



6 octobre 2014

## Introduction générale à la question de la longévité

La question de la longévité doit être abordée dans la problématique d'une instabilité et d'un renouvellement permanent des structures vivantes qui opèrent aux niveaux moléculaires et cellulaires. À quoi il faut ajouter une évolution des individus modifiés dans la structure de leur chromatine, celle aussi de leurs réseaux de neurones. Cette individualisation souligne la part d'adaptation incluse dans le « vieillissement » et distingue les organismes qui ont une mémoire – donc une histoire – de ceux qui vivent dans le présent immédiat.

Dans une approche de la longévité qui repose sur le renouvellement de (et/ou) l'évolution des structures, nous distinguons les organes qui sont l'objet d'un renouvellement cellulaire continu (l'intestin, la peau ou le système hématopoïétique, etc.) de ceux qui ne sont que partiellement renouvelés comme le cerveau. Cet organe, en effet, est un mélange de neurones post-mitotiques et de neurones qui se renouvellent à partir de cellules souches, sans parler des cellules gliales, macrophages et cellules endothéliales vasculaires.

Nous reviendrons donc sur l'ambiguïté du terme « vieillissement » selon qu'il est adaptatif ou pathologique, parfois les deux. L'année dernière, nous sommes partis de l'article de Lopez-Otin et collègues (**DIA I.2**) définissant le vieillissement, comme déclin fonctionnel. Les auteurs proposent neuf marqueurs du vieillissement et nous avons discuté certains d'entre eux. Je vais brièvement résumer cette discussion aujourd'hui avant de passer à la suite. Ces 9 marqueurs sont :

- 1) l'instabilité génomique ;
- 2) le raccourcissement des télomères ;
- 3) les altérations épigénétiques ;
- 4) les atteintes à l'équilibre protéique (protéostasis) ;
- 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.

Les interactions entre les neuf marqueurs sont déclinables à l'infini – par exemple, le verrouillage de l'instabilité par des modifications épigénétiques ou encore, le raccourcissement des télomères qui, à travers la cassure de l'ADN double brin, participe à l'épuisement des cellules souches et génère de l'instabilité. Elles sont bénéfiques tant qu'elles maintiennent le système dans les bornes de la physiologie normale. La longévité c'est donc la physiologie, et les pathologies de cette longévité doivent se comprendre à partir de la physiologie.

## Cassures double brin et chromatine

En 2009, j'avais suggéré qu'une trop grande activité cérébrale pourrait créer des lésions (« On pense trop et ça fait des trous ! »). (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) donnent du poids à cette idée (**DIA I.3**). Les auteurs rappellent que les lésions de l'ADN neuronal contribuent au vieillissement cognitif. Certains neurones ont notre âge et leur ADN a subi de nombreuses lésions, plus ou moins bien réparées pour nombre d'entre elles, le mécanisme impliqué – raboutage des brins non homologues (NHEJ) – introduisant des erreurs, donc des mutations. Le vieillissement neuronal s'accompagne d'une augmentation du nombre de cassures identifiées par des marqueurs de cassures, dont l'histone H2A phosphorylée sur la Sérine 139 (gH2AX) qui marque spécifiquement les cassures double brin (DSB).

L'exploration d'un nouvel environnement provoque chez les souris une forte activité cérébrale (**DIA I.4**). Ce comportement naturel augmente les DSB dans l'ADN de régions spécifiques du cerveau. À partir d'un modèle murin de la maladie d'Alzheimer (souris J20), ils ont observé la même augmen-



tation des DSB que chez les souris sauvages (WT), en particulier dans le gyrus denté (hippocampe), mais le retour à la normale observé 24 heures plus tard chez les WT ne se fait pas, ou mal, chez les J20.

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

Ce qui nous a amené à la réparation de l'ADN et, plus largement, à l'instabilité génomique. Nous ne reviendrons pas dessus en détail. Rappelons, pour commencer, la différence entre la réparation de l'ADN chez les cellules en division et les cellules post-mitotiques. Pour la partie neurale du système nerveux adulte, cela veut dire distinguer les cellules souches et les progéniteurs (zone subventriculaire (SVZ) du gyrus denté (DG) des neurones matures. Pour les neurones, les réparations mobilisées doivent permettre d'échapper à la mort ou à une sénescence trop pathologique.

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), ce qui peut conduire à la formation d'environ 100 000 lésions par cellule et par jour dans le génome des mammifères. Ces lésions sont très diverses incluant mutations ponctuelles, oxydations de l'ADN, cassures créées par les rayonnements, translocations et intégrations de virus ou de transposons. Si ces modifications ne sont pas réparées, les altérations s'installent et qui peuvent induire des mutations (substitution de bases, petites insertions et délétions, réarrange-

ments chromosomiques plus importants, etc.). C'est en partie inévitable et, au cours du temps, l'accumulation de ces lésions est à l'origine de cancers et contribue au vieillissement cognitif.

Je parlerai plus tard de l'ADN mitochondrial que nous avons mis de côté en 2013. Ces mutations sont facilitées par un environnement riche en molécules oxydantes (phosphorylation oxydative et synthèse d'ATP) et par l'absence d'histones qui peuvent jouer un rôle protecteur. Elles sont impliquées dans de nombreuses pathologies et dans le vieillissement, 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). 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 sont en adéquation avec la complexité des *DNA Damage Response* (DDR). 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. Dans ce rappel, je me limiterai aux DSB (**DIA I.5**), renvoyant au cours complet publié sur le site du Collège de France pour les autres types de cassure.

Les DSB représentent la catégorie la plus importante et la plus délétère des lésions de l'ADN. Elles s'accompagnent d'une instabilité du génome et activent les mécanismes de mort cellulaire. Souvent induites par les radicaux oxygénés (ROS) produits du métabolisme mitochondrial, les DSB interviennent aussi dans des processus physiologiques normaux, comme la recombinaison au cours de la génération des immunoglobulines, ou de la méiose. Il n'existe que deux systèmes de réparation (**DIA I.5 et I.6**) : la recombinaison homologue (HR) et le *Non Homologous End Joining* (NHEJ). La HR nécessite



la copie d'une séquence homologue sur l'autre chromatide. Elle fait donc peu d'erreurs, mais ne peut opérer que dans les cellules en division, en phase S et G2 (synthèse d'ADN) alors que NHEJ, simple raboutage des extrémités brisées, peut intervenir à toutes les étapes du cycle cellulaire et dans les cellules post-mitotiques, mais est prône aux erreurs.

La chromatine (l'ADN et son habillage) joue un rôle dans la réparation. Les cellules des mammifères contiennent plusieurs structures chromatinienne, par exemple les régions actives de l'euchromatine, les télomères, les régions intergéniques, les fourches de réplication, les régions compactes de l'hétérochromatine pauvres en transcription. Ces régions se distinguent toutes par des patterns d'histones différents, avec des histones spécifiques ou des variétés de protéines qui se fixent à la chromatine.

Le nucléosome (**DIA I.7**), unité de base de la chromatine, est composé de 147 nucléotides enroulés autour d'un octamère d'histones (2 dimères H3-H4 et 2 dimères H2A-H2B). Les queues N-terminales des histones sont riches en lysines qui peuvent être modifiées (acétylation, méthylation, ubiquitination) ce qui change leurs propriétés (structure de la chromatine, interaction avec d'autres partenaires protéiques). L'organisation de la chromatine peut aussi être modifiée par des complexes multiprotéiques organisés autour d'une ATPase dont l'activité fournit l'énergie nécessaire pour déplacer le nucléosome et donner ainsi accès à l'ADN.

La structure de la chromatine influence la nature des gènes exprimés. Elle a donc une fonction épigénétique qui prend en compte une mémoire du neurone. Cette structure joue aussi sur la réparation de l'ADN en régulant son accès. Le modèle *access-repair-restore* rappelle qu'il faut détecter les cassures dans les différentes architectures de la chromatine et modifier ces architectures locales pour que les enzymes de réparation aient accès à l'ADN et le réparent.

Une fois formé le DBS, un complexe MRN composé de trois protéines (Mre11, Rad50 et Nbs1) est amené au site de lésion où il recrute et active la kinase ATM (mutée dans *ataxia telangiectasia*). ATM activée phosphoryle des centaines de protéines dont des protéines de réparation de l'ADN comme BRCA1 actif dans la HR et 53BP1 actif dans la NHEJ (**DIA I.7**). Une cible importante d'ATM est H2AX, dont la forme phosphorylée gH2AX crée un site d'ancrage pour la protéine MDC1 ce qui permet de recruter des complexes MRN/ATM additionnels et contribue à l'amplification du recrutement du système de réparation.

Je renvoie de nouveau au cours de 2013 pour rappeler l'existence d'un très grand nombre d'acteurs moléculaires et de modifications qui touchent de grandes parties de la chromatine (plusieurs millions de bases parfois) dont la structure tridimensionnelle s'en trouve remodelée. Au-delà des mutations qui touchent les enzymes de réparation et sont parfois à l'origine de maladies génétiques, une cassure locale de l'ADN peut induire des modifications de la structure de la chromatine sur une longue distance. Par-delà les mutations ponctuelles qui sont à l'origine de maladies génétiques, la chromatine est donc un modulateur du processus de vieillissement.

O'Sullivan et Karlseder (*TIBS*, 37 : 466-476) soulèvent ce point en rappelant qu'une des caractéristiques du vieillissement est la perte des systèmes de régulation homéostatiques qui permettent de compenser les lésions créées par des doses légères d'agents toxiques, que ces agents soient extrinsèques ou intrinsèques (**DIA I.7**). Les acteurs essentiels du stress de la chromatine augmentent avec l'âge (ROS, lésions de l'ADN, stress réplcatif, bruit transcriptionnel, altération de la chromatine), et – à l'inverse – les processus régulateurs diminuent avec l'âge (métabolisme, longueur des télomères, hétérochromatine et histones, modificateurs de la chromatine).



Un exemple de dérégulation de l'hétérochromatine responsable de vieillissement est le syndrome HGPS (*Hutchison-Gilford Progeria Syndrom*) qui se manifeste par un vieillissement accéléré et une mort avant la deuxième décennie liée, souvent, à une défaillance cardiaque. HGPS est causé par une forte détérioration de l'enveloppe nucléaire due à une mutation dans le gène de la Lamin A (LMNA). Les lamins (**DIA I.8**) sont des protéines nucléaires qui participent au maintien de la structure nucléaire et ont aussi un rôle de signalisation.

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

De nombreuses protéines impliquées dans la réparation des DSB sont directement associées à des ncRNA (par exemple p53BP1 ou le complexe Ku). À l'inverse, les DSB peuvent réguler l'expression de ncRNA. Il est bien démontré que les lésions de l'ADN induisent l'expression de miRNA (régulateurs de la traduction des mRNAs), mais ces changements d'expression dépendent du type de dommage et de l'intensité du dommage. Indépendamment de cette variabilité, il semble que l'initiation de la DDR est en partie régulée par

des modifications après DD de l'expression de miRNA spécifiques.

