

## Les mécanismes génétiques du vieillissement

Il existe deux façons d'étudier la régulation de la sénescence. La première est d'identifier les changements qui se produisent dans les cellules âgées et de chercher à déterminer si ces changements sont les causes ou les conséquences du vieillissement. L'autre méthode consiste à identifier des gènes dont l'action affecte le vieillissement en analysant des mutants ayant des durées de vie modifiées. L'approche génétique a souvent l'avantage de ne pas tenir compte des idées *a priori* que nous pourrions avoir sur les causes du vieillissement. Ainsi, en étudiant des souches d'animaux mutants possédant une durée de vie prolongée, des gènes qui influencent la longévité ont été caractérisés dans deux organismes modèles invertébrés : la mouche *Drosophila melanogaster* [1-3] et le ver nématode *Caenorhabditis elegans* (*m/s* 1996, n° 11, p. 1261) [4, 5]. Il faut noter toutefois que certains travaux portant sur l'étude de la durée de vie chez les mammifères comme la souris n'ont sans doute pas eu l'écho scientifique qu'ils méritaient [6]. Ici nous avons dressé un bilan des études actuellement menées sur la génétique du vieillissement chez *C. elegans*.

### ***Caenorhabditis elegans* : un modèle d'étude des bases génétiques du vieillissement**

Chez *C. elegans*, différentes études génétiques ont démontré l'existence de plusieurs classes de gènes dont l'action influe sur la longévité [4, 5]. Le choix et le succès du système *Caenorhabditis elegans* tient aux nombreux attraits qu'il offre en laboratoire. C'est un organisme relativement

simple, à la fois anatomiquement et génétiquement (*figure 1*). Du fait de leur petite taille (1 mm), les vers sont faciles à manipuler. Ils ont des exigences nutritives facile à contenter (ils se nourrissent de bactéries), poussent à la température ambiante, et présentent une durée de vie moyenne de seulement quinze jours. Hermaphrodites et mâles diffèrent morphologiquement au stade adulte. Les hermaphrodites produisent à la fois des ovocytes et des spermatozoïdes et peuvent se reproduire par autofécondation. C'est ce type de reproduction que *C. elegans* utilise le plus fréquemment. Les mâles ne produisent que des spermatozoïdes et peuvent féconder les hermaphrodites mais ils n'apparaissent spontanément dans la nature qu'à très faible fré-

quence. L'ensemble de ces caractéristiques permet d'obtenir des lignées isogéniques pures de vers hermaphrodites dans lesquelles tous les animaux sont génétiquement identiques. Ainsi, l'effet d'une mutation sur la longévité pourra être évalué rigoureusement par comparaison à une autre lignée génétiquement identique, exception faite de la présence de la mutation que l'on cherche à étudier.

Trois types de mutations affectant la longévité ont été identifiés : (1) des mutations dans les gènes *daf-2* et *age-1* qui contrôlent l'entrée dans un stade de développement facultatif, le stade larvaire dit dauer [7-10] ; (2) des mutations dans des gènes dits « horloges » *clk-1*, *clk-2*, *clk-3*, qui affectent le déroulement temporel de nombreuses étapes du développement



Figure 1. Un groupe de vers nématode de l'espèce *Caenorhabditis elegans* à différents stades du développement.

ainsi que le comportement [11, 12]; (3) des mutations dans les gènes *eat* qui empêchent l'animal d'absorber normalement sa nourriture [13, 14]. La caractérisation de chacun de ces groupes de mutants a permis ainsi d'élaborer un certain nombre d'hypothèses concernant les mécanismes du vieillissement chez *C. elegans*.

### Les gènes qui affectent le développement du stade larvaire «dauer»

Le développement larvaire normal est constitué de quatre stades (L1, L2, L3 et L4). Une larve dauer se forme à la place de la larve L3 quand les conditions d'environnement sont mauvaises, c'est-à-dire quand la température est élevée et la nourriture rare, mais surtout quand les vers se trouvent à forte densité (ce qui est perçu par l'animal *via* une phéromone qui est émise de façon constitutive par tous les vers à tous les stades). A ce stade, la larve devient résistante à la dessiccation ainsi qu'à d'autres *stress* et peut vivre plusieurs mois. Quand les conditions de l'environnement s'améliorent, la larve dauer reprend le développement interrompu, se transforme en L4, puis en adulte.

