

Université de Montréal

**Implication de NF- κ B et BMI1 dans la production de cytokines pro-inflammatoires
dans un modèle de neurodégénérescence**

Par

Asmae Moursli

Programme de biologie moléculaire

Option : maladies complexes chez l'humain

Faculté de médecine et faculté des études supérieures

Thèse présentée à la faculté des études supérieures en vue de l'obtention
d'une maîtrise en biologie moléculaire

Mars 2021

Asmae Moursli 2021

IDENTIFICATION DU JURY

Université de Montréal
Faculté des études supérieures
Faculté de médecine
Programme de biologie moléculaire

Ce mémoire intitulé

**Implication de NF- κ B et BMI1 dans la production de cytokines pro-inflammatoires
dans un modèle de neurodégénérescence**

Présenté par

Asmae Moursli

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Frédérick Antoine Mallette
President-rapporteur

Dr. Gilbert Bernier
Directeur de recherche

Dr. