

Réparation, cancer et sénescence : le gène du syndrome de Werner

Le syndrome de Werner est caractérisé par un vieillissement prématuré et se transmet comme une maladie autosomique récessive liée au chromosome 8. Les sujets atteints présentent, à partir de la trentaine, beaucoup des stigmates associés à la sénescence : altération de la texture et grisonnement des cheveux, altérations cutanées et rides, ulcères trophiques de jambe, ostéoporose, athérosclérose et maladies coronariennes, sensibilité à la cataracte, au diabète et aux cancers. La présence de nombreuses calcifications des tissus mous, notamment sous-cutanées, est typique de la maladie. En revanche, les malades ne sont pas atteints de la maladie d'Alzheimer, ni d'hypertension artérielle. Beaucoup des symptômes de ce syndrome de Werner sont partagés avec une autre maladie entraînant un vieillissement accéléré de révélation plus précoce (durant la première décennie) et d'évolution rapide : la progeria, probablement de transmission autosomique dominante.

Depuis longtemps, les spécialistes savaient que l'identification des gènes responsables de ces affections génétiques exceptionnelles devaient apporter des éléments essentiels à la compréhension des phénomènes de sénescence, venant appuyer certaines des hypothèses sur le mécanisme du vieillissement précédemment proposées, ou bien les infirmant et ouvrant ainsi de nouvelles voies.

Dans les années 1970, la théorie des erreurs, proposée par Leslie Orgel (San Diego, CA, USA), s'était taillée une place très importante ; elle postulait que le vieillissement devait être la conséquence de l'accumulation des erreurs de la machinerie de biosynthèse des protéines, s'accroissant de

manière exponentielle dès lors qu'auraient été altérés des processus de contrôle de la qualité des épreuves et de réparation du matériel génétique [1]. De fait, Robin Holliday (Londres, GB) avait démontré que les cellules sénescents contenaient de nombreuses protéines altérées [2]. Cependant, plusieurs auteurs établissaient ensuite que ce phénomène était plus lié à la diminution de la synthèse des protéines et à leur vieillissement moléculaire (modifications post-traductionnelles) qu'à des erreurs biosynthétiques [3, 4]. Chez la drosophile, l'équipe de Walter Gehring (Bâle, Suisse) devait montrer qu'un tel ralentissement de la biosynthèse était lié à la sénescence, le transfert dans des lignées de drosophiles du gène codant pour un facteur d'élongation des protéines prolongeant très notablement la longévité des insectes (*m/s n°4, vol 6, p. 393*) [5]. Une autre observation importante avait été faite depuis très longtemps : il semble exister une relation inverse entre la longévité des espèces et l'efficacité de leurs systèmes de réparation de l'ADN [6] (*figure 1*). Par exemple, chez la Souris, la déficience de ces systèmes comparée à leur haute performance chez l'homme pourrait expliquer, tout à la fois, la sénescence accélérée de ces petits mammifères et l'extraordinaire susceptibilité à la transformation maligne des cellules murines en culture. De fait, plusieurs maladies reconnues associées à une instabilité du matériel génétique, appelées réparatoses, sont associées à une susceptibilité particulière au cancer et, fréquemment, à des signes de sénescence accélérée, généralisée ou, plus souvent, localisée : ataxie-télangiectasie, syndrome de Bloom, xero-

derma pigmentosum, syndrome de Cockayne, etc. [7]. La découverte par Yu *et al.*, de l'équipe de Gerard Schellenberg (Seattle, WA, USA) que le gène du syndrome de Werner semble coder pour une hélicase, type d'enzyme déjà impliqué dans de nombreuses réparatoses (*m/s n°3, vol 12, p. 403*), ne constitue donc pas à proprement une surprise, mais n'en est pas moins un résultat d'un extraordi-

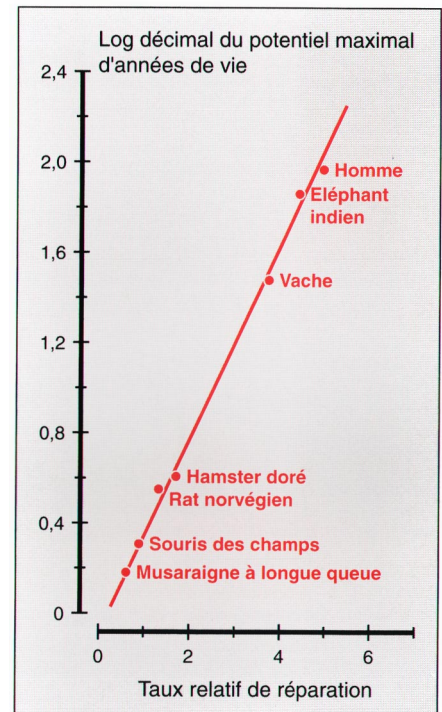


Figure 1. **Relations entre la longévité et la capacité de réparation de l'ADN dans différentes espèces** (d'après [6]). Le taux relatif de réparation représente la synthèse non programmée d'ADN de fibroblastes cutanés non transformés irradiés par les ultraviolets.