La décision d'entrer dans le stade dauer est réglée par une cascade génétique très complexe dont font partie les gènes *daf-2* et *age-1* [9, 15]. Quand l'un de ces gènes est muté, les vers L2 se transforment en larve dauer plutôt que L3, même lorsque les conditions de vie sont favorables. Néanmoins, à basse température, ces mutants peuvent se développer normalement et atteindre le stade L3. Dans ces conditions, ces vers mutants doublent leur durée de vie par rapport au ver normal [7]. Bien qu'ils soient morphologiquement adultes et fertiles, la longévité de ces mutants serait due à un état partiellement dauer et donc à une plus grande résistance au *stress*.

Les gènes *daf-2* et *age-1* codent respectivement pour un récepteur transmembranaire analogue à celui de l'insuline et d'autres facteurs de croissance (*m/s* 1997, n° 10, p. 1204) [16], et pour une kinase de type phosphati-

dyl-inositol 3-kinase [17]. Un troisième gène, *daf-16*, code pour un facteur de transcription du type forkhead [18, 19], et est absolument nécessaire à la manifestation de l'effet des mutations de *daf-2* et *age-1*. Il intervient sur la formation de la larve dauer mais également au niveau de la durée de vie puisque les mutants doubles *daf-16; daf-2* ou *daf-16; age-1* ont une durée de vie identique à celle des animaux de type sauvage dans des conditions où ils ne forment pas de larve dauer [8, 10, 20].

### Les gènes qui affectent l'ensemble des rythmes biologiques

Les mutants des gènes *clk* présentent des phénotypes développementaux et comportementaux [11, 12]. Cela inclut la longueur de certaines phases du cycle cellulaire, la durée du développement embryonnaire et post-embryonnaire, le taux de production d'œufs fécondés, le nombre de descendants par autofécondation, la durée de vie, et la périodicité des comportements rythmiques comme la défécation, l'alimentation par pompage et la nage. Pour tous ces événements, on observe un ralentissement moyen de leur déroulement, donc une diminution de la fréquence des événements périodiques et une augmentation de la durée des événements dont on mesure la durée totale. Ainsi, chez les mutants *clk-1(qm30)*, les traits physiologiques atteints sont

ralentis au moins deux fois par rapport aux vers sauvages, alors que ces animaux ont un aspect parfaitement normal. Les gènes *clk* interagissent génétiquement entre eux, puisque les mutants doubles vivent plus longtemps que les mutants simples. L'étude détaillée des mutants *clk* suggère qu'une horloge physiologique est dérégulée chez ces animaux. La longue vie de ces mutants résulterait d'une altération de l'équilibre entre les processus dommageables et les mécanismes de réparation. Le gène *clk-1* a été cloné et code pour une protéine mitochondriale présente chez tous les eucaryotes [4, 21]. Ces propriétés suggèrent que la protéine CLK-1 agirait au niveau de la régulation de la production et de la consommation d'énergie de la cellule.

### L'augmentation de la durée de vie par la restriction calorique

La durée de vie des rongeurs mais aussi des primates est prolongée quand on réduit strictement leur absorption de nourriture (la restriction calorique). Ces animaux manifestent des changements physiologiques tels qu'une réduction du poids, de la température basale, ainsi que des perturbations de la concentration du glucose sanguin et de l'insuline. On ne sait néanmoins pas clairement lequel de ces changements est nécessaire à l'augmentation de la durée de vie.