## ARN non codants et transposition

Continuons sur le thème des ARN non codants en nous concentrant sur les piRNA qui régulent l'expression des rétrotransposons (**DIA I.9**). Rappelons que les éléments transposables constituent de 45 % du génome humain. Ces séquences, distribuées en sous-types distincts peuvent sauter d'une région du génome à une autre et y inscrire des modifications irréversibles. Les transposons de la famille des LINEs sont transcrits sous la forme d'un ARN polycistronique qui code pour deux protéines ORF1 et ORF2. ORF1 a une fonction packaging protégeant le transcrit et permet le transport de cette particule dans le noyau. ORF2 porte deux fonctions, une fonction de transcription réverse (je refais un ADN à partir de l'ARN) et une fonction endonucléase qui coupe un brin d'ADN. À la suite de ces deux événements le nouveau fragment d'ADN est inséré au site de coupure, ce qui amplifie l'élément transposable et introduit éventuellement une mutation. ORF1 et ORF2 peuvent aider à la mobilisation d'une autre classe d'éléments transposables : les SINEs qui, quand ils sont transcrits, ont besoin de ORF1 et ORF2 des LINEs pour se réintégrer dans le génome, agissant ainsi en parasites des LINEs.

Les LINEs sont pour la plupart fossilisés, ce qui veut dire que des mutations les empêchent de sauter, même si leur transcription, sans réinsertion, peut avoir une action régulatrice de l'expression génétique. On estime le nombre de LINEs sauteurs à 100 chez *sapiens* et 3 000 chez la souris. Finalement, on rappellera que la transcription des LINEs est sous le contrôle répresseur du complexe Piwi-piRNA, PIWI étant une protéine qui fixe un petit ARN double brin non codant piRNA et réprime la transcription des LINEs en se fixant à HP1. Ce dernier point signifie que les piRNAs liés à PIWI (famille Argonaute) empêchent la transposition, mais surtout, qu'une inactivation du complexe PIWI/piRNA libère l'ex-



pression des LINEs au niveau de l'hétérochromatine avec les conséquences attendues sur l'expression génétique et la stabilité – alors compromise – des génomes.

Comme neurobiologistes, nous sommes plus intéressés ici par la régulation somatique que par ce qui se passe dans les cellules germinales dont on pensait qu'elles étaient les seules à abriter une activité de rétrotransposition. Des données récentes suggèrent que les piRNAs régulent l'expression de CREB2 dans les neurones d'Aplysie avec un effet sur la mémoire à long terme. Ces données sont à mettre en regard de la forte concentration du système nerveux (75 000 séquences dans l'hippocampe) en structure piRNA-like (une uridine en 5' et une adénosine en position 10, plus une méthylation en position 3'). Même si ce nombre global est de 10 à 100 fois inférieur à celui des transcrits piRNA dans les gonades, cela n'empêche pas de nombreux auteurs à s'intéresser au lien possible entre LINEs, cassures de l'ADN et vieillissement du système nerveux.

St. Laurent III *et al.* (*Mechanisms of Ageing and Development*, 131 : 299-305, 2010) replacent la transposition dans le contexte de la longévité. Ils rappellent que le vieillissement constitue un facteur de risque pour les maladies les plus graves et que cela est en partie dû à l'accumulation des lésions de l'ADN et, aussi, à des altérations plus globales de la structure de la chromatine. Ceci est particulièrement intéressant quand on considère que nombre des maladies neurodégénératives – Alzheimer, Parkinson ou Huntington –, même quand elles sont d'origine génétique pure, ne se déclarent pas avant un âge relativement avancé, ce qui confirme que le vieillissement est un véritable facteur de risque.

Parmi les éléments endogènes qui altèrent l'intégrité des génomes, pouvons-nous inclure les rétroéléments ? Les SINEs étant mobilisés par les LINEs dont ils sont les parasites, on s'en tiendra aux LINEs tout en gardant en tête que LINEs et SINEs sont liés. Le transcrit peut être soit complet, le mes-

sager bicistronique encodant ORF1 et ORF2, soit limité à ORF2. Dans les deux cas, la transcription de ORF2 est suffisante pour générer des cassures double brin (ORF2 est une endonucléase), ce qui est, ou non, suivi de l'insertion d'un transposon (**DIA I. 10**).

On comprend alors l'abondance des mécanismes de contrôle de l'expression des éléments transposables. Tout d'abord, la régulation épigénétique de leur expression et la formation de l'hétérochromatine. La méthylation de l'ADN joue un rôle important et la mesure de cette méthylation au niveau des promoteurs de L1 révèle entre 20 et 100 % de méthylation sur des CpG. Le niveau de méthylation peut s'affaiblir avec l'âge, par exemple à travers l'oxydation des CpG. Un autre mécanisme de régulation est la polyadénylation prématurée à l'intérieur d'un transcrit codant. Cette polyadénylation prématurée fait que les enzymes encodées par ORF2 (endonucléase et reverse transcriptase) ne sont pas fonctionnelles, empêchant la « prolifération » du transposon. À ces deux mécanismes de contrôle, on peut ajouter les antisens endogènes et l'interférence ARN. L'hybridation entre le sens et l'antisens génère des ARN interférentiels, des miRNA et des piRNA qui ont une activité répressive dont une des modalités d'action passe par un renforcement de la méthylation des promoteurs des LINEs.

Je renvoie à l'année dernière en ce qui concerne le rôle des piRNA dans les modulations épigénétiques physiologiques (*Rajasethupathy et al.*, *Cell* 149 : 693-707, 2012), pour vous remettre en mémoire des articles en lien avec le vieillissement (**DIA I.11**). Li *et al.* (*Nature Neurosci.* 16 : 529-532, 2013) ont examiné l'expression des transposons dans le cerveau, tout particulièrement les *mushroom bodies*, au cours du vieillissement normal des drosophiles. Les *mushroom bodies* sont impliqués dans l'apprentissage et la mémoire chez les insectes. Les éléments choisis sont R1 et R2 qui appartiennent à la famille des LINEs et gypsy, de la famille des transposons à LTR (des rétrovirus



domestiqués qui constituent chez *sapiens* 8 % du génome, contre 17 % pour les LINEs). Le résultat de cette étude est qu'on observe une augmentation de ces transcrits au cours du vieillissement et de l'expression de la protéine ENV (glycoprotéine d'enveloppe) encodée par gypsy. Cette expression tardive s'accompagne d'une capacité de réintégration dans les *mushroom bodies*. Donc, la rétrotransposition augmente avec l'âge.

