



27 octobre 2014 (IV.1)

Nous avons terminé le cours de la semaine dernière sur les effets bénéfiques du resveratrol, activateur de SIRT1 sur la longévité. Les sirtuins étant ainsi introduites, je vais maintenant élargir le thème à l'ensemble de la famille. Je commence en m'appuyant sur une revue générale (*Choi and Mostoslavsky, Current Opinion in Genetics and Development, 26 : 24-32, 2014*) puis nous passerons au vieillissement général et cérébral. Les sirtuins de mammifères (déacétylase NAD⁺ dépendante) sont au nombre de 7, chacune ayant une localisation cellulaire propre et un rôle physiologique singulier (**DIA IV.2**). Ce qui les lie est donc d'une part la fonction de déacétylation (ce qui suggère que le rôle singulier est déterminé par les cibles et la localisation) et une dépendance au NAD⁺ (**DIA IV.3**), ce qui indique une relation avec le métabolisme énergétique de la cellule. Sur le plan de la localisation, les sirtuins se distribuent entre noyau, cytoplasme et mitochondries avec des formes spécifiquement mitochondriales ou nucléaires.

Ces différentes localisations, même nucléaires, ne sont pas en contradiction avec une liaison au métabolisme puisque ces différents niveaux se trouvent impliqués dans l'ajustement de l'activité métabolique à la disponibilité des nutriments. Par ailleurs – nous l'avons vu –, les sirtuins jouent un rôle dans la réparation de l'ADN, mais comme les cassures de l'ADN sont souvent provoquées par des superoxydes générés par le métabolisme, il n'y a là rien de très logique, même si on peut parler pour ces enzymes d'une fonction duale de régulation du métabolisme et de réparation de l'ADN. La **DIA IV.2** prend cette dualité en compte (rouge pour métabolisme et bleu pour réparation de l'ADN), mais on notera la position de quatre sirtuins à la jonction des deux fonctions.

Pour le métabolisme, je rappellerai que le glucose capturé par les cellules est converti en pyruvate dans le cytoplasme (glycolyse), lequel pyruvate internalisé par les mitochondries entre dans la voie

des acides tricarboxyliques (**DIA IV.3**) et conduit à la formation d'ATP (34-36 moles pour une mole de glucose). Le pyruvate, je viens de le dire, peut aussi être transformé en lactate dans le cytoplasme via la lactate déshydrogénase, avec production de NAD⁺, un mode moins efficace de production d'ATP mais très utile en condition d'hypoxie. Pour ceux qui étaient là les années précédentes, ils se souviennent peut-être de l'importance du lactate fabriqué dans les astrocytes comme source d'énergie pour les neurones du cortex frontal (travail de l'équipe de Pierre Magistretti, **DIA IV.3**), point sur lequel je me suis longuement attardé en 2012 et 2013. Je vais me concentrer essentiellement sur les sirtuins dans la réparation de l'ADN. Je fais l'impasse sur les différentes formes de réparation, qui vous sont désormais familières, (**DIA IV.4**) et passe à SIRT1. SIRT1 joue un rôle dans la recombinaison homologue (cellules en division) en régulant l'activité de plusieurs protéines dont Rad51 (**DIA IV.4**). Elle joue aussi un rôle dans NHEJ via une coopération avec ATM – dont elle prolonge l'activité – et HDAC1, qu'il déacétyle sur les sites des DSB (neurones post-mitotiques). On note aussi une activité NER via la déacétylation et le recrutement de Xeroderma pigmentosum A et C. D'une certaine façon, SIRT6 est assez proche de SIRT1 dans sa double fonction de réparation via les voies RH et la NHEJ. SIRT2, c'est clair dans la **DIA IV.2**, est purement nucléaire et joue un rôle dans la prolifération et la réponse au stress réplicatif (RSR).

Je vais maintenant revenir sur SIRT1 et m'engager à l'aide d'une revue (*Herskovits & Guarente, Neuron 81 : 471-483, 2014*) dans une discussion sur son rôle dans le développement et la sénescence du système nerveux. Les sirtuins ont des fonctions importantes dans l'élongation des axones et le branchement des dendrites, aussi dans la différenciation (lignage) des cellules souches neurales. Dans l'hypothalamus, elles affectent les rythmes circadiens ainsi que les fonctions endocrines et le comportement alimentaire. Chez l'adulte, SIRT1 peut moduler la plasticité synaptique et la mémorisation. SIRT1 a un aussi un rôle positif dans les modèles



animaux de plusieurs maladies neurodégénératives dont les maladies de Parkinson, d'Alzheimer, et de Huntington, plus la sclérose en plaque. Ces observations sont importantes puisque nous disposons de petites molécules naturelles (comme le resveratrol) ou synthétiques qui activent SIRT1, même s'il faut être prudent du fait de possibles effets secondaires de ces molécules (autres cibles).

