



3 novembre 2014

Du sang neuf pour nos cellules

Dans un cours précédent, nous avons parlé des cellules souches en nous interrogeant sur la fonction des niches, mais aussi de la circulation ou, plus largement, de l'environnement circulaire, dans la physiologie des cellules souches, leur quiescence, renouvellement ou différenciation (**DIA V.2**). Je vais y revenir aujourd'hui à travers des expériences récentes qui ont fait un certain bruit. Je commence par un article en fait assez ancien de Villeda *et al.* (*Nature* 477: 90-94, 2011) qui identifie une molécule qui semble favoriser le vieillissement cérébral, en tout cas au niveau des cellules souches neurales adultes. La **DIA V.2** rappelle – une fois de plus – que ces cellules se repartissent entre la zone sous-ventriculaire (SVZ) qui fournit de nouveaux neurones au bulbe olfactif (je ne reviens pas sur la discussion que nous avons eue il y a 15 jours pour les souris et les hommes et la question du striatum), et les neurones du gyrus denté (SGZ) qui produisent des interneurons glutamatergiques hippocampaux dont nous connaissons l'importance pour la cognition et aussi la régulation de l'humeur (en tout cas selon certaines théories que je vous ai exposées les années précédentes et qui associent certains types de dépression à une diminution de la neurogenèse dans l'hippocampe).

Avant d'aller plus loin, je présente (en haut à droite) le modèle de circulations croisées (parabiosis) sur lequel nombre des expériences que je vais décrire est fondé (**DIA V.2**). L'importance de la circulation générale peut s'expliquer par le passage de molécules (et même de cellules) vers le cerveau – à travers la barrière hémato-méningée – même s'il est généralement admis que ce phénomène est rare, mais aussi par l'activité des cellules endothéliales qui forment la paroi des vaisseaux et qui – au contraire des cellules musculaires lisses secrètent des molécules vers le parenchyme cérébral (**DIA V.3**). La **DIA V.2** en bas à droite montre que les cellules souches neurales sont au contact des vaisseaux où elle prolifèrent avant de se dif-

férer, essentiellement en neuroblastes (pour la SGZ).

Reprenons le fil, chez les souris (j'insiste) on observe une baisse de la neurogenèse avec l'âge ainsi qu'une augmentation de l'inflammation. Parallèlement, on peut mesurer une diminution de la plasticité synaptique et une défaite comportementale dans des tests comme le conditionnement anxieux dépendant du contexte ou la mémoire spatiale (*water maze* **DIA V.3**). Pour comprendre si ces aspects du vieillissement pouvaient être, en partie, liés à l'environnement périphérique et systémique, les auteurs ont fait appel au protocole de parabiosis ou circulations croisées que je viens de vous décrire. La **DIA V.4** illustre (panneau de gauche) le résultat de cette expérience avec, chez la souris jeune, une diminution des neuroblastes (marqués par Dcx) et un effet inverse chez les vieilles souris. Le résultat est similaire (panneau de droite) quand on suit l'incorporation de BrdU, c'est-à-dire qu'on suit la prolifération des cellules souches (au niveau du compartiment d'amplification) et celle des neuroblastes. Si on se tourne maintenant du côté du comportement, on observe que l'apprentissage synaptique (LTP) baisse chez les jeunes souris qui ont échangé leur sang avec les souris âgées ! L'article ne dit pas si ça monte chez les souris âgées.

À partir de là, les chercheurs ont décidé d'injecter en intraveineuse, dans une souris jeune, du plasma de souris jeune ou de souris vieille (4 injections sur une période de 10 jours) et d'en évaluer les effets comportementaux dans le test de conditionnement contextuel à la peur et celui d'orientation dans le *water maze* à bras radiaux (RAWM pour *radial arms water maze*, une mesure de l'acquisition de la mémoire spatiale par l'hippocampe). La **DIA V.5** donne le résultat de cette expérience (plasma âgé dans souris jeune). On constate une perte de la différenciation en neuroblastes (Dcx) associée à un déficit de mémorisation (les souris ont moins peur quand le signal « danger » est donné). Enfin on constate en « e » que si l'apprentissage spatial se fait correctement avec des erreurs de moins en moins



nombreuses au fil des répétitions, la mémorisation du bras « sauveur » est très diminuée après injection de plasma « âgé ».

