consiste à placer des noyaux dans un champ électrique et à suivre les fragments d'ADN qui s'échappent de l'enveloppe nucléaire et font des traînées (queues de comète). Ce test confirme la présence de cassures dans des noyaux de souris J20 ou de souris WT exposée à un nouvel environnement (**DIA I.14**).

Enfin parmi les nombreuses expériences de ce papier dont je recommande la lecture, je vous donne celles qui démontrent que l'activité biologique (vision ou comportement moteur) induit des foci gH2AX. Dans la **DIA I.15**, nous avons une souris sauvage dont l'œil droit est mis en présence d'une cible alors que l'œil gauche se repose, ce qui induit une forte augmentation de foci gH2AX dans le cortex visuel gauche, en corrélation avec l'expression de c-fos, un autre gène qui – comme Arc – signe une activité physiologique forte. Mais rien de tel dans le système somato-sensoriel (whisker) ce qui démontre la spécificité du phénomène. Dans la partie basse de la même **DIA I.15**, on constate que la stimulation par illumination dans la voie motrice nigro-striée d'un canal sensible à la lumière et cloné à partir d'une algue verte induit une rotation du côté stimulé et une augmentation considérable du nombre de foci gH2AX. Conclusion, on pense que ça fait des trous dans l'ADN.

Je passe à la discussion du papier par Karl Herrup et ses collègues (**DIA I.16**). Ces auteurs remettent l'affaire dans son contexte en rappelant que les DSB sont les lésions les plus sévères du



génomique et qu'elles sont produites lors du collapse de la fourche de réplication des cellules en division ou, directement, par des radiations ionisantes ou des drogues radiomimétiques. Aussi par l'expression de rétrotransposons (Gasior *et al.*, *J. Mol. Biol.* 357: 1383-1393, 2006), ce qui a un certain intérêt pour la physiopathologie du système nerveux, nous y reviendrons si le temps nous le permet mais je renvoie aussi aux cours des deux années précédentes sur les éléments mobiles du génome. Comme les auteurs le soulignent, ce qui est surprenant dans le travail présenté est que des comportements aussi naturels que l'exploration d'un nouvel environnement induisent des DSB.

Comment est-ce possible ? Une hypothèse avancée par les auteurs 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. Les résultats avec 53BP1 et les queues de comètes suggèrent effectivement l'apparition de vraies cassures. Mais est-ce vraiment le cas ? Si on s'en tient à gH2AX, il semble que par-delà la fonction de mobilisation des enzymes de réparation, cette histone pourrait avoir un rôle épigénétique indépendamment de la question des DSB et de leur réparation. Et si c'est le cas est-ce vraiment si grave ? Il reste que la différence entre souris J20 et WT suggère fortement que le vieillissement pathologique n'est pas bon pour l'intégrité de notre ADN. Cela ne veut pas dire que cette intégrité est conservée dans les organismes jeunes ou qui vieillissent en bonne santé. La question est plutôt du côté de la réparation, du vieillissement de la réparation (sa perte de robustesse).

Instabilité génomique

Ce qui vient d'être discuté ouvre donc tout naturellement sur la réparation de l'ADN et, plus largement, sur l'instabilité génomique qui va nous occuper quelque temps. Je commencerai par discuter à l'aide de plusieurs articles récents (Iyama & Wilson III, *DNA repair* 12: 620-636, 2013 ; Lord & Ashworth, *Nature* 481: 287-294, 2012) la différence entre la réparation de l'ADN entre cellules en division et cellules post-mitotiques. Pour ce qui est de la partie neurale du système nerveux adulte, cela veut dire distinguer les cellules souches et les progéniteurs (SVZ et DG) des neurones matures. Puis je m'attarderai un peu sur le rôle des ARN non codants, essentiellement les miRNAs (régulateurs de la stabilité des ARN messagers et de leur traduction) dans la réparation de l'ADN avant de m'engager dans une discussion sur la chromatine et le noyau dans son ensemble encore que cet ordre ne pourra pas être scrupuleusement respecté, comme on le verra. En effet, il faut inclure l'aspect « architecture nucléaire » dans le chapitre des instabilités génomiques. C'est un point important en relation avec l'épigénétique et aussi avec la mobilité du génome à l'intérieur même du noyau. On ne le répètera jamais assez, nous ne sommes pas dans un système statique, nous y reviendrons longuement en particulier quand nous parlerons des lamines (protéines de la classe des filaments intermédiaires qui participent à la structuration du noyau) et de la mobilité de l'ADN et des chromosomes.