Ago2 (Argonaute 2) est la protéine de la famille PIWI qui réprime la rétrotransposition dans les tissus adultes. D'où l'utilisation de mutants de Ago2 pour comprendre le rôle éventuel de ces transpositions dans le processus de vieillissement. R1, R2 et gypsy augmentent avec l'âge. La mutation 51B dans Ago2 augmente la transcription de R2 et de gypsy, la mutation 414 ayant un effet faible sur R2 mais fort sur gypsy. Sur le plan comportemental, on observe une absence de déclin comportemental entre le jeune et l'âgé dans la situation WT, avec une diminution chez les deux dans le mutant 414, mais beaucoup plus forte chez l'âgé. La survie de la *Drosophile* diminue significativement chez les mutants. Ces expériences démontrent que la dérégulation de la rétrotransposition a un effet délétère sur les performances cognitives des vieilles mouches (qui meurent d'ailleurs plus tôt chez les mutants).

Ce même groupe a aussi travaillé 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 spécifiques a été observée dans plusieurs désordres de type neurodégénératif, les auteurs ont démontré que nombre des transcrits de TE se lient à une *RNA-binding protein* appelée TAR *DNA-binding protein* 43 (TDP-43). D'où les hypothèses 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 la dégénérescence fronto-temporale (FTLD) et l'AD.

Les auteurs ont repris les données publiées sur les ARN immunoprécipités avec un anti TDP-43 (rat et humain) et trouvé un enrichissement spectaculaire en séquences dérivées de chaque classe de TE. En comparant humains sains et humains FTLD, ils ont constaté un enrichissement presque général chez les individus malades. Ces résultats suggèrent chez les patients une diminution de la régulation des TE.

### Architecture du noyau et instabilité génétique

Commençons avec les lamines nucléaires déjà introduites. Elles appartiennent à la classe des filaments intermédiaires (cytosquelette cellulaire) et constituent un échafaudage auquel s'accrochent la chromatine et d'autres protéines jouant un rôle important dans la stabilité du génome (**DIA I. 12**). Des mutations dans les lamines ou des facteurs permettant leur maturation sont à l'origine de syndromes de vieillissement précoce et des changements d'expression de lamines (lamins A/C et lamin B1/B2) ont été observés au cours du vieillissement cellulaire (Burke & Stewart, *Nature Reviews MCB*, 14 : 13-24, 2013).

L'enveloppe nucléaire sépare le noyau du cytoplasme et régule le trafic nucléocytoplasmique via, en particulier, les complexes formant les pores nucléaires (NPC). Cette enveloppe a aussi une fonction d'ancrage du noyau dans la cellule et d'ancrage de la chromatine dans le noyau, tout particulièrement l'hétérochromatine enrichie en gènes silencieux à la périphérie du noyau, en contact avec l'échafaudage des lamines. Notons aussi la présence du récepteur à la lamine B (LBR) qui interagit directement avec HP1 (hétérochromatine Protéine 1).

Les lamines ont une fonction essentiellement structurelle qui se fait sentir au niveau de l'organisation de la chromatine et dans plusieurs fonctions nucléaires, dont la transcription et la réplication. Leur lien avec le cytosquelette suggère aussi une implication dans la signalisation entre cytoplasme



et noyau. L'expression des lamines B est ubiquitaire (partagée par toutes les cellules), ce qui n'est pas le cas des lamines A.

Nous avons rappelé plus haut la mutation de la Lamin A à l'origine du syndrome Hutchinson-Gilford Progeria (HGPS), maladie marquée par un vieillissement précoce et une mort avant la fin de la deuxième décennie. Cette mutation qui induit l'élimination de 50 acides aminés dans la région C-terminale se traduit par des défauts de prolifération cellulaire et une augmentation des lésions de l'ADN. Cette forme courte de la lamine est appelée Progerin. Son expression interfère avec la progression mitotique et induit une ségrégation anormale des chromosomes ainsi qu'une instabilité du génome.

La Progerin ne se trouve pas 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 et 97 ans avec une augmentation d'environ 3.5 % par an. Elle s'accumule dans tous les tissus et constitue un excellent marqueur biologique du vieillissement humain. 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 (défaut de DDR).

Ce défaut de DDR corrèle avec l'accumulation de Progerin. Le noyau des souris mutantes accumule  $\gamma$ H2AX et présente un pattern anormal de méthylation de H3 et H4, plus une augmentation de HP1. On note aussi une augmentation d'ATM, ATR, p53 et des kinases de checkpoint. 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. Pour résumer, 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.

De fait, il existe de nombreuses indications d'un lien entre une lamina dysfonctionnelle et une modification pathologique des mécanismes redox (**DIA I.13**). Les lamins agissent comme des tampons contre les ROS. Mais trop de ROS conduit à une lamina dysfonctionnelle. Cette dysfonction peut avoir de fortes conséquences sur la connexion mécanique entre le noyau et le cytoplasme avec les conséquences sur la signalisation nucléocytoplasmique, la division cellulaire et la migration. 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.

Des études récentes décrivent 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 étonnant que la longévité soit associée à des altérations de modifications post-traductionnelles des histones. Chez la souris, par exemple, la sirtuine SIRT6 régule la longévité 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 ».