Tableau I				
LES INTERACTIONS ENTRE LES DIFFÉRENTS MÉCANISMES GÉNÉTIQUES CAPABLES DE PROLONGER LA DURÉE DE VIE DE <i>C. ELEGANS</i>				
	<i>daf-2</i>	<i>clk-1</i>	<i>eat-2</i>	<i>daf-16</i>
<i>daf-2</i>	++	++++	++++	+
<i>clk-1</i>		++	++	++
<i>eat-2</i>			++	++

Les mutations dans *daf-16* suppriment la longue vie (++) des mutants *daf-2* mais pas des mutants *clk-1* ou *eat-2*. Cela suggère que l'effet des mutations dans le gène *daf-2* est produit par des mécanismes différents de celui des mutations dans les gènes *eat-2* et *clk-1*. Cette hypothèse est renforcée par le fait que les doubles mutants *eat-2; daf-2*, tout comme les doubles mutants *daf-2; clk-1*, vivent beaucoup plus longtemps (++++) que les animaux portant chacune de ces mutations séparément. De plus, les doubles mutants *eat-2; clk-1* ne vivent pas plus longtemps (++) que les animaux portant ces deux mutations séparément, ce qui suggère que *eat-2* et *clk-1* règlent le vieillissement en affectant un processus commun.

Chez *C. elegans*, les mutations dans les gènes *eat* affectent la fonction du pharynx, un organe musculaire dont les contractions servent à ingérer les bactéries [13]. Ces mutants ingèrent une quantité insuffisante de nourriture, sont appauvris en produits de réserve (en particulier les lipides), apparaissent plus transparents et sont souvent plus courts et plus minces que les vers normaux. Parmi les 10 gènes *eat* que nous avons étudiés, 7 augmentent la durée de vie des vers, alors que ces gènes n'ont en commun que le fait qu'ils réduisent l'absorption de nourriture [14]. Comme expériences témoins, nous avons aussi testé des mutations qui affectent la fonction des muscles ou/et des neurones mais qui ne perturbent pas la fonction du pharynx, et nous avons trouvé que ces mutations ne permettent pas aux vers de vivre longtemps [14].

Il est difficile d'évaluer, entre nématode et mammifère, quel est le degré de similitude de la réponse physiologique à la réduction de nourriture. Cependant, le fait que la restriction calorifique allonge la durée de vie chez de nombreuses espèces suggère que ces réponses physiologiques ont été conservées au cours de l'évolution, y compris chez les nématodes.

### Indépendance ou convergence de l'action des gènes de longévité

Du point de vue de leurs effets sur le vieillissement, les trois groupes de gènes que nous venons de décrire fonctionnent-ils ou non suivant le même mécanisme? L'exploration de la similitude entre les mécanismes a été abordée par l'analyse de l'effet additif possible des mutations dans des gènes de groupes différents. En effet, si les gènes convergent vers un même mécanisme sous-jacent, la durée de vie d'un mutant double ne sera pas différente de celle de mutants pour chacun des gènes. Selon ce critère, l'action de *daf-2* est distincte à la fois de celle de *clk-1* [12, 14] et de celle des gènes *eat* [14]. Par exemple, alors que *daf-2* double la durée de vie et que *clk-1* ne prolonge la vie que de 30 % à 50 %, le mutant double *daf-2; clk-1* vit 5 fois plus longtemps que les animaux de type sauvage [12]. Parallèlement l'action de

*clk-1* ressemble à l'action des gènes *eat* puisque les mutants doubles *eat-2; clk-1* ne vivent pas plus longtemps que les mutants *eat-2* (Tableau 1).

Une autre approche génétique pour tester la similitude entre ces mécanismes est l'étude de la suppression de la durée de vie prolongée par l'action de *daf-16*, puisque les mutations dans ce gène suppriment tous les phénotypes de *daf-2*. Ainsi, nous avons montré que la durée de vie des mutants doubles *daf-16; clk-1* et *daf-16; eat-2* n'est pas différente de celle des mutants simples *clk-1* ou *eat-2* (Tableau 1). Le gène *daf-2* affecterait donc le vieillissement par un mécanisme différent de celui des deux autres groupes de gènes [14].

La similitude des mécanismes mis en jeu par *clk-1* et par la restriction calorifique par les gènes *eat* est d'autant moins évidente que, excepté pour la durée de vie, ces mutants présentent des phénotypes très différents (figure 2). Il reste néanmoins possible que l'action de ces gènes puisse converger en un point qui serait crucial

pour leur effet sur la durée de vie, par exemple le métabolisme mitochondrial.