Les auteurs ont alors fait une sorte de pari qui était de rechercher par une approche protéomique les niveaux de certaines protéines (jeune versus vieux, jeune versus jeune « vieilli »), le plus souvent de la famille des cytokines et chemokines, sans doute avec l'idée que l'effet négatif du plasma de souris âgée pourrait refléter un état inflammatoire. Cela les a amené à se concentrer sur les 6 protéines présentées dans la **DIA V.6** : CCL2, CCL11, CCL12, CCL19, Haptoglobine et β 2-microglobuline. Puis ils se sont focalisés sur CCL11 sur la base du fait que cette chemokine connue pour son rôle dans la réponse allergique n'avait pas été impliquée avant dans les processus de vieillissement ou de contrôle de la neurogenèse. La même **DIA V.6** montre l'augmentation de sa concentration avec l'âge ou à la suite de la circulation croisée. L'évolution de CCL11 plasmatique chez *sapiens* a aussi été suivie et, au-delà de l'hétérogénéité (il ne s'agit pas de lignées pures de souris !) on constate – en moyenne – aussi une augmentation avec l'âge. S'ensuivent un certain nombre d'expériences que je résume dans la **DIA V.7** et qui démontrent par perte et gain de fonction (injection intraperitonéale) que CCL11 régule à la fois la neurogenèse (Dcx) et la cognition dans les deux tests étudiés.

Pour résumer cet article, on dira qu'il lie une forme de vieillissement (il n'y a pas que l'hippocampe dans la vie) à un déficit de neurogenèse adulte et aux modifications synaptiques (LTP) observées dans cette structure. Pour nous reconforter, on peut aller rechercher les données de Frisen qui suggèrent que la baisse de neurogenèse avec l'âge chez *sapiens* est très inférieure à ce qui est observé chez les souris (d'ailleurs les données de la **DIA V.6** suggèrent une très forte hétérogénéité chez les humains et une hausse plutôt modérée de CCL11). L'approche protéomique de nos collègues était très ciblée et on peut imaginer qu'une foultitude d'autres facteurs interviennent mais il est

intéressant de constater que les chemokines dont la concentration augmente avec le vieillissement naturel ou artificiel sont toutes localisées sur moins de 70kb du chromosome 11 chez la souris et 40kb du chromosome 17 chez sapiens, suggérant l'existence d'un « locus vieillissement ».

Ce qui m'amène à la démarche inverse qui ne consiste pas à vieillir les jeunes mais à rajeunir les vieux. Deux articles sur ce thème ont été publiés en 2014, dont un du groupe responsable de l'étude que nous venons de parcourir (Villeda *et al.*, *Nature Medicine*, 20 : 659-663, 2014) et l'autre d'une autre équipe (Katsimpari *et al.*, *Science*, 344 : 630-634, 2014). Je vais donc commencer par Villeda et collègues et leur étude sur le rajeunissement par circulations croisées. Les auteurs sont justes et reconnaissent que les études du rajeunissement par ces techniques de « parabiose » ont été conduites sur d'autres tissus et leurs cellules souches, en particulier le tissu musculaire ou hépatique et même le tissu nerveux, mais pour ce dernier sans référence aux processus cognitifs. Ils partent donc maintenant d'une étude génomique (μ array) menée sur des hippocampes de souris âgées (18 mois), et de parabiontes âgé-âgé et âgé-jeune. En comparant les données obtenues chez les animaux âgés (**DIA V.8**) et en utilisant les programmes habituels d'analyse de catégories ou de voies, ils tombent sur des gènes de plasticité synaptique et de voie de signalisation.

Ces identifications de gènes « candidats » ont été suivies d'expériences d'expression et de localisation des protéines correspondantes, tout particulièrement la forme phosphorylée de Creb (on se souvient de son rôle dans l'apprentissage tel qu'il a été illustré l'année dernière à travers les travaux de Eric Kandel sur la mémoire de l'Aplysie) et les protéines encodées par les *immediate early genes*, c'est-à-dire les gènes qui sont immédiatement exprimés (en moins de 5 minutes) après une stimulation. Parmi lesquels les gènes EGR (ici EGR1) et c-fos ou encore Arc (qu'on ne retrouve pas, curieusement, dans cette analyse). La **DIA V.9** démontre une augmentation du nombre de cellules Egr1 et c-Fos ainsi



qu'une augmentation de l'expression de pCreb. Par ailleurs, les cellules des grains du gyrus denté ont plus d'épines dendritiques et la LTP (amplitude des pics) est augmentée après la « perfusion » par échange (**DIA V.9**).

Suivant un schéma proche de celui exposé dans l'analyse du papier précédent (« vieillir les jeunes »), du plasma de souris jeune a été injecté en intraveineuse à des souris âgées avec un contrôle consistant en l'injection de plasma de souris âgée. À la suite de cette injection, le comportement des souris a été testé, avec les mêmes protocoles, qui sont présentés – avec les résultats – dans la **DIA V.10**. On peut le constater, les souris âgées voient leur mémoire augmentée dans les deux tests de mémoire spatiale et de mémoire du stress (conditionnement à la peur, *freezing*), mais cette augmentation est perdue si le plasma est dénaturé par la chaleur, ce qui suggère qu'une ou plusieurs protéines sont responsables de l'amélioration des souris gérontes. La dernière expérience de l'article présenté a permis de montrer, grâce à l'expression virale d'une forme dominant négative de l'enzyme, que Creb et sa phosphorylation sont nécessaires à l'augmentation du nombre d'épines dendritiques (**DIA V.11**) et à l'amélioration des fonctions cognitives (**DIA V.12**). Cet article diffère du précédent non seulement parce que nous assistons à un rajeunissement expérimental et non à un vieillissement, mais aussi en ce qu'il ne s'intéresse pas à la neurogenèse mais à la cognition, ce qui ne veut pas dire que la neurogenèse ne soit pas stimulée. C'est ce que nous allons voir avec le prochain article.