Cette revue fait un peu catalogue, mais elle a le mérite de souligner le rôle très large de cette enzyme dans la physiologie cérébrale. Un premier aspect est tout simplement cognitif. Sur le plan morphologique, la souris invalidée pour SIRT1 a des neurones dont les dendrites sont plus courts et de moindre complexité. Cela est particulièrement bien observable dans la région CA1 de l'hippocampe qui, je le rappelle, joue un rôle important dans la cognition à travers les axones qu'elle envoie vers le cortex entorhinal, structure importante pour la mémoire déclarative (données que l'on peut rappeler et déclarer verbalement) et riche en plaques amyloïdes chez les malades d'Alzheimer (ces plaques viennent-elles de l'hippocampe, discuter ?) (**DIA IV.5**). Sur le plan génétique, de nombreux gènes importants pour les fonctions synaptiques et métaboliques sont dérégulés chez cette souris, ce qui explique leur moindre plasticité synaptique. L'explication moléculaire actuelle est que SIRT1 interagit avec le facteur de transcription YY1 qui réprime l'expression de miR-134 – un microARN qui réprime la traduction des ARN messagers codant pour le BDNF (*Brain Derived Neurotrophic Factor*) et CREB (*cAMP Response Element Binding Protein*), deux protéines importantes dans l'apprentissage et la mémorisation (**DIA IV.5**), ce que nous avons discuté l'année dernière sur le modèle d'Aplysie développé par l'équipe d'Eric Kandel. Je vous rappelle (nous en avons parlé à mainte reprise) que les microARN s'hybrident avec les régions 3' terminales non codantes des messagers (la spécificité de l'interaction étant liée à la séquence du microARN) et en bloquent la traduction (ou en provoquent la dégradation). Inhiber la transcription de miR-134 augmente donc la synthèse des deux protéines en question.

Au-delà des fonctions synaptiques, il faut introduire les fonctions endocriniennes à travers le rôle de SIRT1 dans l'hypothalamus. L'hypothalamus qui, comme son nom l'indique, est localisé sous le thalamus contrôle, par ses interactions avec l'hypophyse, un certain nombre de fonctions physiologiques essentielles incluant la reproduction, la thermorégulation, le rythme circadien et la prise alimentaire (**DIA IV.6**). SIRT1 est exprimée dans les régions contrôlant les rythmes circadiens et la prise alimentaire, soit le noyau arqué (**ARC**), l'hypothalamus ventromédian (**VMH**), dorsomédian (**DMH**), latéral (**LH**) et dans le noyau supra chiasmatique (**SCN**). Le code couleur de la **DIA IV.6** vous décrit les différentes fonctions régulées par ces noyaux et je ne vais pas entrer dans les détails des mécanismes impliqués. Je me contente d'attirer votre attention sur deux points. Le premier est que le contrôle de la prise alimentaire introduit la notion de restriction calorique et du rôle de cette restriction dans la longévité. Je consacrerai sans doute un développement à cette question. Le second point est celui des rythmes circadiens. La partie mauve de la **DIA IV.6** suggère que SIRT1, via son interaction avec PGC1-alpha (un cofacteur transcriptionnel des récepteurs nucléaires), stimule l'expression de deux gènes du cycle circadien : Clock et BMAL1. La boucle de rétroaction avec les gènes PER (pour *period*) et CRYT laisse entrevoir comment une oscillation peut se mettre en place (et comment elle peut être régulée par SIRT1). J'y reviendrai à travers une revue récente du groupe de Paolo Sassone-Corsi.

Je vais passer rapidement sur les maladies neurodégénératives puisque nous y avons déjà consacré un long moment la semaine dernière à travers l'analyse détaillée des articles de Kim *et al.* (*EMBO J.* 26 : 3169-3179, 2007 et *Neuron* 60 : 803-817, 2008). Je rappelle cependant que SIRT1 a été mise en cause pour de nombreux troubles neurologiques et donne un aperçu des mécanismes impliqués. Pour la maladie d'Alzheimer, l'inhibition de la kinase Rock1 et l'augmentation de la métalloprotéase Adam 10 favorise la coupure en alpha incompatible avec la formation de BA4 (composant