Juste pour faire une remarque introductive, la distinction entre cellules qui se divisent et cellules sorties du cycle cellulaire (en G0, comme nous le verrons) nous amène à introduire la problématique du cancer. En effet, une cellule transformée, cancéreuse donc, a développé des mutations qui lui permettent d'échapper à la sénescence et à la mort cellulaire. D'une certaine façon on peut dire qu'elles sont gagnantes dans le darwinisme cellulaire, jusqu'à la mort du porteur évidemment. L'exemple classique est la mutation de l'oncogène p53. Pour les cellules post-mitotiques, comme les



neurones, (leur vie très longue, le plus souvent aussi longue que la vie de l'animal qui les porte), exige au contraire des réparations qui permettent d'échapper à la mort ou à une sénescence par trop catastrophique. On voit donc qu'il peut y avoir une contradiction entre 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. Cela me permet de rappeler que ces maladies neurodégénératives (Alzheimer, Parkinson, Huntington) arrivent en général assez tard et n'existent pas, ou exceptionnellement, dans des populations dont la durée de vie n'excède pas une cinquantaine d'année.

Rappelons donc que le génome de tous les organismes est constamment modifié par les agents endogènes et exogènes : respiration mitochondriale, réponse inflammatoire, erreurs au cours de la réplication, agents physiques et chimiques, dont les rayons UV, les métaux lourds, les polluants de toute sorte. Bref cela peut conduire à la formation d'environ 100 000 lésions par cellule et jour dans le génome des mammifères. Ces lésions sont très diverses incluant des mutations ponctuelles, des oxydations de l'ADN, des cassures créées par les rayonnements, des translocations, des pertes et gains de fonction chromosomiques, des intégrations de virus ou de transposons. Les UV induisent un grand nombre de dimères de pyrimidine qui, s'ils incluent des cytosines, sont désaminés, la transformation en thymidine induisant une mutation. Ces phénomènes, normaux pour la plupart d'entre eux, sont pris en charge par les mécanismes de réparation de l'ADN.

Parmi la panoplie des lésions possibles, on peut énumérer les bases modifiées (oxydation, déamination, alkylation, par exemple), les cassures simple ou double brin (SSB et DSB), les liaisons intra-brin ou inter-brins. Si ces modifications ne sont pas réparées, des altérations s'installent qui peuvent induire une mutagenèse (substitution de bases, petites insertions et délétions, réarrangements chromoso-

miques plus importants, etc.). C'est en partie inévitable et, au cours du temps, on constate l'accumulation de ces lésions génétiques qui sont à l'origine du développement de cancers, et contribuent au vieillissement, dont le vieillissement cognitif. D'ailleurs les maladies génétiques conduisant à un vieillissement prématuré sont dues à une accumulation anormale et rapide de lésions de l'ADN non suivies de réparation. On peut citer les syndromes de Werner ou de Bloom (mutation d'une hélicase), celui de Cockayne (réparation de l'ADN) ou encore l'ataxia telangiectasia qui touche le système nerveux et est induite par des mutations dans ATM, une enzyme impliquée dans la réparation des cassures double brin, nous y reviendrons amplement, sans oublier ATR (syndrome de Seckel). Je ne décris pas ces maladies pour l'instant, me réservant de revenir sur certaines d'entre elles dans la suite du cours.

Je laisse aussi pour l'instant de côté l'ADN mitochondrial dont les mutations et délétions sont facilitées par un environnement riche en molécules oxydantes (les mitochondries sont en charge de la phosphorylation oxydative et de la synthèse d'ATP), autre point qui reviendra dans le cours, et par l'absence d'histones qui peuvent jouer un rôle protecteur (ce rôle protecteur est important même si, *a contrario*, dans le génome nucléaire les histones peuvent gêner l'arrivée des systèmes de réparation). Ces mutations mitochondriales sont impliquées dans de nombreuses pathologies, et très certainement dans le vieillissement normal même s'il faut relativiser du fait de la grande hétérogénéité des mitochondries, une hétéroplasmie portée par la coexistence, dans une même cellule, de populations mitochondriales hétérogènes (une partie portant une mutation, l'autre non). 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 mécanismes de réparation. Collectivement, ces



mécanismes sont appelés DDR pour DNA Damage (DD) Response. Les DDR diffèrent selon le type de lésion considéré 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. La **DIA I.17** illustre de façon extrêmement simplifiée les différents types de lésion que l'on peut observer, les types de réparation correspondants avec les protéines impliquées et les pathologies associées (le plus souvent ici des cancers), plus les drogues utilisées en thérapie. Dès à présent, pour commencer à vous familiariser avec la nomenclature, je vous invite à regarder les DSB (Double Strand Breaks) qui représentent la catégorie la plus importante des lésions de l'ADN pour constater l'existence de deux voies de réparation, une par recombinaison homologue ou HR (seulement possible pour les cellules qui se divisent) et l'autre par NHEJ pour toutes les cellules, y compris celles qui ne se divisent pas (seule voie possible pour celles-ci, dont les neurones).