Katsimpardi et collègues nous rappellent que les cellules souches adultes sont en contact direct avec le liquide cébrospinal (CSF) et les vaisseaux sanguins et leurs cellules endothéliales (peut-être plus) dont elles reçoivent de nombreux signaux. Ils nous rappellent aussi que la neurogenèse est régulée par de nombreux « facteurs » comme l'exercice physique (nous en avons longuement parlé au cours des années précédentes), la prolactine ou encore la restriction calorique (Wu *et al.*, *Neurobiol. Aging* 29 :

1502-1511, 2008). Au cours du vieillissement, de nombreux paramètres – à commencer par la détérioration de la vascularisation locale – contribuent à un affaiblissement de la neurogenèse. Donc, comme leurs « prédécesseurs », les auteurs ont mis en place le système de parabiose et suivi la vascularisation – au niveau de la SVZ cette fois, et non de la SGZ – et la neurogenèse avec ses conséquences sur le plan olfactif. On s'en souvient, en effet, les cellules de la SVZ se différencient en neurones GABA du bulbe olfactif.

Les pairs sont soit hétérochronique entre des animaux de 15 (Het-O) et 2 mois (Het-Y) pour *Old et Young*, soit isochronique (Iso-O ou Iso-Y) et les parabioses ont été installées pour 5 semaines. Les marquages ont été faits avec Ki67 (toutes les cellules en prolifération au moment de la fixation) ou en distinguant celles qui expriment Sox2 de celles qui expriment Olig2 (compartiment d'amplification) (**DIA V.13**). Les comptages montrent que dans les Het-O (vieux rajeunis) comparés au Iso-O (vieux-vieux), le nombre de Ki67, Sox et Olig2 augmente respectivement de 27, 110 et 57 %. Mais ces mêmes populations ne sont pas modifiées dans les Het-Y (c'est-à-dire les jeunes en circulation croisée avec le vieux). La contradiction avec le papier de Villeda 2011 (les vieux vieillissent les jeunes) n'est pas lié au type cellulaire (SVZ versus SGZ) mais à l'âge des souris puisque Villeda *et al.* utilisaient des souris de 21 mois et non de 15 mois. En fait, quand les auteurs de ce papier prennent des souris de 21 mois, ils retrouvent un effet négatif aussi sur la SVZ des jeunes souris en circulation croisée.

Les neuroblastes générés par la SVZ migrent vers le bulbe olfactif où ils forment des interneurons GABAergiques. La **DIA V.14** démontre l'existence de nouveaux neurones dans le bulbe et surtout une augmentation de leur nombre chez les Het-O. Cela devait avoir une probable implication fonctionnelle qui fut évaluée par un test olfactif consistant en la mesure du temps d'exploration des souris mises en contact avec différentes concentrations d'un produit odorant. La même **DIA V.14** démontre clairement un



rajeunissement olfactif chez les Het-O qui deviennent aussi performants que les Iso-Y.

L'architecture cérébro-vasculaire, la densité des capillaires et le flux sanguin se modifient avec l'âge. Partant de l'hypothèse d'un lien entre ces modifications morphologiques et fonctionnelles des vaisseaux et la baisse de la neurogenèse, les auteurs ont effectué une reconstruction en trois dimensions des vaisseaux et calculé que le vieillissement s'accompagne d'une baisse du volume vasculaire (**DIA V.15**). Mais de nouveau, il semble que la parabiose reverse la situation avec de nouveaux vaisseaux et plus de branchements. Un point possiblement intéressant est que ces vaisseaux nouvellement formés ne sont pas au contact de pieds astrocytaires (marqué par AQP4+), ce qui implique une probable absence de jonctions serrées et donc la possibilité d'un apport d'éléments d'origine périphérique. Cette formation de vaisseaux est observée dans la SVZ, mais aussi la SGZ et même dans des régions cérébrales qui ne connaissent pas de neurogenèse adulte, en tout cas dans l'état actuel de nos connaissances.