principal des plaques amyloïdes) et, via sa déacétylation, favorise la dégradation de tau et diminue la formation des *tangles* (**DIA IV.7**). Pour la maladie de Parkinson (**DIA IV.8**), c'est l'activation de HSP70, qui restitue leur conformation aux protéines alpha-synucléines mutées formant les agrégats toxiques, qui est proposée. Dans le cas des autres maladies les mécanismes diffèrent mais les auteurs présentent SIRT1 comme élément important du puzzle (**DIA IV.8**). Avant de passer aux points suivants (nutrition et horloges circadiennes), je rappelle que si nous parlons des maladies dans un cours sur la longévité, c'est parce que ces maladies, même quand elles sont d'origine génétique, ne se déclarent que tardivement. Il faut donc un certain niveau de vieillissement pour tomber malade. Je l'ai souvent rappelé, dans les civilisations qui – malheureusement – n'offrent pas une longévité de plus de 50 à 60 ans aux humains, ces maladies n'ont pour ainsi dire pas le temps d'exister. Si j'insiste (lourdement peut-être) c'est qu'à l'inverse, peut-être suffirait-il de prolonger la vie en bonne santé (retarder le vieillissement normal, cérébral pour commencer), pour que ces maladies se déclarent encore plus tard. Voire ne se déclare pas du tout même passé un âge très avancé (la mort les prenant – pour ainsi dire – de court) si nous étions capables de « rajeunir le cerveau ». Je ne crois pas que cela soit seulement un rêve.

Sur ces paroles encourageantes, nous voici donc armés pour aborder un article sur la nutrition et une revue sur les rythmes circadiens. Le premier article de Mitchell *et al. Cell Reports* 6 : 836-843, 2014 s'intéresse à l'influence de SIRT1 sur la longévité et la santé chez des souris nourries normalement ou soumises à une diète à haute teneur en gras. SIRT1, on s'en souvient, est une hypothétique protéine anti-âge. De nombreuses données donnent du poids à l'idée que son activation, par exemple par le resveratrol, ou sa surexpression, augmente la sensibilité à l'insuline et protège contre les désordres mitochondriaux (ceux du métabolisme oxydatif) associés à des diètes inappropriées. Cet article a pour intérêt de s'intéresser d'abord à l'effet de SIRT1 chez des

souris nourries normalement. Dans ces expériences les animaux sont nourris normalement (SD pour diète standard) ou avec un régime gras (HFD pour diète à haute teneur en gras) en absence ou présence de SRT1720, un activateur de SIRT1.

La **DIA IV.9** démontre une augmentation significative de la durée de vie moyenne en présence de SRT1720, particulièrement pour les souris HFD (la durée de vie maximale ne bouge pas et reste à 140 semaines pour HFD et 160 pour SD). Pour les souris SD on remarque une petite augmentation de la durée de vie, mais surtout un retard de l'âge auquel les souris commencent à mourir, ce qui veut dire que l'état de santé général des souris est meilleur (elles vieillissent plus longtemps en bonne santé) et qu'elles sont plus résistantes (infections etc.) sans que la durée de vie maximale soit affectée de façon dramatique. Les autres paramètres sont peu modifiés, sauf les succès sur le rotarod (latence avant la chute en F). Dans ce dernier test, les souris grasses sont mauvaises mais les souris normales sont plus habiles sous SRT1720, ce qui suggère une meilleure coordination motrice et cette amélioration est visible à 13, 18 et 24 mois.

Les auteurs ont alors recherché d'autres marqueurs du vieillissement en bonne santé. La **DIA IV.10** vous montre la moindre incidence de cataractes sur 140 yeux dans chaque condition et à 105 semaines (78 semaines de traitement SRT1720). La tolérance à un régime forcé en glucose (ce qui veut dire la capacité qu'ont les cellules à capter le glucose, une fonction dépendante de l'insuline) est claire chez les souris traitées (AUC : Aire sous la courbe). En **C** sont indiqués un certain nombre de marqueurs métaboliques et on notera particulièrement la baisse du cholestérol, la diminution des marqueurs sériques des fonctions hépatiques et rénales. Bref, il semble assez clair que les souris traitées sont en bonne voie pour mourir en bonne santé. Les analyses de transcriptome qui complètent cet article me semblent suffisamment peu claires pour que je ne vous les inflige pas.



Passons donc à la revue de l'équipe de Sassone-Corsi sur les horloges circadiennes (Orozco-Solis & Sassone-Corsi, *Current Op. Genetics & Dev.* 26 : 66-72, 2014). L'horloge centrale pour l'adaptation des formes vivantes au cycle circadien (*circa diem*) est localisée, pour les vertébrés et « cérébrés », dans le noyau supra chiasmatique de l'hypothalamus (**DIA IV.11**), donc au-dessus du chiasma optique et sous le thalamus. Je rappelle que l'hypothalamus est connecté à l'hypophyse et contrôle la sécrétion de nombre d'hormones dont l'importance est rappelée sur cette même diapositive. Si cette horloge centrale, entraînée par la lumière est de toute première importance, il existe d'autres horloges situées à d'autres niveaux du système nerveux (d'autres noyaux de l'hypothalamus, l'hippocampe) et dans des tissus non nerveux, comme le foie, le rein, le cœur, etc. Ces horloges « secondaires » sont synchronisées avec l'horloge centrale, mais néanmoins soumises à des influences autres que la lumière, comme la nourriture ou les stimuli hormonaux.