### Le mécanisme d'action spatial de *daf-2*

Récemment, la localisation du site d'action de *daf-2* a été étudiée chez des animaux mosaïques pour *daf-2* [22]. Ces résultats montrent que *daf-2* agit de façon non autonome dans de nombreuses régions de l'animal. C'est-à-dire qu'un animal peut être *daf-2(+)* dans une grande partie de ses cellules et pourtant former une larve d'adulte à la température non permissive (il faut noter que presque toutes les cellules de l'animal sont morphologiquement différentes dans la larve d'adulte). Inversement, un animal peut manquer de l'activité de *daf-2* dans beaucoup de cellules et pourtant réussir à avoir un développement normal, c'est-à-dire non-d'adulte. En particulier, un animal peut être *daf-2(-)* dans tous les descendants du blastomère P1 (figure 3) et pourtant se développer normale-

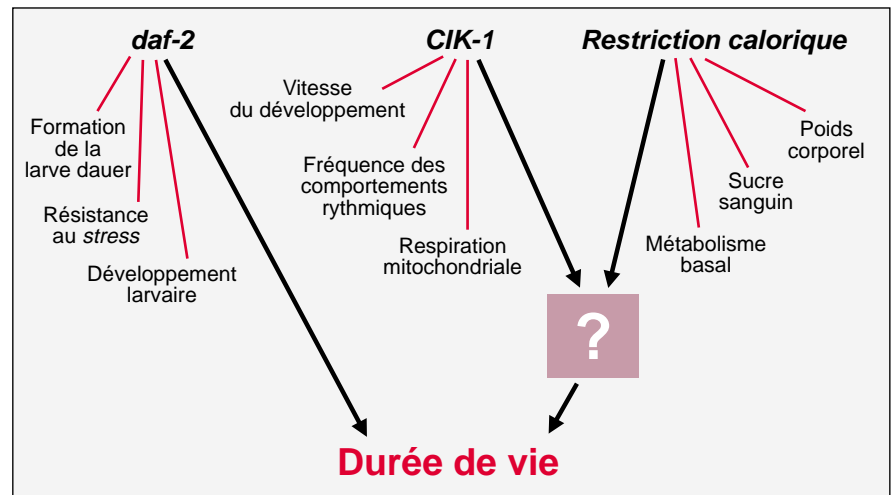


Figure 2. **Les deux mécanismes génétiques de la durée de vie.** Un de ces mécanismes implique des gènes qui régulent la formation de la larve d'adulte. Ainsi, *daf-2* intervient dans une cascade de signalisation complexe qui coordonne la croissance, la résistance au stress et le vieillissement de cellules individuelles. Un autre mécanisme implique un ralentissement de la vitesse de développement et une diminution de la fréquence des événements périodiques par des mutations dans le gène *clk-1*. *CLK-1* est une protéine mitochondriale qui pourrait contrôler le taux énergétique de la cellule. La restriction calorifique peut également augmenter la durée de vie en induisant de nombreux changements physiologiques. Elle pourrait agir en réduisant la vitesse du métabolisme basal. Des études génétiques ont montré que la restriction calorifique augmente la durée de vie par un mécanisme similaire à *clk-1* mais distinct de *daf-2*.