La formation de nouveaux vaisseaux trouve son origine dans l'action de facteurs périphériques sur la multiplication des cellules endothéliales conduisant au bourgeonnement vasculaire. Cela semblait clair du fait de l'absence d'apport cellulaire à partir des souris jeunes (utilisation de souris GFP-positives) et est conforté par des expériences montrant que le sérum de jeune souris (mais pas celui des vieilles) stimule la division des cellules endothéliales des capillaires. Dans la recherche de facteurs circulants qui pourraient jouer un rôle, les auteurs en ont cherché qui décroissent avec l'âge et se sont attachés à un facteur ayant cette propriété et qui avait été récemment découvert comme capable de rajeunir le tissu musculaire cardiaque (Loffredo *et al.*, *Cell* 153 : 828-839, 2013) (**DIA V.16**), encadré rouge). GDF11 est aussi appelé BMP11 et fait donc partie de la grande famille des BMP/TGF β , une classe très importante de morphogènes ou facteurs de croissance. D'où l'injection de GDF11 à des vieilles souris à des doses restituant le niveau

mesuré chez les jeunes avec le résultat attendu d'une augmentation de 50 % du volume vasculaire et de 29 % des cellules Sox2 de la SVZ. En culture, GDF11 augmente la prolifération des cellules endothéliales qui répondent à la présentation de GDF11, de TGF β aussi, par la phosphorylation de SMAD2/3 (**DIA V.16**). J'attire tout de suite votre attention sur le fait que GDF11 semble avoir ici un rôle un peu étrange puisque ce facteur est un homologue de la myostatine, qu'elle est connue pour bloquer la prolifération des récepteurs olfactifs et que son action rajeunissante sur le tissu cardiaque est comprise comme résultant d'une diminution de l'hypertrophie cardiaque liée à l'âge.

Avant d'en venir à la régénération, je vous livre un bref résumé que j'emprunte à Bitto et Kaebler (*Cell metabolism*, 20 :2-4, 2014) (**DIA V.17**). Ils repartent des expériences de parabiose effectuées en 2004 et 2005 qui démontraient des effets forts sur les cellules souches hépatiques et musculaires, des effets dans les deux sens, d'ailleurs, de rajeunissement pour les souris âgées et de vieillissement pour les souris jeunes. En arrivant aux résultats les plus récents, ils nous informent du rôle bénéfique de GDF11 sur les muscles, la SVZ et la SGZ. L'injection de GDF11 seul restaure la force musculaire, l'endurance et la régénération de ce tissu (là encore il y a quelque chose d'étrange puisque la myostatine – homologue de GDF11 – est connue pour inhiber la croissance et la régénération musculaire (d'où son nom)). Au niveau du système nerveux, nous venons de le constater, GDF11 a un effet bénéfique sur la neurogenèse qui passe peut-être par la vascularisation, ce qu'on ne peut exclure pour les autres systèmes, bien entendu. À l'inverse CCL11 a des effets négatifs sur l'hippocampe, nous venons de le voir.

Nous allons passer maintenant à la régénération dans le système nerveux vieillissant à travers l'article de Ruckh et collègues (*Cell Stem Cell* 10 : 96-103, 2012). Cet article est centré sur la question de la formation de la myéline ou plutôt sa re-formation (remyélinisation) qui est très importante dans la



mesure où elle autorise une communication rapide entre cellules nerveuses. On pense évidemment à la sclérose en plaque associée à des défauts de myélinisation et à la baisse de la capacité régénérative qui accompagne le vieillissement. Cette diminution au cours du vieillissement est liée à de multiples facteurs, dont l'environnement cellulaire dont nous venons de parler à propos de la neurogenèse adulte, mais aussi aux modifications épigénétiques qui affectent les OPC (précurseurs des oligodendrocytes qui forment la myéline dans le système nerveux central). Cette étude par Ruckh et collègues est consacrée au possible rajeunissement des OPC par l'addition de facteurs extrinsèques. Le protocole de démyélinisation consiste en l'application locale d'une toxine et l'association de cette intervention à un protocole de parabiose afin de rechercher la présence, dans la circulation d'individus jeunes, de facteurs favorisant la formation de myéline.

Les animaux ont donc été liés par la technique de parabiose (isochronique et hétérochronique) 3 semaines avant l'injection locale de lysolecithin qui induit une lésion démyélinisante dans la moelle épinière (**DIA V.18**). Lorsqu'un des animaux exprime la GFP sous le contrôle d'un promoteur généraliste (celui de l'actine), toutes ses cellules sont vertes. La présence de cellules vertes au niveau de la lésion montre, d'une part, que la BBB a été détériorée et, de l'autre, que les effets obtenus peuvent être d'origine sérique ou cellulaire. Les auteurs ont commencé par comparer les animaux à 7 (OPC principalement) et 14 jours (nouveaux oligodendrocytes) après la lésion. Les OPC en prolifération sont caractérisés par l'expression de Nkx2.2 et de Ki67. La **DIA V.18** démontre qu'aux deux temps (7 et 14 jours), la parabiose hétérochronique améliore nettement la prolifération des OPC (panneau de gauche). Cette augmentation s'accompagne de celle de la densité en cellules endothéliales (CD 34+) tout particulièrement à 14 jours (**DIA V.18**, panneau de droite). Cet accroissement des OPC s'accompagne de l'augmentation de la présence d'oligodendrocytes matures (CC1+/Olig2+) dès 14 jours mais surtout, et très nettement, à 3 semaines (**DIA V.18**) avec la