Sur le plan moléculaire, l'horloge est composée d'un réseau de facteurs de transcription et de boucles de régulation rétroactives. Pour s'en tenir aux éléments essentiels, on citera *Circadian Locomotor Output Cycles Kaput* (CLOCK) et *Brain Muscle ARNT-Like1* (BMAL1) qui forment un hétérodimère et se fixent sur les éléments E-box de nombreux promoteurs, ce qui conduit à l'expression de plusieurs gènes de la famille des CCGs (pour *clock-controlled genes*). Parmi ces gènes, *Period 1-3* (Per1, Per2, Per3) et *Cryptochrome 1-2* (Cry1 et Cry2) s'associent et inhibent l'expression de CLOCK et BMAL1, boucle de rétroaction à l'origine des oscillations (**DIA IV.11**). Nombre des gènes CCG, donc régulés par l'horloge « de base », encodent des facteurs de transcription, ce qui augmente – par un effet en cascade – le nombre de gènes régulés par les cycles circadiens. En fait, les données de génomique fonctionnelle laissent entrevoir que ce sont entre 10 et 20 % des gènes qui sont « circadiens » et sous la dépendance des entrées nutritionnelles et métaboliques, point sur lequel je reviendrai dans un

instant à travers un article de la même équipe (Eckel-Mahan *et al.*, *Cell* 155 : 1464-1478, 2013). Mais on comprend aisément qu'étant donné la participation du cycle circadien à l'homéostasie de nombre de fonctions physiologiques, les dérèglements de ce cycle ont forcément des conséquences physiopathologiques graves, dans des domaines qui sont évidents comme l'obésité ou le diabète de type 2, mais aussi pour des maladies moins « évidentes » quant à leur rapport aux cycles circadiens, comme la maladie d'Alzheimer ou « la » schizophrénie.

Pour ce qui est du vieillissement, et comme l'écrivent les auteurs de la revue, il est de sens commun que les personnes âgées présentent des troubles du sommeil. Toujours dans cette revue, une expérience citée démontre que les oscillations transcriptionnelles dans des fibroblastes en culture changent selon que le sérum ajouté au milieu de culture provient d'individus jeunes ou « moins jeune ». J'y fais allusion car j'ai l'intention de vous parler des protocoles de rajeunissement par circulation croisée entre animaux jeunes et âgés. Ce lien entre horloge et vieillissement est renforcé par des expériences de greffe, comme celle du Noyau suprachiasmatique (SCN fœtal dans hamster âgé) qui prolonge la vie du receveur. Plus amusante est la greffe de la glande pinéale structure cérébrale dorsale qui, on le sait depuis Descartes, relie l'âme au corps. En fait, chez les vertébrés non-mammifères, il existe des cellules photosensibles ailleurs que dans la rétine, tout particulièrement dans la glande pinéale qui est donc directement régulée par les rythmes lumière/obscurité (**DIA IV.12**).

Chez les mammifères, la sécrétion de mélatonine par la glande pinéale est sous le contrôle des afférences orthosympathiques (noradrénergiques) du SCN. La mélatonine sécrétée la nuit (pic à 5 heures du matin chez *sapiens*) a, en plus de ses propriétés chronobiologiques, des propriétés immunomodulatrices, neuroendocrines et joue un rôle d'anti-oxydant. Ce rôle est direct (élimination des radicaux libres) et indirect (induction de l'expression des enzymes anti-oxydation). On voit là les possi-



bilités de la considérer comme une hormone anti-âge. De fait, l'amplitude des niveaux plasmatiques de mélatonine diminue avec l'âge. Si on ajoute que la synthèse des ROS suit aussi les rythmes diurnes/nocturnes, on comprendra que ces oscillations circadiennes régulent plusieurs mécanismes de lutte contre le stress oxydatif. Comme l'illustre la **DIA IV.11**, il y a un lien entre les sirtuins, SIRT1 en l'occurrence, et les oscillations. Les cibles de SIRT1 sont nombreuses, incluant des histones. En fait, cette activité HDAC de SIRT1 oscille de façon circadienne avec une déacétylation rythmique de H3K9/K14 au niveau des promoteurs des CCG (gènes contrôlés par Clock), ce qui réprime leur expression en augmentant la formation locale d'hétérochromatine (**DIA IV.12**). La **DIA IV.13** met en exergue certaines cibles de SIRT1 dont l'histone H3, comme nous venons de le voir, mais aussi FOXO1 (un facteur de transcription régulateur de l'oxydoréduction) et un certain nombre de cibles impliquées dans le métabolisme énergétique. Le point saillant est que l'activité de SIRT1 est modulée par NAD⁺ et donc liée à la production d'ATP et au métabolisme (**DIA IV.13**). Comme on le voit dans le schéma de gauche de cette DIA, NAMPT, un gène CCG régulé par Clock, lui-même régule la formation de NAD⁺ de façon cyclique. Comme l'activité de SIRT1 est dépendante de NAD⁺, on voit que la boucle transcriptionnelle est liée à l'activité cyclique d'une activité enzymatique.