naire intérêt [8]. Il confirme en effet que l'une des conséquences de l'instabilité génétique peut être une sénescence accélérée. Chez les sujets âgés, plusieurs auteurs ont d'ailleurs noté une certaine perturbation de l'efficacité des systèmes de réparation de l'ADN [9, 10]. En outre, les radiations ionisantes et les UV sont connus pour entraîner un vieillissement accéléré de la peau ou des cellules en culture. On peut concevoir que, selon leur type, les anomalies de la réparation de l'ADN et des systèmes assurant la stabilité des chromosomes peuvent plutôt favoriser la survenue de mutations, dont la conséquence la plus probable serait alors la transformation maligne, ou bien la sénescence; en effet, des phénomènes clonaux favorisant la prolifération cellulaire sont susceptibles d'être sélectionnés alors que d'autres, altérant la réplication, désordre associé à la sénescence, ont plus de chance d'être éliminés. En revanche, des anomalies diffuses de la réparation, surtout si elles sont liées à l'anomalie d'une activité de type hélicase, pourraient aboutir à un ralentissement du cycle cellulaire, peut être relayé par le système p53 et p21^{WAF1/CIP1} (*m/s n° 6/7, vol. 10, p. 744*) (figure 2). De fait, l'intervention de cette voie p53/p21^{WAF1/CIP1} dans la sénescence en culture cellulaire a récemment été proposée [11-15]. Selon cette théorie, et malgré les apparences, l'altération des systèmes de réparation au cours de la sénescence ne pourrait pas être portée au crédit de la théorie des erreurs d'Orgel. Il n'empêche que ces résultats confirment le rôle essentiel de ces systèmes maintenant l'intégrité de l'ADN dans le destin des cellules et des organismes. Ce rôle est tout à fait cohérent avec une observation ancienne des spécialistes des mécanismes du vieillissement: au niveau cellulaire, l'alternative au vieillissement est le cancer, l'un et l'autre pouvant correspondre à des conséquences différentes d'une altération de la réparation du génome, bloquant réplication de l'ADN et division cellulaire dans les cellules sénescents et favorisant l'apparition de mutations oncogéniques dans le cancer.

Un autre aspect passionnant des résultats de Yu *et al.* [8] réside en la

manière dont ils ont été obtenus. La démarche générale est, certes, celle du clonage positionnel classique mais associée ici à une utilisation intensive du séquençage de très grands fragments d'ADN. Depuis 1992, on savait que le gène du syndrome de Werner, *WRN*, était localisé en 8p12. En 1994, la zone d'intérêt était rétrécie à 8,3 centimorgans, puis, progressivement, par des études génétiques classiques de liaison de marqueurs de plus en plus nombreux avec le *locus WRN*, à environ 1 mégabase. Cette région était alors analysée par toutes les méthodes disponibles de détection des séquences exprimées (pièges à exons, hybridation avec des banques d'ADNc) et par séquençage génomique et analyse informatisée des séquences par comparaison avec les EST (*expressed sequence tags*) connus, et mise à jour des exons potentiels en fonction de leurs caractéristiques. Ces exons potentiels étaient utilisés comme sondes pour isoler les ADNc correspondants de banques et des mutations étaient recherchées chez les malades atteints de syndrome de Werner. Ce n'est qu'après avoir séquencé 650 000 bases et testé une dizaine de gènes « candidats », 14 séquences exoniques et 3 régions promotrices potentielles que les auteurs parvinrent au gène *WRN*. Celui-ci se présenta tout d'abord sous la forme de trois exons présumptifs déjà séquencés dans un EST (c'est-à-dire un fragment de séquence d'ADNc déterminée au hasard et emmagasinée dans des banques de données [16]), à partir duquel de plus longs clones d'ADN furent isolés. Des messagers de 5,8 et 8,1 kb hybridaient avec cette séquence dans tous les tissus testés. Une séquence de 5,2 kb fut alors déterminée, et des mutations furent recherchées chez des malades et des témoins, caucasiens (c'est-à-dire blancs) et japonais. Quatre mutations furent détectées chez les malades et leurs familles: deux mutations ponctuelles non-sens, une délétion de 4 pb intéressant un site donneur d'épissage et aboutissant à un décalage de phase de lecture et, enfin, une mutation ponctuelle d'épissage d'un site donneur (de AG