présence de figures de remyélinisation en microscopie électronique (**DIA V.19**). Un point important est que si les vieilles souris profitent de la parabiose hétérochronique, les jeunes n'en souffrent pas. Il faut dire que les souris jeunes sont très jeunes (5 à 7 semaines) et les âgées pas si âgées que ça (10-12 mois). Avec une exception pour l'expérience de recherche des facteurs de croissance exprimés par les macrophages (voir plus bas) où les âges sont 2 et 22 mois, respectivement). Comme dans le papier de Villeda et collègues (2011) discuté plus haut, on peut imaginer que des souris plus âgées auraient pu avoir une influence négative sur la rémyélinisation chez les souris jeunes.

La présence de GFP exprimée sous le contrôle du promoteur de l'actine permet de constater que des cellules vertes ont envahi la lésion et s'y sont concentrées (**DIA V.20**). Ces cellules ne sont pas des OPC ou des oligodendrocytes, mais très majoritairement des macrophages exprimant Mac1 à la densité d'environ 200 cellules par mm². On remarquera que les macrophages sont présents chez les iso jeunes et vieux et les hétéro vieux (agrandissement **DIA V.20**). Il existait des expériences suggérant un rôle de l'immunité innée (donc des macrophages, comme le savent ceux qui ont assisté à des cours plus anciens) et les auteurs ont donc supposé que les macrophages d'animaux jeunes, de jeunes, à l'opposé de ceux d'animaux plus âgés, ont une action trophique. Les macrophages sont recrutés à partir de la circulation vers les sites d'inflammation par chimiotactisme, grâce à un gradient de la chemokine MCP-1 qui se fixe à son récepteur le CCR2. Les auteurs ont donc utilisé des souris GFP+ mais CCR2- et montré une forte baisse du recrutement des macrophages conduisant à une diminution des oligodendrocytes à un niveau intermédiaire entre hetero-old et iso-old (**DIA V.21**).

Il y a donc une différence entre jeune et vieux macrophages, même si les deux populations sont également attirées au site de lésion. L'analyse par *µarray* des gènes exprimés donne très peu de différence et les auteurs ont formé l'hypothèse qu'il



s'agit plutôt d'une différence dans l'activité macrophagique elle-même. En effet, la myéline contient des protéines qui inhibent la différenciation des OPC et on peut imaginer que la phagocytose des débris de myéline constitue un facteur important dans la capacité des OPC à se différencier en oligodendrocytes. Cette capacité macrophagique peut être estimée par la présence des lipides qui sont marqués par le Oil-Red O (ORO). Le marquage des sites de lésion dans les différentes conditions montre très exactement que la phagocytose de la myéline est diminuée chez les iso-old et les hetero-old en parabiose avec une souris CCR2- (**DIA V.22**). Un résultat identique est obtenu avec des anticorps contre la Myelin basic Protein (MBP).

Je vais quitter les parabioses mais revenir à GDF11, facteur dont nous venons de voir qu'il stimule la neurogenèse adulte, à propos de son orthologue chez la Drosophile et, non pas du système nerveux, mais des muscles. L'article sur lequel je vais me fonder est de Demontis *et al.*, *Cell Reports* 7 : 1481-1494, 2014. Il s'agit toujours de vieillissement, mais maintenant de vieillissement musculaire. Si j'y reviens, ce n'est pas par attachement pour les mouches, ou les muscles, mais parce que cet article introduit un nouvel acteur, le nucléole, une structure nucléaire importante, tout particulièrement dans la biogenèse des ribosomes, donc dans la biosynthèse des protéines. Les données épidémiologiques suggèrent que nombre de décès chez l'homme sont liés à des sarcopénies ou pertes musculaires (muscles squelettiques) dont les causes sont diverses mais qui accompagnent le vieillissement. Ce point de vue est soutenu par des expériences de génétique qui montrent que des interventions sur le muscle prolongent la vie chez la Drosophile. Curieusement, certaines actions directement sur le muscle ont des effets de ralentissement du vieillissement d'autres tissus. On s'interroge sur les mécanismes moléculaires.