Si nous en venons au vieillissement, il est clair que SIRT1, du fait de sa dépendance à NAD⁺ est un excellent candidat pour lier le cycle circadien à la sensibilité au nutriment ou au métabolisme. La partie gauche de la **DIA IV.13** illustre comment le vieillissement qui diminue la synthèse de NAD⁺ a donc des effets sur l'acétylation de nombre de cibles, mais aussi sur l'activité du complexe BMAL1/CLOCK, donc sur la synthèse oscillante des CCG. La partie droite complète ce schéma en rappelant que, via la régulation de l'activité HNF1A, un facteur de transcription fortement exprimé dans le foie, (*Hepatocyte Nuclear Factor*), la baisse de NAD⁺ résulte en une baisse de la transcription de gène

mitochondriaux nucléaires. On le sait, en effet, les mitochondries, malgré leur origine bactérienne, se sont adaptées à la vie symbiotique dans les cellules en transférant leurs gènes – à l'exception de 13 d'entre eux – au génome nucléaire. On voit donc là encore l'esquisse d'un lien entre activité nucléaire et mitochondriale, avec une oscillation synchronisée de cette interaction qui est modulable par le métabolisme et peut s'altérer avec l'âge ou les conditions physiopathologiques. À ce stade, je voudrais rappeler que depuis plusieurs années j'attire votre attention sur l'importance du métabolisme pour les fonctions cérébrales et le lien possible entre activité mitochondriale et transcription nucléaire, ou plutôt et plus largement sur les interactions entre noyaux et mitochondries dont nous avons là une parfaite illustration.

Ces considérations métaboliques permettent d'introduire, toujours à travers cette revue, la notion de *nutrient sensing* et de « restriction calorique » et du lien entre nutrition et horloges circadiennes. S'il est absolument exact que le vieillissement a une forte composante génétique, illustrée par les durées de vie différentes observées entre différentes espèces, il n'en est pas moins exact qu'il existe une composante épigénétique qui traduit le rôle de l'environnement dans le vieillissement. C'est dans cet esprit que nous allons introduire le thème de la restriction calorique, outil démontré de la longévité chez les levures, vers, mouches et souris. Il est important d'insister sur le fait que, même pour les protocoles de restriction calorique, le rythme d'absorption de la nourriture et son interaction avec le rythme circadien (dans les deux sens) sont des paramètres importants. La **DIA IV.14** liste quatre systèmes de mesure des nutriments (SIRT1, SIRT3, mTOR et AMPK une kinase dépendante de l'AMP) et décrit leurs fonctions circadiennes et leur lien avec le vieillissement.

J'ai déjà introduit le système mTOR impliqué dans la restriction calorique puisqu'il est sensible aux nutriments (glucose, acides gras, acides aminés). La restriction calorique réduit l'activ-



ité mTORC1 et l'amointrissement génétique ou pharmacologique de mTORC1 est suffisant pour augmenter la durée de vie (invertébrés et souris) même dans un modèle de nutrition normale (**DIA IV.15**). Il est d'intérêt que dans le noyau suprachiasmatique, mTOR montre une activité cyclique. La partie droite (en bas de la **DIA IV.14**) rappelle les points essentiels avec les trois entrées (cycle circadien, restriction calorique et interventions pharmacologiques), noyau suprachiasmatique qui joue soit directement soit indirectement (via différents effecteurs que nous venons de rencontrer) sur les horloges centrales et périphériques. Ce sont les sorties des horloges périphériques (homéostasie) qui dirigent notre capacité à vieillir en bonne santé.

Ce qui nous amène à terminer ce chapitre par un article sur le rôle de SIRT1 comme régulateur du cycle circadien au niveau du noyau suprachiasmatique et des effets du vieillissement sur ce contrôle par SIRT1 (Chang & Guarante, *Cell* 153 : 1448-1460, 2013). Le début nous ramène au cycle, puisque les auteurs introduisent leur article en rappelant que les organismes vivant se sont adaptés au cycle circadien en lui coordonnant l'expression des gènes qui participent aux voies métaboliques et aux fonctions physiologiques. Je n'ai pas besoin de vous rappeler (**DIA IV.15**) que le réseau qui gouverne les oscillations est composé des activateurs transcriptionnels CLOCK et BMAL1 qui dimérisent et activent l'expression de Cryptochrome 1 (Cry1), Cry2, et des trois gènes Period (Per1, Per2 et Per3). Quand PER et CRY atteignent un niveau critique, ils passent dans le noyau (en tant que dimères) et répriment l'expression de Clock et Bmal1. Les récepteurs nucléaires orphelins REV-ERB alpha, REV-ERB bêta, et ROR-alpha sont aussi des cibles de CLOCK-BMAL1 et participent, en retour, au contrôle de leur expression. Enfin, on ajoutera des événements post-transcriptionnels en particulier un ensemble de protéines qui régulent la dégradation de PER et CRY par le protéasome. L'homéostasie ce n'est pas simple, surtout quand ça oscille.