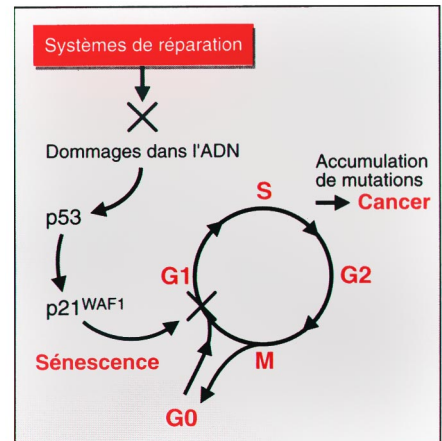


Figure 2. Schéma des relations possibles entre réparation de l'ADN, cancer et sénescence. En l'absence de systèmes de réparation efficaces, des altérations de l'ADN apparaissent, qui induisent l'activation de p53 et, par son intermédiaire, d'une cascade d'événements bloquant le cycle cellulaire en G1, ce qui est l'une des caractéristiques des cellules sénescents. Des inhibiteurs des complexes cycline/kinase dépendante du cycle (Cdk), tel p21^{WAF1/CIP1}, relaient cette action de blocage du cycle en G1. Si le cycle cellulaire continue malgré les lésions de l'ADN, il s'ensuit une fixation des mutations dont certaines pourraient être à l'origine de clones cancéreux. On ne sait pas ce qui oriente les conséquences d'anomalies de la réparation plutôt vers un blocage en G1, et une sénescence cellulaire, ou bien la cancérisation. Peut-être, et même probablement, la nature des systèmes impliqués joue-t-elle un rôle.

en AC) avec saut d'exon (*exon skipping*), aboutissant à une délétion de 95 pb et à un décalage de phase de lecture dans le messager. Cette dernière mutation est fréquente au Japon; elle a été montrée responsable de la maladie dans 18 des 30 familles de syndrome de Werner testées dans ce pays; elle a, de plus, été retrouvée à l'état hétérozygote chez un témoin. La protéine *WRN* de 1 432 acides aminés, a bien toutes les caractéristiques d'une hélicase, avec ses 7 domaines consensus dont le motif de liaison des nucléotides et la séquence Asp-Glu-X-His (DEXH). L'analogie au niveau de ces domaines est de 62 % à 64 % avec le

produit au gène *RECQL* humain et *recQ* de *E. coli*. La leçon à tirer de cette aventure singulière du clonage de gène *WRN* est donc bien la place croissante prise par la recherche « *in silicio* » (informatique) et la force brutale du séquençage intensif dans la découverte des gènes. Une raison de plus justifiant la décision, prise maintenant aux États-Unis et par les partenaires du programme international HUGO, de déclarer ouverte la campagne de séquençage du génome humain [17]. Tout indique qu'elle devrait pouvoir être achevée en une dizaine d'années ■

Axel Kahn

Directeur de l'U. 129 de l'Inserm, directeur du Laboratoire de Génétique et Pathologie Moléculaires. Inserm U. 129, Institut Cochin de Génétique Moléculaire, 24, rue du Faubourg-Saint-Jacques, 75014 Paris, France.