Le facteur de transcription Mnt chez la Drosophile appartient à la famille helix-loop-helix et est homologue du facteur MNT/MAD qui chez les

humains régule (réprime) l'expression de plusieurs gènes de la biogenèse des ribosomes et de l'anabolisme (lié à la synthèse protéique). La protéine est présente dans le noyau des cellules de nombreux tissus, dont le muscle et les mouches mutantes pour Mnt ont une durée de vie réduite. Dans ce travail, les auteurs ont utilisé un driver Mhc-Gal4 pour exprimer Mnt dans les muscles squelettiques exclusivement. Cette surexpression, sans effet sur la nutrition ou la masse corporelle et musculaire, prolonge la vie des mouches et améliore leur capacité de grimper le long d'une paroi à un âge avancé (**DIA V.23**). Une analyse transcriptome par μ array montre que les gènes réprimés par la surexpression de Mnt incluent des protéines ribosomales et des composants du nucléole, compartiment du noyau spécialisé dans la synthèse des ARN et des protéines des ribosomes, je viens de le rappeler. Au cas où, je rappelle aussi que les ribosomes sont des structures composées d'ARN et de protéines qui interviennent dans la traduction des ARN messagers en protéines. Cela suggère que le nucléole joue un rôle important dans la longévité liée à la surexpression de Mnt. J'attire votre attention sur le fait que le gène n'est surexprimé que dans les muscles squelettiques mais que c'est l'animal entier dont la survie est prolongée, pas seulement celle de ses muscles (ça nous ferait une belle jambe !). La **DIA V.24** confirme au niveau individuel la répression de ces gènes nucléolaires par la surexpression (en bleu foncé) et leur augmentation chez le mutant Mnt-/- (bleu clair) ainsi que la survie prolongée quand on inhibe le gène par interférence ARN, survie prolongée qui s'accompagne d'un prolongement de la capacité musculaire (bleu ciel).

Le nucléole a été impliqué dans la régulation de la sénescence répliquative chez la levure il y a déjà très longtemps, en 1997 pour être précis, et en fait est un carrefour (*hub*) pour la sensibilité au stress chez les organismes pluricellulaires. Les protocoles qui retardent le vieillissement cellulaire, par exemple les traitements à la rapamycine, réduisent la taille et la fonction nucléolaire. D'où l'idée de rechercher un rôle pour le nucléole en aval de Mnt. Sur cette base les auteurs ont réprimé l'expression de protéines



nécessaires à la maturation des ARN ribosomiaux et à la biogénèse – la fonction aussi – des ribosomes (fonction principale – à ce jour – des nucléoles). Ils ont ainsi observé que des RNAi dirigés contre plusieurs de ces gènes, spécifiquement dans le muscle squelettique, augmentent la survie et la capacité musculaire (F et G dans **DIA V.24**), le RNAi contre le gène *white* étant pris ici comme contrôle. La suite est de vérifier si *Mnt* réduit les fonctions nucléolaires en mesurant les niveaux d'ARN 28S. La **DIA V.25** illustre deux points. D'une part, (en gris) l'expression de l'ARN ribosomal diminue avec le temps (plus faible à 5 semaines qu'à une semaine), de l'autre l'expression de *Mnt* diminue cette expression à 1 semaine.

On notera que cet effet se produit non seulement dans le tissu musculaire (thorax), mais aussi dans le tissu non musculaire (tête et abdomen), ce qui suggère une activité non autonome, puisque l'expression de *Mnt* n'est diminuée que dans le tissu musculaire. C'est un point essentiel qui réintroduit l'idée que les communications entre tissus jouent un rôle important dans le vieillissement. C'est sur cette base que les auteurs ont mesuré la taille du nucléole (grâce à un marqueur – la fibrillarin) non seulement dans le tissu musculaire, mais aussi dans le tissu adipeux. La **DIA V.25** (C-G) démontre une baisse de la taille des nucléoles dans le tissu adipeux consécutive à la surexpression de *Mnt* dans le muscle. De nouveau, on constate que cette baisse se fait « naturellement » chez les mouches de 5 semaines.

Il fallait donc identifier le ou les facteurs sécrétés par les muscles et responsables de cette activité systémique. Cela a été mené à l'aide d'un crible RNAi dirigé contre plusieurs cytokines et facteurs de croissance rassemblés sous le terme générique de myokines, parce qu'ils sont sécrétés par les muscles et adressés à d'autres tissus, chez l'humain. Ce qui est suivi est la survie (des mâles) et leur activité « d'escalade » des parois de verre des tubes dans lesquels les mouches sont élevées. On peut voir dans la **DIA V.26** que l'inhibition de certaines myokines diminue à la fois la durée de vie médiane, la

durée de vie maximale et les capacités physiques des mouches. Parmi ces myokines, une des plus actives est la myoglianin, de la famille TGF- β , un facteur sécrété par les cellules gliales et les cellules musculaires de la mouche et dont les orthologues humains sont GDF8 et GDF11.