La plupart des changements plus « subtils » de l'ADN, comme l'oxydation, les alkylations ou certaines cassures simple brin (SSB) sont réparés par ce qu'on appelle BER pour Base Excision Repair. Dans le système BER les bases sont retirées de la double hélice et la partie lésée du squelette de l'ADN est excisée et remplacée par de l'ADN néo-synthétisé. Les enzymes clés de ce processus sont les poly (ADP-ribose) polymérases 1 et 2 (PARP1 et PARP2), qui servent de détecteurs de la lésion. Les dommages faits aux bases de l'ADN, sont certes subtils, mais très nombreux et incluent l'oxydation (plus de 100 types d'oxydation ont été identifiés attribués aux ROS), la déamination ou l'alkylation (**DIA I.18**). Parmi ces lésions, la 8-oxo-dG (cercle sur la **DIA I.18**) est la modification la plus fréquente et la mieux caractérisée. Il a été calculé que 180 guanines sont oxydées par jour et par génome de mammifère et on trouve plusieurs milliers de 8-oxo-dG dans l'ADN nucléaire de tissu humain normal. Cette modification est à la base de mutations qui se produisent au cours de la réplication car le

nucléotide modifié est lu comme une thymidine et s'apparie à l'adénine et non la cytidine (mutation G:C -> G:A). Il y a aussi, pour la même raison d'erreur de lecture par les RNA polymérases, formation de transcrits mutés, donc de protéines possiblement défectueuses. La RNA polymérase II est d'ailleurs souvent bloquée dans son élongation et remplacée par des polymérases moins précises, comme pol-éta, pol-kappa ou pol-zeta. Une autre modification des bases est leur déamination qui induit des mutations sur le même principe d'appariement erroné. Ces mutations sont de même ampleur que celles provoquées par l'oxydation des guanines et, par ailleurs, peuvent bloquer la progression des polymérases et induire des réactions de type mort cellulaire (activation de l'apoptose).

Ces modifications de bases, auxquelles on ajoutera les alkylations, sont donc prises en charge par le système BER qui s'appuie sur de nombreuses enzymes impliquées successivement dans la reconnaissance des bases modifiées, une incision au niveau de la base modifiée et un remplacement du nucléotide (impliquant une ligation). Ces étapes sont illustrées dans la **DIA I.19**. Comme ce n'est pas l'axe essentiel de ce cours qui s'intéresse plutôt aux cassures double brin, je renvoie à l'article pour ceux qui seraient intéressés par la description détaillée des étapes enzymatiques. Le nombre des enzymes impliquées pourrait suggérer qu'il existe un nombre important de maladies génétiques (mutation de chaque enzyme). En fait, probablement du fait du caractère létal embryonnaire de ces mutations, il n'y a que peu de maladies génétiques associées à des défauts du système BER. Mais cela ne dit rien de l'effet pathologique chez les adultes. Ces pathologies incluent une prédisposition aux cancers, des défauts du système immunitaire et quelques anomalies neurologiques comme des formes de maladies d'Alzheimer ou de Parkinson et une susceptibilité aux accidents vasculaires. Canugovi *et al.* (*DNA repair*, 12: 578-587, 2013) s'attardent un peu plus sur ce point en se référant principalement à l'importance du stress oxydatif dans ces deux maladies neurodégénératives.



Dans cet article les auteurs rappellent que le cerveau est relativement bien protégé contre les agents délétères extérieurs du fait du crâne et de la barrière hémato-encéphalique qui contrôle le passage des agents toxiques depuis la circulation vers le parenchyme cérébral. Les lésions de l'ADN cérébral sont donc liées à l'activité métabolique endogène, dont nous avons – au cours des années précédentes – souligné l'importance, voire la démesure, dans notre espèce dont le cerveau a atteint une taille considérable en proportion de celle de notre corps. Ce qui veut dire que la forte activité métabolique cérébrale (20 % de notre énergie quotidienne est consacrée à cet organe) a pour conséquence une production très importante de ROS. Le cerveau fait face à cette situation, en particulier grâce à un mécanisme BER très efficace. Les auteurs de cet article ont utilisé une souris dans laquelle certaines glycosylases de la réponse BER (enzymes qui retirent la base endommagée et génèrent des sites abasiques) (**DIA I.20**) sont mutées afin de comprendre le rôle de BER dans la maladie d'Alzheimer, de Parkinson (nous ferons l'impasse sur le stroke). La reconnaissance et l'excision de la base endommagée sont les premières étapes dans le voie BER et le site abasique généré est retiré par APE (apurinic/apurimic endonuclease).