Pour terminer sur la lamine B1, son expression est fortement réprimée au cours de la sénescence, au point de devenir quasiment indétectable. Shah et collègues (*Genes and Dev.* 27 : 1787-1799, 2013) ont aussi observé une baisse des niveaux d'expression d'autres protéines interagissant avec les lamines ou participant à l'organisation de la chromatine. En fait, la perte de lamin B1 a exacte-



ment le même effet que celle de EZH2 (H3K27me3 méthylase), ce qui lie la sénescence avec une dérégulation transcriptionnelle. En conclusion, la sénescence cellulaire s'accompagne d'une profonde réorganisation de l'épigénome et cette réorganisation est étroitement associée à des altérations des domaines associés aux lamines. 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.

### Raccourcissement des télomères

Les télomères à l'extrémité des chromosomes linéaires sont constitués de séquences répétées protégées par des protéines spécifiques. Chez *sapiens*, la séquence télomérique TTAGGG est répétée sur plusieurs milliers de bases (10 kb dans le sang du cordon ombilical, soit plus de 1 500 répétitions de la séquence de base). Les complexes protéiques constituent la *shelterin* (de *shelter* ou abri) ; leur rôle est d'éviter que les télomères ne soient reconnus comme de l'ADN cassé. Comme la machinerie de réplication ne peut aller jusqu'au bout du chromosome (et encore moins au-delà) la fin de l'ADN ne peut être copiée et, à chaque division, le télomère diminue de taille. La taille des télomères constitue donc une horloge moléculaire et au bout d'un certain nombre de divisions, les cellules entrent en sénescence. Il existe cependant un mécanisme de compensation qui repose sur la télomérase, une enzyme dont la fonction est de rallonger les télomères.

Dans les années 1990, les télomères ont été considérés dans le contexte des pathologies, en particulier le cancer, puisque l'activité de la télomérase est augmentée dans la plupart des cancers. De ce fait, les cellules tumorales peuvent se multiplier indéfiniment alors que, normalement, les cellules devraient entrer en sénescence et apoptose assez rapidement après un certain nombre de divisions. Aujourd'hui, les nombreuses maladies expliquées

par un problème de télomères sont regroupées toutes sous le terme de *telomere syndromes*. Ces syndromes sont prioritairement associés à l'âge et marquées par un vieillissement prématuré.

Pour revenir à la structure des télomères, la *shelterin* qui recouvre la séquence TTAGGG répétée plusieurs fois inclut, chez *sapiens*, 6 protéines (**DIA I.14**) :

- telomere repeat binding factor 1 (TRF1) ;
- telomere repeat binding factor 2 (TRF2) ;
- repressor/activator protein 1 (RAP1) ;
- TRF1-interacting nuclear protein 2 (TIN2) ;
- TIN2-interacting protein (TPP1) ;
- protection of telomeres 1 (POT1).

Ces protéines protègent l'extrémité du chromosome, l'empêchent de déclencher la DDR (*DNA Damage Response*), de subir une dégradation ou de participer à des événements comme la fusion de deux chromosomes. À ce complexe s'ajoute un autre complexe CST qui comprend trois protéines le *Conserved telomere protection component 1* (CTC1), le *Suppressor of cdc thirteen 1* (STN1) et *Telomeric pathway with STN1* (TEN1).

La télomérase a deux composantes très conservées, la télomérase elle-même ou TERT qui a une activité *transcriptase reverse* (faire de l'ADN à partir de l'ARN) et un composant ARN, TR ou TERC, qui fournit le substrat à copier par la *transcriptase reverse*. Ces complexes ribonucléoprotéiques sont présents dans une structure nucléaire appelée corps de Cajal (*Cajal bodies*). D'autres protéines, dont le rôle est moins important, sont associées à ce complexe, le tout stabilisant l'ARN et nécessaire à l'activité *transcriptase reverse*.

À chaque cycle cellulaire, les télomérases allongent les télomères les plus courts et tous les télomères ne sont donc pas allongés de façon égale. Ce sont les télomères les plus courts qui déclenchent la réponse de la télomérase et pas la moyenne des longueurs des télomères dans une cellule. Même dans les cellules très riches en télomérase, comme les cellules souches



hématopoïétiques, les télomères raccourcissent à chaque division. Une exception notable est celle des cellules souches germinales mâles humaines chez lesquelles on peut observer une stabilité, voire un allongement des télomères avec l'âge.

Les maladies liées au raccourcissement des télomères sont divisées entre les tissus à renouvellement rapide et les tissus à renouvellement lent. Les désordres des tissus à renouvellement rapide apparaissent plus tôt avec des formes plus sévères. Évidemment, plus une cellule se divise plus elle raccourcit ses télomères et donc plus elle est dépendante de l'activité télomérase. Les cellules souches, ou plutôt leur compartiment d'amplification, sont en première ligne quand il s'agit de longévité.

Dans ce contexte, nous nous sommes attardés sur les pathologies en relation avec les cellules souches neurales. La neurogenèse adulte chez les humains concerne en premier lieu l'hippocampe, structure impliquée dans nombre de fonctions cognitives. Ce renouvellement modulable par le comportement se poursuit chez l'adulte et a été quantifié par le groupe de Jonas Frisén (*Spalding et al., Cell* 153 : 1219-1227, 2013). Contrairement à ce qu'on observe chez les rats ou les souris, chez qui la neurogenèse décline avec l'âge, l'hippocampe humain génère des neurones du gyrus denté à un taux relativement constant jusqu'à des âges avancés et tous les neurones de cette structure sont sujets au renouvellement, pas seulement une sous population. Les mesures et leur modélisation suggèrent que 700 cellules sont renouvelées par an, soit un *turnover* de 1,75 % avec un déclin modeste au cours du vieillissement.