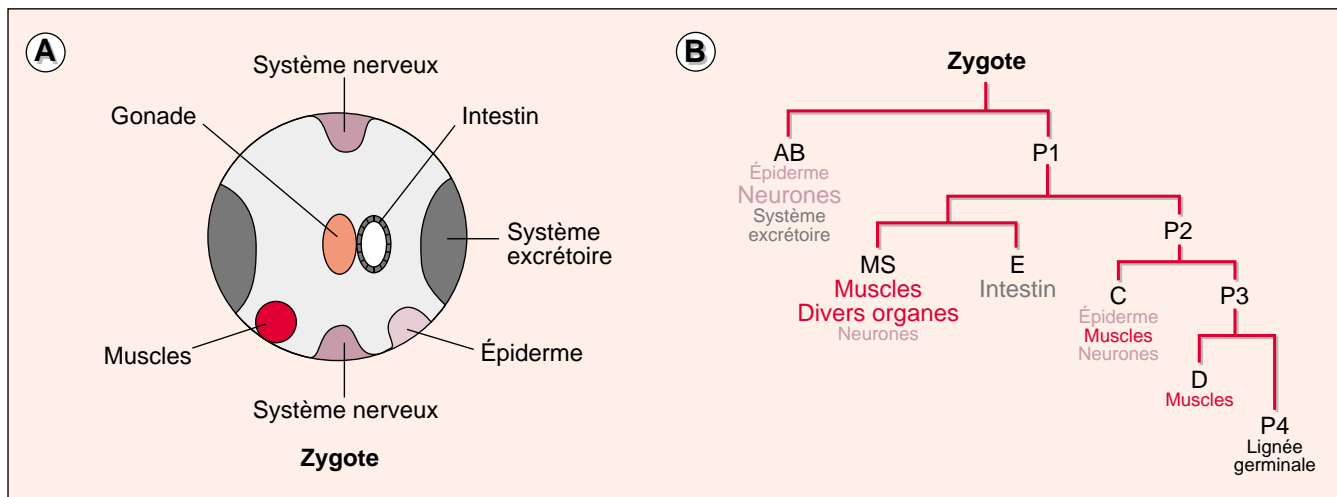


Figure 3. **Tissus et lignages cellulaires chez *C. elegans*.** **A.** Coupe transversale schématisée montrant l'organisation des organes et des tissus. *C. elegans* est schématisé comme un tube constitué d'épiderme, d'un système excrétoire, de neurones et de muscles entourant un espace pseudocœlomique contenant intestin et gonade. **B.** Les lignages cellulaires précoces. Le développement de l'embryon commence avec une série de cinq divisions inégales et asynchrones qui donnent naissance aux 6 cellules fondatrices AB, MS, E, C, D, et P4. Les cellules AB, MS et C forment les tissus et organes dérivés de l'ectoderme (épiderme, neurones) et du mésoderme (système excrétoire, muscles). La cellule E, précurseur strict de l'endoderme, donnera l'intestin; alors que la cellule D, précurseur strictement mésodermique, donnera les muscles du corps. La cellule P4 représente le précurseur de la lignée germinale.

ment, y compris pour les tissus dérivés de P1. En général, l'expression de *daf-2* dans les descendants du blastomère AB paraît plus importante que celle dans les descendants de P1. Dans certains cas, néanmoins, des animaux qui paraissaient entièrement manquer de *daf-2* dans AB réussirent pourtant à se développer normalement sans s'arrêter au stade dauer ce qui indique que l'expression de *daf-2(+)* dans P1 peut être suffisante. Des animaux partiellement dauer n'ont jamais été observés dans cette étude, bien qu'ils puissent exister comme cela a été montré avec d'autres gènes. Le gène *daf-2* semble donc agir de façon nonautonome et être responsable de la production d'un message qui peut diffuser vers les autres cellules pour leur permettre de se développer normalement. La production de ce message semble être du type « tout ou rien » puisque les vers se développent entièrement comme dauer ou entièrement comme larves L3 normales. L'effet des mosaïques *daf-2* sur la détermination de la durée de vie de tels animaux a abouti aux mêmes conclusions quant à l'action de *daf-2*.

Ces excellents travaux ouvrent la voie à l'identification du messenger diffusible qui est apparemment produit en réponse à l'action de *daf-2*. Une hypothèse intéressante est qu'il s'agirait du ligand d'un facteur de transcription du type des récepteurs nucléaires hormonaux. Cette hypothèse s'appuie sur les propriétés du gène *daf-12* qui est nécessaire à la formation des larves dauer mais pas à la longévité accrue de *daf-2* et qui code pour un récepteur nucléaire hormonal [9, 20, 23]. L'action de *daf-2* sur la longévité pourrait donc passer par un autre récepteur du même type. Quelles sont les propriétés des cellules mutantes qui sont nécessaires pour augmenter leur durée de vie? La réponse à cette question devra attendre l'identification de gènes qui agissent dans la cellule pour produire les changements phénotypiques liés à l'état dauer ■

## RÉFÉRENCES

1. Lin YJ, Seroude L, Benzer S. Extended life-span and stress resistance in the *Drosophila* mutant *methuselah*. *Science* 1998; 282: 943-6.

2. Orr WC, Sohal RS. Extension of life-span by overexpression of superoxide dismutase and catalase in *Drosophila melanogaster*. *Science* 1994; 263: 1128-30.