S'ensuit une réparation (gap filling) et une ligation (**DIA I.20**). La **DIA I.21** illustre les lésions principales dont 8 oxoG et FAPY G ainsi que les glycosylases impliquées dans leur reconnaissance et excision (noter la redondance de leur activité). Avant d'aller plus loin, je voudrais rappeler qu'au-delà de l'ADN génomique, nous avons l'ADN mitochondrial qui est soumis à un environnement riche en ROS et qui est réparé grâce à une très forte activité BER. Les souris mutantes pour la glycosylase OGG1 (ou NEIHL1 et NTH1) accumulent des 8 oxoG dans leur génome mitochondriale ainsi que les lésions qui accompagnent cette modification (nous en avons parlé). De ce point de vue, il est « intéressant » de constater que l'activité OGG1 décroît régulièrement avec l'âge.

Venons-en à AD et PD. Pour m'en tenir à l'exemple des oxoG, OGG1 est dérégulée dans les cerveaux AD et PD. On constate une forte élévation de 8-oxoG dans l'ADN nucléaire des lobes frontaux, temporaux et pariétaux des malades AD ainsi qu'une baisse de l'activité OGG1. Par ailleurs, une baisse de la β -OGG1 (l'enzyme mitochondriale) est observée dans différentes régions du cortex. À l'inverse cette enzyme mitochondriale est augmentée dans la substance noire et les neurones dopaminergiques des patients atteints de la maladie de Parkinson. Cela suggère une réaction possible aux niveaux élevés de 8-oxoG dans l'ADN mitochondrial de ces cellules soumises à un très fort stress oxydatif. Je passe sur la réparation qui peut se faire au niveau de nucléotides oxydés avant même leur incorporation dans l'ADN, soit pour la réplication, soit pour la réparation et qui nécessite l'activité MTH1. Toutes ces données sont résumées dans la **DIA I.22**, y compris les données plus confuses observées dans les ischémies cérébrales.

Pour clore ce premier cours, je m'engage dans une discussion plus générale du rapport entre réparation de l'ADN et neurosciences. La **DIA I.23** vous illustre de façon simpliste un certain nombre de tests qu'on peut utiliser pour mesurer la force et l'équilibre (le rotarod), la capacité d'apprentissage et de mémorisation (trouver et retrouver une plate-forme cachée dans une « mer de lait »), la mémoire liée à l'expérience douloureuse (anxiété liée à la peur) et une autre forme d'anxiété qui est la peur des espaces vides et la tendance, chez les souris normales, à se déplacer en suivant les bords du territoire et à éviter son centre plus anxiogène. Ce sont là quelques exemples de sorties comportementales pour des phénomènes qui affectent les structures cérébrales, à tous les niveaux, celui de l'ADN étant un niveau important. La table qui est en bas de cette **DIA I.23**, vous donne les noms des structures les plus impliquées dans chacun de ces tests comportementaux.

On peut donc utiliser ces tests dans différents modèles génétiques et en présence ou non d'un stress extérieur. Dans le test du rotarod (force mais



aussi coordination et équilibre) on constate que la délétion d'OGG1 augmente le nombre de chutes, ce qui suggère un déficit fonctionnel dans les structures qui contrôlent le mouvement (peut-être aussi les motoneurons), non sans rapport avec la maladie de Parkinson puisque la perte en neurones dopaminergiques chez la souris se traduit par des performances motrices diminuées dans le test du rotarod. Les souris invalidées pour NEIL1 ont une diminution de mémoire spatiale mesurée dans le test du water-maze et un lien possible est envisageable, même s'il n'est pas démontré. Cela étant je vous rappelle les expériences sur le BA4 et les cassures double brin qui rendent raisonnables de considérer aussi une implication des bases modifiées et des cassures simple brin. En conclusion, dans le contexte de 5 % seulement de formes génétiques avérées dans ces deux maladies qui nous ont occupés ces dernières minutes, la possibilité d'une résistance plus ou moins forte – via la réparation – à des altérations du génome nucléaire et mitochondrial est une hypothèse que nous ne pouvons écarter (litote). ■