Cette constatation réconfortante nous rappelle que ce qui est vrai pour l'humain ne l'est pas forcément pour la souris, et réciproquement. C'est une donnée qu'il faut toujours avoir en tête dès lors qu'on s'intéresse aux pathologies proprement humaines dont l'étude se fonde sur des modèles animaux. Ce qui est le cas pour le premier article, puisque nous nous penchons sur un modèle murin

de schizophrénie avec tous les *caveat* imaginables. Le premier article (*Wolf et al., Brain, Behavior, and Immunity* 25 : 971-980, 2011) part d'un modèle murin fondé sur l'injection de poly rI:C pendant la gestation (induction d'une inflammation maternelle touchant l'embryon). Les auteurs partent de l'observation de changements positifs dans les symptômes de patients à la suite de programmes d'exercices physiques. Ils spéculent aussi à partir de papiers théoriques liant certains symptômes de la maladie à la physiologie de l'hippocampe et à la neurogenèse adulte dans l'hippocampe et proposent qu'un raccourcissement des télomères dans les NPC (*Neural Precursor Cells*) pourrait avoir un rôle dans la maladie.

La télomérase (TERT) est fortement exprimée dans les NPC au cours du développement et chez l'adulte (chez les rongeurs). Chez les souris déficientes en TERT, les télomères raccourcissent avec l'âge et la neurogenèse est interrompue dans les NPC de la zone subventriculaire. Parallèlement, les comportements qui dépendent de la neurogenèse, y compris de celle qui a lieu dans l'hippocampe, sont affectés. Les animaux ont été soumis à un test de course volontaire sur la roue, au test de *pre-pulse inhibition* (un léger signal diminue la réponse de sursaut à un signal plus fort et ultérieur de 30 à 500 msec). La baisse de l'inhibition (utilisée comme un des tests du phénotype schizophrénie) qu'on observe après PolyI:C est effacé par l'exercice physique. Le phénotype de désorientation et d'hyperactivité (mesuré le nombre de redressements) est aussi corrigé par l'exercice physique.

Les auteurs ont mesuré la neurogenèse au niveau de l'hippocampe. Ils ont déterminé le nombre et le phénotype des cellules nouvellement générées 4 semaines après la dernière injection de BrdU et à la fin de la période de course (10 jours de course volontaire). On constate une baisse du nombre des cellules en prolifération chez les animaux « malades » et une restauration par la course. Un autre effet intéressant concerne la maturation des cellules. En effet, le poly I:C a un effet surtout



sur les cellules DCX et NeuN (pas sur les cellules nestin) (**DIA I. 15**), donc un effet sur la maturation des cellules générées, et/ou leur survie.

La longueur des télomères et l'activité TERT ont été mesurées sur des cellules exprimant DCX, neuroblastes en division tardive. L'activité TERT entre le premier et le 60<sup>e</sup> jour post-natal baisse chez les animaux contrôles et chez les animaux poly I:C avec une légère restauration liée à l'exercice physique. Si on regarde à P60 la longueur des télomères par hybridation *in situ*, on constate une diminution de la longueur des télomères, sans effet de l'exercice sur cette diminution ce qui suggère que l'augmentation faible de l'activité TERT n'est pas suffisante, ou que cette augmentation touche seulement quelques télomères (les plus courts) et que cela n'est pas mesurable même si les effets de ce rallongement limité sont bénéfiques.

Finissons ce rappel par des articles de 2004 et 2009 sur les cellules de la zone subventriculaire. Chez la souris, ces cellules contribuent au renouvellement des cellules periglomérulaires et des cellules des grains du bulbe olfactif. Les cellules souches expriment un marqueur astroglial, la GFAP et des facteurs de transcription spécifiques comme Sox2 et Pax6. Comme toutes les cellules souches, elles se divisent lentement ce qui peut préserver leurs télomères, mais elles sont amplifiées au niveau d'un compartiment d'amplification synonyme d'un raccourcissement important des télomères. Les neuroblastes, qui continuent de se diviser, poursuivent cette action de réduction jusqu'à ce qu'on passe à un neurone post-mitotique avec une stabilité de la taille des télomères, mais aussi, nécessairement, avec des inégalités entre neurones, ce qui aura des conséquences fonctionnelles si les télomères jouent un rôle dans la différenciation des neurones.

L'article de Ferron *et al.* (*J. Neurosci.* 29 : 14394-14407, 2009) met l'accent sur la différenciation des neurones ayant de petits télomères et sur le « trouble » que cela peut induire, même si ces neurones n'en meurent pas mais « naissent vieux ». Dans un article plus ancien (Ferron *et al.*, *Development*

131 : 4059-4070, 2004), le même groupe décrit le rôle du raccourcissement des télomères dans la neurogenèse adulte. Les souris mutantes pour TERC (*Terc* *-/-*) sont viables et se reproduisent mais, du fait de la perte d'environ 5kb de télomère par génération, la survie diminue au fil des générations avec des instabilités cytogénétiques importantes. On peut travailler jusqu'à la génération 4 (G4). La prolifération au niveau de la SVZ est fortement réduite chez les souris G4 comme l'est le nombre de progéniteurs (PSA-NCAM ou DCX). On note aussi une atrophie du bulbe olfactif (**DIA I.16**). Les cellules adultes de la SVZ de souris G4 âgées ont une prolifération très diminuée. Il n'en va pas de même pour les cellules de souris embryonnaires (E14,5) qui semblent normales. Cela s'explique par le fait que les cellules adultes sont passées par un grand nombre de divisions et que leurs télomères en sont encore plus raccourcis que chez l'embryon.