3. Parkes TL, Elia AJ, Dickinson D, Hilliker AJ, Phillips JP, Boulianne GL. Extension of *Drosophila* lifespan by overexpression of human SOD1 in motoneurons. *Nat Genet* 1998; 19: 171-4.

4. Hekimi S, Lakowski B, Barnes TM, Ewbank JJ. Molecular genetics of life span in *C. elegans*: how much does it teach us? *Trends Genet* 1998; 14: 14-20.

5. Hekimi S. Une horloge cellulaire et physiologique règle la vie du nématode *Caenorhabditis elegans*. *Med Sci* 1997; 13: 474-82.

6. Brown-Borg HM, Borg KE, Meliska CJ, Bartke A. Dwarf mice and the ageing process. *Nature* 1996; 384: 33.

7. Kenyon C, Chang J, Gensch E, Rudner A, Tabtiang R. A *C. elegans* mutant that lives twice as long as wild type. *Nature* 1993; 366: 461-4.

8. Tissenbaum HA, Ruvkun G. An insulin-like signaling pathway affects both longevity and reproduction in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 1998; 148: 703-17.

9. Gems D, Sutton AJ, Sundermeyer ML, Albert PS, King KV, Edgley ML, Larsen PL, Riddle DL. Two pleiotropic classes of *daf-2* mutation affect larval arrest, adult behavior, reproduction and longevity in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 1998; 150: 129-55.

## RÉFÉRENCES

10. Gottlieb S, Ruvkun G. *daf-2*, *daf-16* and *daf-23*: Genetically interacting genes controlling dauer formation in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 1994; 137: 107-20.
11. Wong A, Boutis P, Hekimi S. Mutations in the *clk-1* gene of *Caenorhabditis elegans* affect developmental and behavioral timing. *Genetics* 1995; 139: 1247-59.
12. Lakowski B, Hekimi S. Determination of life span in *Caenorhabditis elegans* by four clock genes. *Science* 1996; 272: 1010-3.
13. Avery L. The genetic of feeding in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 1993; 133: 897-917.
14. Lakowski B, Hekimi S. The genetics of caloric restriction in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 13091-6.
15. Vowles J, Thomas J. Genetic analysis of chemosensory control of dauer formation in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 1992; 130: 105-23.
16. Kimura KD, Tissenbaum HA, Liu Y, Ruvkun G. *daf-2*, an insulin receptor-like gene that regulates longevity and diapause in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 1997; 277: 942-6.
17. Morris JZ, Tissenbaum HA, Ruvkun G. A phosphatidylinositol-3-OH kinase family member regulating longevity and diapause in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 1996; 382: 536-9.
18. Lin K, Dorman JB, Rodan A, Kenyon C. *daf-16*: An HNF-3-forkhead family member that can function to double the life-span of *Caenorhabditis elegans*. *Science* 1997; 278: 1319-22.
19. Ogg S, Paradis S, Gottlieb S, Patterson GI, Lee L, Tissenbaum HA, Ruvkun G. The forkhead transcription factor DAF-16 transduces insulin-like metabolic and longevity signals in *C. elegans*. *Nature* 1997; 389: 994-9.
20. Larsen PL, Albert PS, Riddle DL. Genes that regulate both development and longevity in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 1995; 139: 1567-83.
21. Ewbank JJ, Barnes TM, Lakowski B, Lusier M, Bussey H, Hekimi S. Structural and functional conservation of the *Caenorhabditis elegans* timing gene *clk-1*. *Science* 1997; 275: 980-3.
22. Apfeld J, Kenyon C. Cell nonautonomy of *C. elegans daf-2* function in the regulation of diapause and life span. *Cell* 1998; 95: 199-210.
23. Antebi A, Culotti JG, Hedgecock EM. *daf-12* regulates developmental age and the dauer alternative in *Caenorhabditis elegans*. *Development* 1998; 125: 1191-205.

### Siegfried Hekimi

Associate professor.

### Madeleine Garcia

PhD, visiting scientist, Département de biologie, Université McGill, 1205, avenue du Docteur-Penfield, H3A 1B11, Montréal, Québec, Canada.

### TIRÉS À PART

S. Hekimi.