Cette circuiterie moléculaire est, nous venons d'en parler, liée à SIRT1, donc au métabolisme. En dehors des histones, SIRT1 déacétyle de nombreuses autres protéines, comme nous l'avons vu à propos du rôle de SIRT1 dans le développement et la neurodégénérescence (**DIA IV.16**). Les auteurs reviennent donc sur la question de SIRT1 et de l'horloge centrale au niveau du SCN. Il bénéficie pour ce faire de plusieurs lignées de souris C57black, une lignée invalidée pour SIRT1 spécifiquement dans le cerveau (BSKO) et deux lignées surexprimant la déacétylase respectivement 2 (Sir2D) et 10 (BSTG) fois. Ces différences d'expression sont illustrées dans la **DIA IV.17** en A et B. On note aussi, grâce à un anticorps qui reconnaît la forme acétylée de BMAL1 que cette acétylation augmente dans le KO et diminue chez les animaux BSTG qui surexpriment la déacétylase. Sur le plan du comportement « circadien » mesuré par l'activité physique (roues), les souris sont entraînées avec des cycles DL, puis passées en DD pour 30 jours et leur horloge endogène est suivie (**DIA IV.18**). La période intrinsèque des wt est 23,6 heures quand celle des KO est 23,9 et celles de Sir2D et BSTG 23,4 et 23,1 respectivement.

Ce même test a été utilisé pour suivre la modification de l'horloge endogène au cours du vieillissement et surtout son adaptation à une expérience de *jet lag* consistant à faire un shift DL de 4 heures (**DIA IV.19**). Les souris wt jeunes (6 mois) se réadaptent en 2 jours quand il en faut 8 jours aux vieilles (21 mois) pour se recadrer. La perte de fonction SIRT1 (BSKO) double la période de réadaptation chez les jeunes souris mais le gain de fonction la réduit chez les vieilles, de même pour l'intensité de l'activité physique qui corrèle avec le niveau de SIRT1. Les auteurs ont alors renforcé leur travail en suivant les oscillations des acteurs moléculaires principaux de la machinerie circadienne et démontré que leurs niveaux d'expression (mRNA en haut à gauche et protéines en haut à droite) étaient fortement modifiés dans les situations de perte et gain de fonction (**DIA IV.20**). Dans cette même DIA on note, en haut à droite, une



oscillation de SIRT1 maintenue dans le gain de fonction mais il est clair que, dans ce cas, nous sommes toujours au-delà des doses maximum (comparer les courbes bleue et noire). La question suivante était donc celle du déclin de SIRT1 avec l'âge. Le panneau du bas de la **DIA IV.20** donne un aperçu de la situation avec des souris âgées dont les niveaux en SIRT1, BMAL1 et PER2 sont proches de zéro (ceux de BSKO). Le point de comparaison est la souris jeune wt (barre noire = 1 dans les histogrammes). Évidemment la surexpression d'un facteur 10 de SIRT1 remet les animaux âgés (barres bleues) à un niveau égal ou supérieur à celui des jeunes.

Voilà qui est bel et bien, mais en fait ces expériences nécessitent une entrée plus avant dans le mécanisme. À cette fin, les auteurs ont utilisé une lignée cellulaire neuronale – le neuroblastome murin N2a – que l'on peut synchroniser par un choc de sérum de cheval. Après ce choc, si l'on suit l'expression des différents gènes qui nous sont maintenant familiers, on observe leur oscillation et en même temps la diminution des amplitudes de l'oscillation dans des conditions où l'expression de SIRT1 est diminuée par l'expression d'un shRNA (**DIA IV.21**). Par ailleurs, la transcription de BMAL1 est régulée positivement par ROR-alpha, une activation qui requiert PGC1-alpha (**DIA IV.21**) et le KO de PGC1-alpha a le même phénotype que BSKO. Comme PGC1-alpha est une cible de SIRT1, il était raisonnable de se demander si PGC1-alpha n'était pas l'élément central de cette régulation des oscillations. D'où l'expérience consistant à utiliser un shRNA dirigé contre PGC1-alpha qui montre qu'effectivement (**DIA IV.21**, panneau de droite), l'expression de pratiquement tous les gènes régulateurs des oscillations diminue, mais que des gains de fonction SIRT1 ou PGC1-alpha ont l'effet inverse d'amplification de la transcription. Ce même système a permis de monter avec un gène luciférase sous contrôle des promoteurs appropriés que BMAL1 et PER2 sont sous le contrôle transcriptionnel de SIRT1 et PGC1-alpha (**DIA IV.21**).