TIRÉS À PART

A. Kahn.

RÉFÉRENCES

1. Orgel LE. Ageing of clones of mammalian cells. *Nature* 1973; 243: 441-5.
2. Holliday R, Tarrant GM. Altered enzymes in ageing human fibroblasts. *Nature* 1972; 238: 26-30.
3. Kahn A, Guillozou A, Cottreau D, Marie J, Bourel M, Boivin P, Dreyfus JC. Accuracy of protein synthesis and *in vitro* aging. *Gerontology* 1975; 23: 174-84.
4. Harley CB, Pollard JW, Chamberlain JW, Stanners CP, Goldstein S. Protein synthetic errors do not increase during aging of cultured human fibroblasts. *Biochemistry* 1980; 77: 1885-9.
5. Shepherd JC, Wallford U, Hug P, Gehring WJ. Fruit flies with additional expression of the elongation factor EF-1 α live longer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 7520-1.
6. Hart RW, Setlow RB. Correlation between deoxyribonucleic acid excision repair and life span in a number of mammalian species. *Proc Natl Acad Sci USA* 1974; 71: 2169-3.
7. Sarasin A. La réparation de l'ADN au centre de la biologie de la cellule. *médecine/sciences* 1994; 10: 951-2.
8. Yu CE, Oshima J, Fu YH, Wijsman EM, Hisama F, Alisch R, Matthews S, Nakura J, Miki T, Ouais S, Martin GM, Mulligan J, Schellenberg GD. Positional cloning of the Werner's syndrome gene. *Science* 1996; 272: 258-2.
9. Burnet M. *Intrinsic mutagenesis: a genetic approach to ageing*. New York: Wiley, 1974.
10. Kruk P, Rampino N, Bohr V. DNA damage and repair in telomeres: relation to aging. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 258-2.
11. Noda A, Ning Y, Venable SF, Pereira-Smith OM. Cloning of senescent cell-derived inhibitors of DNA synthesis using an expression screen. *Exp Cell Res* 1994; 211: 90-8.
12. Kahn A. Cycle cellulaire, cancer, sénescence et p53. *médecine/sciences* 1994; 10: 206.
13. Wynford-Thomas D. Mutation de la p53 dans les cancers humains: existe-t-elle pour faire sauter l'obstacle de la sénescence cellulaire? *médecine/sciences* 1994; 10: 912.
14. Atadja P, Wong H, Garkavtsev I, Veillette C, Riabowol K. Increased activity of p53 in senescing fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 8348-2.
15. Bond JA, Blaydes J P, Rowson J, Haughton MF, Smith JR, Wynford-Thomas D, Wylie F. Mutant p53 rescues human diploid cells from senescence without inhibiting the induction of SDI1/WAF1. *Cancer Res* 1995; 55: 2404-9.
16. Jordan B. La valse des étiquettes. *médecine/sciences* 1995; 11: 273-6.
17. Marshall E, Pennisc E. NIH launches the final push to sequence de genome. *Science* 1996; 272: 188-9.

■■■■ BRÈVES ■■■■

■■■■ **Les souris transgéniques ayant reçu le gène de la chorée se portent bien.** La chorée de Huntington appartient à un groupe de maladies neurodégénératives à expansion de triplets CAG. On ignore encore le mécanisme biochimique des lésions neuronales, d'où l'intérêt des modèles animaux. Pour l'ataxie spino-cérébelleuse de type I (*m/s n° 8-9, vol. 9, p. 1003*), des manifestations analogues à celles de la maladie humaine sont apparues chez les souris transgéniques, mais sans qu'il soit possible de détecter la moindre trace de la protéine mutée dans les lysats de tissu cérébelleux. On sait aussi que les sujets homozygotes pour la chorée de Huntington ne sont pas plus atteints que les hétéro-

zygotes (*m/s n° 6, vol. 3, p. 370*). Des souris transgéniques ayant reçu la totalité de l'ADNc du gène *HD* (*m/s n° 4, vol. 9, p. 488*) avec 44 répétitions ont été suivies pendant un an [1]. Aucune modification n'est apparue ni dans leur comportement, ni dans leurs tissus cérébraux. Bien que l'ARNm *IT15* soit fortement exprimé, aucune trace de la protéine humaine n'a pu être décelée dans le cerveau de ces souris. Des études *ex vivo* suggèrent que la présence dans le transgène de 150 kb de UTR5' a entraîné la répression de la transcription. Il reste donc encore beaucoup à faire pour comprendre le mécanisme pathogénique de cette grave maladie humaine. L'absence de troubles neurologiques chez les

souris transgéniques renforce cependant l'idée que l'expansion des polyglutamines joue un rôle déterminant dans la survenue des lésions neurologiques chez l'homme. Par ailleurs, la transmission de la séquence CAG est remarquablement stable chez l'animal transgénique: la descendance des souris a permis d'étudier 97 méioses: une seule amplification fut observée, et encore, celle-ci n'était que d'un seul triplet. L'instabilité de la séquence CAG doit donc dépendre de facteurs génomiques qu'il est important de rechercher.

[1. Goldberg YP, et al. *Hum Mol Genet* 1996; 5: 177-85.]