Dans ces cellules, la longueur des télomères n'est pas homogène et chez les souris sauvages, elle diminue (en moyenne) entre l'embryon et l'adulte. Chez les mutants, la longueur de leurs télomères est diminuée aux deux stades embryonnaire et adulte, et les télomères de l'adulte muté sont plus courts que ceux de l'embryon. Cette différence explique pourquoi les cellules embryonnaires des mutants, contrairement aux cellules adultes, répondent correctement aux conditions permettant la prolifération. En fait, les cellules embryonnaires des mutants ont l'âge télomérique des cellules adultes sauvages.

Le raccourcissement des télomères, au-delà d'un certain seuil, active les voies de signalisation associées avec la lésion de l'ADN. Un des *read-out* de cette voie est l'induction de p53, protéine activée au cours de la sénescence et capable d'induire la sénescence. Les auteurs ont constaté que p53 n'est pas induit chez les cellules de l'embryon (même muté) mais l'est fortement chez les cellules adultes. Cette induction est corrélée avec une perte des capacités prolifératives, donc une entrée en sénescence. En revanche, il ne semble pas que la mutation induise une forte augmentation de la mort cellulaire.



Si c'est bien de fabriquer de nouveaux neurones, encore faut-il que ces neurones se différencient et s'intègrent dans les réseaux neuronaux préexistants. En comparant le marquage BrdU avec les marqueurs (calretinin pour les cellules des grains ou TH pour les cellules periglomérulaires du bulbe olfactif), Ferron *et al.* (*J. Neurosci.* 29 : 14394-14407, 2009) ont observé que la densité de cellules marquées est plus faible chez les souris âgées. Au-delà, les dendrites semblent aussi plus courts à 12 mois qu'à 2 mois (**DIA I.17**).

Parallèlement à ces études morphologiques, les auteurs ont mesuré l'activité de la télomérase dans les régions neurogéniques (en fait, ils ont pris les éminences ganglionnaires et la SVZ) et constaté que cette activité diminue avec le temps. Que l'activité diminue entre E14,5 et P3 n'est pas étonnant puisque les cellules des éminences ganglionnaires deviennent post-mitotiques pendant cette période, mais la diminution entre deux mois et un an a beaucoup plus de sens, car elle suggère une érosion essentiellement au niveau des cellules souches neurales de la SVZ, confirmée par le raccourcissement des télomères.

L'effet sur la différenciation suggère que le raccourcissement des télomères a une fonction indépendante du cycle cellulaire. La possibilité de l'intervention de p53 a donc été avancée, d'autant plus que le pourcentage de cellules ayant du p53 nucléaire passe de 5 à 50 entre le sauvage et le mutant (cellules en culture) et que l'activité de p53 augmente chez les mutants, non seulement dans les cellules en prolifération, mais aussi dans les cellules en cours de différenciation. Cette augmentation de p53 ne s'accompagne ni d'une modification du taux de division (BrdU) ni d'une augmentation à ce stade de la mort cellulaire, ce qui suggère une action directe de p53 sur la formation de dendrites. Ce point a été vérifié sur des neurones du striatum en culture à partir d'embryons (E14,5) normaux ou *p53*<sup>-/-</sup>, et il a été observé que la mutation augmente la dendrogenèse chez les souris normales comme chez les souris G3.

Pour conclure ce bref rappel des points abordés l'année dernière, on proposera que les cellules souches adultes n'ont probablement pas une capacité illimitée de se répliquer sans que cette réplication ne soit marquée par la réduction des télomères. Ce que nous venons de discuter ajoute à cette conclusion que même si ce raccourcissement n'a pas de conséquence sur la survie des cellules souches (parce que le nombre de leurs divisions ne permet pas d'atteindre le seuil critique de sénescence et d'apoptose), les étapes suivantes sont néanmoins rendues plus problématiques. D'une part, il y a le compartiment d'amplification et si l'on amplifie des cellules qui sont déjà raccourcies au niveau de leurs télomères, alors cette amplification peut permettre d'atteindre un seuil critique de sénescence. Ensuite, à supposer que tel ne soit pas le cas et que nous passions la phase d'amplification, les cellules aux télomères raccourcis semblent avoir une certaine difficulté à se différencier de façon satisfaisante, en tout cas pour ce qui est de la taille de leur arborisation dendritique, sans aucun doute avec des conséquences physiologiques une fois que ces cellules se sont intégrées aux réseaux de neurones, si elles le font.

### Radicaux libres

Nous avons terminé sur la dysfonction mitochondriale. On le sait, je n'y reviens pas, notre cerveau est un grand consommateur d'énergie, donc d'ATP. Ce qu'on sait moins est que la synthèse d'ATP s'accompagne toujours de celle de radicaux libres dont la mauvaise réputation n'est plus à faire. Mais elle est un peu injuste dans la mesure où les radicaux libres générés par le métabolisme aérobie ne sont pas forcément toxiques, tout est affaire de dose. La chaîne respiratoire localisée sur la membrane interne de la mitochondrie est le site principal de production des superoxydes, une espèce oxygénée réactive (définition globale des ROS) très abondante (**DIA I.18**). Les superoxydes ( $O_2^-$ ) sont générés au niveau des complexes I et III de la chaîne respiratoire puis, pour une part importante, transformés en  $H_2O_2$  par la



superoxyde dismutase (SOD).  $H_2O_2$  n'est pas toxique en lui-même mais peut le devenir suite à la réaction de Fenton catalysée par les métaux de transition dans la classification de Mendeleïev et la génération de radicaux hydroxyles qui sont les agents les plus réactifs et créateurs de lésions oxydantes touchant lipides, protéines et acides nucléiques.