Ce qui soulève la question de l'interaction physiologique entre PGC1-alpha et SIRT1. Pour l'aborder, Chang et Guarente ont immunoprécipité la chromatine des cellules N2a pour vérifier que SIRT1 se fixe bien sur le site de ROR-alpha qui est proche du promoteur de BMAL1, ce qui était assez important parce qu'on savait qu'il en allait ainsi de PGC1-alpha (**DIA IV.21**). Utilisant des oligonucléotides qui encadrent les régions Set1 et Set2, il a pu être démontré qu'elles sont descendues avec les deux anticorps anti SIRT1 et anti PGC1-alpha (**DIA IV.22**). Mais ce qui apparaît aussi sur cette figure est que la fixation de l'un dépend de l'expression de l'autre, ce qui conduit les auteurs à proposer le modèle d'une interaction directe présenté à droite dans cette **DIA IV.22**.

Cette interaction avec PGC1-alpha est d'un très grand intérêt que l'on saisira mieux si j'explique un peu ce qu'est cette protéine. Je le ferai à travers deux articles, une revue et un article classique sur PGC1-alpha et le système nerveux. On doit la revue à Jiandie D. Lin (*Mol Endocrinol.* 23 : 2-10, 2009) et l'article à St-Pierre *et al.* (*Cell*, 127 : 397-408, 2006). Les protéines de la famille PGC1 sont des co-activateurs transcriptionnels qui s'associent à des facteurs de transcription. PGC1-alpha a donc été identifié comme un co-activateur de récepteur nucléaire aux hormones inductible par le froid dans les cellules de la matière grasse brune. Les récepteurs nucléaires sont des protéines cytoplasmiques qui passent dans le noyau et vont se fixer sur les promoteurs une fois qu'ils ont été activés par leur ligand, par exemple l'acide rétinoïque ou un œstrogène. Il existe cependant, c'est le cas de PGC1-alpha des récepteurs orphelins pour lesquels aucun ligand n'a été identifié, si tant est qu'ils en aient un. Pour PGC1-alpha, ce récepteur est ROR-alpha pour *Retinoid Related Orphan Receptor* (**DIA IV.23**). Sans entrer dans les détails, il est important de constater que les PGC1 ont une action importante au niveau de la mitochondrie dont ils régulent à la fois la biogenèse et l'activité (**DIA IV.23**). Il n'est donc pas étonnant qu'ils activent la transcription nucléaire de gènes mitochondriaux. Nous savons en effet que la plupart des gènes mito-



chondriaux ont été transférés au noyau cellulaire au cours de l'évolution. Du coup, c'est bien dans les tissus au métabolisme le plus actif que leur rôle est le plus décisif : les muscles, le tissu adipeux brun et – évidemment – le cerveau. Ce que nous avons décrit un peu plus haut suggère donc que l'activité métabolique via le lien entre PGC1-alpha et SIRT1 est couplée à l'activité circadienne, et à un grand nombre de processus mettant en jeu des oscillations régulées par les horloges, centrale (SCN) ou périphériques. On comprend bien l'importance – puisque fabriquer de l'ATP produit aussi des superoxydes à l'action délétère (**DIA IV.24**) – de n'être métaboliquement actif que quand cela est nécessaire et d'adapter la prise alimentaire et le métabolisme énergétique au comportement.

Ce lien entre ROS, PGC1 et neurodégénérescence est particulièrement intéressant dans le système nerveux, d'où la décision de clore ce chapitre par un article portant sur ce thème. Comme je viens de le rappeler, le métabolisme mitochondrial est important, mais en même temps il est générateur de ROS catalyseurs de l'oxydation des lipides, des protéines et de l'ADN. La première ligne de défense contre les ROS est procurée par les enzymes de détoxification comme les superoxyde dismutases (SOD1/2) et les catalases. L'autre ligne de défense est procurée par les protéines de découplage (UCP), qui diminuent la formation des ROS en atténuant le potentiel électrochimique à travers la membrane interne des mitochondries. Aujourd'hui, nous parlerons de la 3^e ligne et du rôle qu'y joue PGC1-alpha.

Cet aspect protecteur est apparu grâce à une souris PGC1-alpha KO dans laquelle on a noté des phénomènes de dégénérescence neuronale associés à des comportements anormaux. En principe, PGC1-alpha, du fait de son rôle dans la biogenèse et l'activité des mitochondries, devrait plutôt favoriser la production de ROS. C'est le cas, mais parallèlement, PGC1-alpha augmente la production des enzymes mitochondriaux de détoxification. Nous allons examiner ici quelques facettes de cette homéostasie et les conséquences de la perte de PGC1-alpha

sur la sensibilité aux agents qui augmentent les ROS, en particulier le MPTP, drogue qui induit des formes « chimiques » de la maladie de Parkinson. Les auteurs ont commencé par traiter la lignée cellulaire murine 10T1/2 par du H₂O₂ et observé une forte induction du système de défense contre les ROS (**DIA IV.25**) avec un rôle important de PGC1-alpha (plus que de β), même si la double inactivation des deux gènes (eux-mêmes induits par le stress) a un effet radical sur l'expression des enzymes de protection (panneau C). On voit sur la même **DIA IV.25** que la mutation PGC1-alpha mène à une baisse de l'expression de plusieurs enzymes de détoxification dans le cerveau de souris (le PGC1-alpha correspond à l'exon2 qui n'est pas éliminé par le KO).