Pour confirmer un rôle de la myoglianin dans le phénotype, les auteurs ont établi que ce gène était sous le contrôle de *Mnt* (**DIA V.27**) puisque son expression diminue chez le mutant *Mnt*^{-/-} (en haut à gauche) et augmente quand on surexprime *Mnt* (en haut à gauche et en bas à gauche avec un rapporteur luciférase du gène *Mnt*). Dans la même **DIA V.27** (en haut à droite) on peut voir que les effets positifs de *Mnt* sur la survie et la dextérité sont abolis par un RNAi (2 RNAi différents en fait) dirigés contre la myoglianin, mais pas par des RNAi dirigés contre le gène *white* (*control*). La surexpression directe de myoglianin dans les muscles squelettiques (**DIA V.27** en bas à droite) a les mêmes effets sur la survie et la dextérité. La **DIA V.28** reprend ce résultat avec des contrôles supplémentaires mais surtout démontre un effet sur les ARN ribosomiaux à la fois dans le tissu musculaire (où le gène est exprimé) mais aussi dans la tête et l'abdomen où il ne l'est pas et introduit les contrôles RNAi contre les gènes *white* et le gène myoglianin. On peut suivre ce qui se passe chez la mouche à travers l'expression des rRNA. Les inhibitions musculaire et non musculaire ont peu d'effet chez les jeunes et un fort effet chez les vieux (en tout cas pour un des RNAi, d'où l'utilité d'en tester plusieurs). Ces effets se traduisent au niveau de la taille des nucléoles, y compris ceux du tissu adipeux (**DIA V.29**). Même si ces expériences ne concernent que les mouches, on peut rappeler ici que, chez les mammifères, la myostatine et GDF11 sont présents dans la circulation et agissent sur tous les tissus

En conclusion de cette étude, on peut dire que *Mnt* a une action autonome sur le tissu musculaire, action qui passe par une réduction de l'activité du ribosome. Elle aussi, via la régulation de myokines, dont la myoglianin, un effet systémique qui réduit aussi les niveaux de rRNA (via p38 MAPK, pour



ceux que ces détails intéresseraient). Cette question nucléolaire est intéressante. Le nucléole est un régulateur positif crucial de l'anabolisme et son activité est réduite dans nombre de modèles qui augmentent la durée de vie non sans écho du côté de la restriction calorique et de la voie mTORC1 (la rapamycine si vous vous en souvenez). Ce rôle des ARN ribosomiaux dans le vieillissement va m'amener à vous présenter un autre papier sur le même thème par Larson *et al.*, *PLoS Genetics*, 8 : 110, 2012 et à faire le lien avec l'hétérochromatine dont je vous rappelle qu'elle constitue la part réprimée de la chromatine.

Dans ce papier, les auteurs rappellent que le vieillissement des organismes s'accompagne de l'accumulation de défauts de l'ADN. Le mécanisme sous-jacent reste encore un peu obscur mais la théorie des radicaux libres est une des hypothèses principales. D'autres modèles existent – pas forcément en opposition – qui impliquent la sénescence programmée, la perte d'hétérochromatine, le raccourcissement des télomères, l'instabilité du génome, les apports nutritionnels (trop ou trop peu, qualité...), etc. Le modèle perte d'hétérochromatine proposé dès 1997 par Villeponteau (*Experimental gerontology* 32 : 383-394) est associé à une expression illégitime de gènes liés au vieillissement. Mais les modifications de l'hétérochromatine ne sont pas uniformes avec d'un côté la formation de « foci » d'hétérochromatine associés au vieillissement (SAHF pour Senescence Associated Hétérochromatin Foci) et de l'autre une perte globalisée d'hétérochromatine. L'hétérochromatine est essentielle, cela a été démontré chez la Drosophile, pour la stabilité des séquences répétées (par exemple, mais pas seulement les éléments transposables, complets ou non) et de gènes codant pour l'ARN ribosomal. La perte d'hétérochromatine induit une déstructuration du nucléole et la formation de DNA circulaire extrachromosomal (ECC) avec des recombinaisons illégitimes au niveau du locus des ARN ribosomiaux. Ces données soutiennent l'idée d'un lien entre la formation de l'hétérochromatine et la longévité. Pour comprendre le rôle de l'hétérochromatine

matine dans le vieillissement animal, les auteurs ont manipulé génétiquement chez la mouche les niveaux de HP1, un régulateur essentiel de la formation de l'hétérochromatine (j'y viens), et de la signalisation JAK/STAT (j'y viens aussi). Leurs résultats suggèrent que l'hétérochromatine empêche un vieillissement prématuré et supprime la recombinaison illégitime au niveau du locus rDNA et la synthèse non nécessaire de rRNA.