Bratic & Larsson (*JCI* 123 : 951-957, 2013) discutent le rôle des ROS dans le cadre plus large des mutations mitochondriales, du rôle des ROS mitochondriaux et du lien entre fonction mitochondriale et signalisation. Il existe des preuves solides d'une augmentation du nombre de mutations de l'ADN mitochondrial (mtDNA) avec l'âge. Cela résulte de lésions non réparées de l'ADN, du fait des ROS mais surtout des erreurs qui se produisent au cours de la réplication de l'ADN. Une cellule somatique humaine contient des milliers de copies de mtDNA et les mitochondries se dupliquent sans lien avec le cycle cellulaire. Une même cellule peut contenir des mitochondries distinctes sur le plan génétique (hétéroplasmie) et pour une mutation à effet pathologique, l'apparition de la maladie dépendra des niveaux respectifs des populations saines et « atteintes ». Cette tolérance peut osciller et si certaines pathologies apparaissent dès un seuil de 60 % de mitochondries anormales, d'autres mutations sont plus permissives. Cette distribution inégale des mitochondries bien portantes et « malades » peut varier entre les tissus, voire entre les cellules d'un même tissu.

Pour étudier le rôle de ces mutations dans le vieillissement, des souris ont été produites, dont une sous-unité de la polymérase mitochondriale chargée de la correction des erreurs est déficiente (mtDNA mutator mice). Ces souris « mutator » présentent un grand nombre de phénotypes qui évoquent le vieillissement et ont une durée de vie réduite. L'effet sur le renouvellement des cellules souches est fort, y compris les cellules souches neurales dont la prolifération est diminuée, mais les tissus post-mitotiques sont peu touchés (**DIA I.19**). Le dys-

fonctionnement de la chaîne respiratoire n'apparaît que tardivement et sans qu'on ait pu mesurer, chez ces souris, une forte augmentation des ROS. Sur cette base, les auteurs (Bratic & Larson, *JCI* 123 : 951-957, 2013) mettent en cause une altération métabolique plus large ayant des effets secondaires sur la production énergétique de la mitochondrie ou même sur leur biogenèse. Nous y reviendrons cette année et je me contente d'indiquer que dans plusieurs organismes le métabolisme mitochondrial régule la longévité via le *nutrient sensing pathway* et la restriction calorique. La signalisation par Insuline ou *insulin-like growth factor* (IGF-1), dite signalisation IIS (mesure du glucose) et la signalisation via mTOR (mesure des acides aminés) sont les deux systèmes de mesure des nutriments.

Nous avons fermé le cours par une réhabilitation des ROS à travers une revue de Nathan et Cunningham-Bussel (*Nature Reviews Immunology* 13 : 349-361, 2013). Le terme de ROS dans ce qui suit inclut toutes les espèces oxygénées réactives qui participent à un grand nombre de phénomènes biologiques et qu'il est parfois difficile de séparer ou de quantifier séparément. Il faut encore savoir que les ROS ne sont pas les seules petites molécules réactives et qu'il faut compter avec les espèces azotés ( $NO^*$ ,  $NO_2^*$ ) ou carbonées (CO), ou les sulfures ( $H_2S$ ,  $HS^-$ ) qui ont des effets parfois proches, parfois distincts de ceux des ROS.

Les ROS sont générés par les NADPH oxydases (NOX) au niveau mitochondrial, mais aussi au niveau du réticulum endoplasmique et des membranes plasmiques. La production des ROS est finement régulée à différents niveaux (**DIA I.20**). Les NOX sont des enzymes transmembranaires activées par la fixation à son récepteur d'un ligand comme l'insuline, le PDGF, le NGF, les FGF, en fait un grand nombre de molécules impliquées dans la signalisation. Cette régulation de la concentration en ROS se fait au niveau de leur synthèse et de leur dégradation.

On distingue plusieurs types de cibles des ROS. D'abord les cibles atomiques à travers une liaison



covalente, souvent réversible, avec certains atomes au sein de macromolécules. Ces modifications sont physiologiques et, du fait de la diffusion de ces petites molécules, peuvent toucher plusieurs voies physiologiques qui sont ainsi modifiées de façon synchrone en réponse à l'état métabolique de la cellule. Une des cibles atomiques privilégiées est le sulfure des cystéines et des méthionines que l'on trouve dans les chaînes peptidiques. L'environnement de la méthionine ou de la cystéine est important (les environnements acides sont favorables à l'oxydation), mais d'autres facteurs régulateurs de l'oxydation entrent probablement en jeu. Peu de travaux ont été consacrés à cette question. Parmi les protéines cibles (connues) des ROS, on citera de nombreuses kinases et phosphatases, de nombreux facteurs de transcription, les histones déacétylases, etc.

Au-delà du ciblage d'atomes spécifiques, le soufre, par exemple, les ROS peuvent toucher nombre de macromolécules, au premier rang desquelles l'ADN. Par exemple, les ROS produits par la mitochondrie périnucléaire (**DIA I.21**) peuvent oxyder les résidus guanines au niveau de promoteurs spécifiques et modifier la transcription de gènes régulés par ces promoteurs. Exemple éloquent, l'oxydation d'une guanine dans le promoteur du VEGF (qui va induire un bourgeonnement des vaisseaux et donc une meilleure oxygénation du tissu) stimule la fixation du *Hypoxia-Induced-Factor* et la transcription du gène encodant le VEGF. L'oxydation s'inscrit ici dans une régulation physiologique qui apporte une réponse à une situation d'hypoxie. La cassure de l'ADN qui suit le mécanisme de *Base excision repair* et qui cause la cassure de l'ADN, permet le recrutement d'une topoisomérase qui au cours de la torsion qu'elle impose à l'ADN donne accès à des facteurs de transcription qui initient une réponse aux androgènes ou aux œstrogènes.

Nous avons donc fini 2013 sur une note optimiste, voyons maintenant ce que 2014 nous réserve.