Les auteurs ont préparé des adipocytes de tissu adipeux brun prélevé chez des souris PGC1-alpha KO (et des contrôles wt) et les ont traités à H₂O₂. Chez les wt on constate (**DIA IV.25**, panneau de droite) une mort des cellules plus forte chez PGC1-alpha KO que chez le wt et accentuée par la perte additionnelle de PGC1- β . Cela est sans doute lié à l'induction des ROS (suivie par un marqueur fluorescent des ROS, le CM-H2DCFDA), ce qui permet de séparer les cellules en fonction de leur contenu en ROS (**DIA IV.25**, à droite et en bas). D'où l'étape suivante sur le rôle de H₂O₂ dans l'activation de PGC1-alpha. Les auteurs ont examiné les premiers 2kb du promoteur de PGC1-alpha à la recherche de sites de fixation de facteurs de transcription sensibles au stress oxydatif et ont porté leur attention sur Cre-Binding protein (CREB), FOXO3 et NFE-related factor 2 (NRF2). L'activité du promoteur suivie par la luciférase est fortement augmentée par H₂O₂ et cette augmentation n'est perdue que par la délétion du site de fixation de CREB ou l'expression d'un CREB dominant négatif (**DIA IV.26**). Les autres expériences de la même DIA démontrent que CREB se fixe sur les régions promotrices (supershift de C et chromatin immunoprecipitation de D) et que H₂O₂ induit la synthèse et la phosphorylation de CREB (E).

Restait à aller *in vivo*, ce qui fut fait en injectant du MPTP dans des souris PGC1-alpha KO. Le



MPTP est une drogue qui fut découverte accidentellement comme contaminant de l'héroïne de synthèse fabriquée par des étudiants toxicomanes californiens. Elle est capturée par les neurones dopaminergiques de la substance noire, cible la chaîne de transport des électrons du complexe I mitochondrial et entraîne la mort de ces neurones, induisant de ce fait des pathologies de type Parkinson dont ont souffert les utilisateurs et apprentis chimistes. Cette drogue injectée à dose faible induit la mort de 12 % des neurones dans les souris normales mais de 61 % d'entre eux dans les souris mutantes pour PGC1-alpha. La **DIA IV.27** illustre ce point et montre aussi la nitrosylation des tyrosines, marqueur de l'action des ROS. La même approche a été tentée, non avec le MPTP, mais avec l'acide kainique, un agoniste du récepteur glutamatergique qui induit de l'excitotoxicité des neurones de l'hippocampe (toxicité due à l'excitation excessive des neurones) et des crises épileptiques. La **DIA IV.27** montre une atteinte des neurones de la région CA1 de l'hippocampe avec un marquage Tunel (C) suggérant des cassures de l'ADN et une entrée en apoptose en C et (D) et une l'oxydation des guanines (anticorps anti 8-oxoguanine). D'où le modèle relativement simple (**DIA IV.27**) d'une activation de PGC1-alpha par l'environnement et les ROS (parfois générés par l'activité et l'environnement) et une action à la fois sur la biogenèse et l'activité mitochondriale, elle-même génératrice de ROS et une répression de l'activité dommageable de ces agents oxydants.

Ce qui vient d'être décrit pour un modèle de maladie de Parkinson est aussi exact pour des modèles de maladie de Huntington. La maladie de Huntington, je le rappelle, résulte de la mutation d'un gène codant pour la protéine, la Huntingtin, et résultant en l'accumulation anormale de résidus glutamine dans l'exon 1. Au-delà d'un certain nombre de ces résidus, la protéine devient toxique pour certaines classes de neurones du noyau caudé, putamen et striatum. Les causes de cette toxicité ne sont pas connues et je ne vais pas ici vous faire la liste des hypothèses qui ont été rassemblées sur la base d'un modèle animal consistant en l'expression

chez la souris de la forme humaine mutée. L'article de Cui *et al.* (*Cell* 127 : 59-69, 2006) avance une hypothèse qui n'a pas d'intérêt dans le contexte de ce cours puisqu'il y est proposé que la protéine mutée réprime l'expression de PGC1-alpha, ce qui conduirait à une dysfonction mitochondriale précédant la neurodégénérescence. Je ne vous présente pas ce travail mais je voulais vous livrer l'information.