La première expérience a consisté à modifier les niveaux de HP1. Je le rappelle HP1 est une protéine de la chromatine associée aux complexes répresseurs et donc importante dans la structuration de l'hétérochromatine. Réduire HP1 de moitié comme dans *Su(var)2055* qui est un mutant suppresseur de variégation (je suppose) diminue la durée de vie alors qu'un gain de fonction modéré (trop de HP1 provoque des anomalies du développement) de HP1 l'augmente (**DIA V.30**). Dans cette même **DIA V.30** est représentée une vision hyper simplifiée de la voie JAK/STAT où on constate que la kinase JAK (Janus kinase) fixée sur un récepteur et phosphorylée par le signal transduit par ce récepteur se complexe avec STAT et phosphoryle STAT qui est adressée au noyau (homodimères ou hétérodimères) et active la transcription. Il y a plusieurs JAK et STAT. Ce passage par JAK/STAT est lié au fait que cette voie est impliquée dans la formation de l'hétérochromatine. En fait, il y a deux voies, une canonique qui régule l'expression des gènes de façon directe et une non-canonique dans laquelle STAT non phosphorylée est essentielle à la formation de l'hétérochromatine et à la stabilité du génome. La **DIA V.30** (B), montre que l'action de JAK/STAT sur la chromatine joue aussi sur la longévité (je n'entre pas dans les détails de la signification des différentes mutations qui permettent de séparer une action canonique d'une action non canonique). Pour en revenir à HP1, la même **DIA V.30** montre – par-delà la longévité – le rôle de HP1 dans le comportement moteur et l'intégrité des muscles.

La question alors se pose du rôle de l'hétérochromatine dans la longévité. On peut à juste titre inférer de ce qui précède que l'hétérochromatine diminue,



ce qui est d'ailleurs observé – on s'en souvient peut-être – dans les cas de *progeria* (mutation de la Lamin A). La **DIA V.31** illustre la modification du marquage HP1 au niveau des « chromocenters » (régions denses en hétérochromatine et marqué par H3K9me3) au cours du vieillissement (entérocytes de l'épithélium intestinal). HP1 est recruté par association à H3K9me2/3 et il est clair (voir en B) que le niveau de H3K9me2 diminue avec l'âge (pas celui de HP1). L'expérience suivante consiste en une immunoprécipitation de la chromatine avec un anti-HP1 et l'identification de *1360* (élément transposable enrichi dans l'hétérochromatine) mais pas celle de *rp49* (gène contrôle d'une protéine ribosomale qui n'est pas encodée dans l'hétérochromatine). Les résultats parlent d'eux-mêmes pour indiquer qu'avec l'âge, à moins d'être surexprimé, HP1 se détache de l'hétérochromatine (elle est exprimée mais ne descend plus *1360*). Cette perte d'hétérochromatine est associée à une augmentation de gènes encodés dans cette structure. La mouche *DX1* a le gène *LacZ* associé au locus *white* normalement réprimé. La **DIA V.31** démontre que l'expression de β -Gal augmente avec l'âge (en D et E).

La suite concerne la stabilité du nucléole, structure dont nous venons de constater l'importance. La figure A de la **DIA V.32** montre des marquages de la fibrillarin (un marqueur nucléolaire) dans différentes conditions altérant ou solidifiant, l'hétérochromatine. Il est clair dans ces données quantifiées que la fragmentation des nucléoles augmente dans les conditions diminuant l'hétérochromatine et diminue encore plus dans les conditions qui augmentent le niveau de structuration de l'hétérochromatine (hs-HP1). Cette perte d'hétérochromatine s'accompagne d'une dérégulation des séquences répétées de l'ARN ribosomal et de la formation de DNA circulaire extra-chromosomale (ECC) comme on peut la voir dans la partie B. Je rappelle ici que, chez la levure, cette anomalie s'accompagne d'un vieillissement, à mettre en relation avec le vieillissement prématuré des mouches.

Finalement, les auteurs se sont intéressés aux

modifications transcriptionnelles liées à l'altération de la structure nucléolaire. Une grande partie des gènes ribosomaux sont normalement silencieux. On peut suivre cette répression par celle d'une classe de transposons, les éléments R2 insérés dans la région 28S du précurseur de l'ARN ribosomal. La **DIA V.33** illustre cette perte de répression de la transcription dans le mutant suppresseur de variéation (perte de l'hétérochromatine) et l'effet inverse dans le cas de la surexpression de HP1 (gain de l'hétérochromatine). Une augmentation de l'ARN ribosomal s'accompagne d'une augmentation de la synthèse des protéines qui peut se traduire par une modification de la taille et du poids des organismes. La partie droite de cette **DIA V.32** illustre l'augmentation de taille et de poids qui accompagne la perte d'hétérochromatine et le vieillissement accéléré de l'animal.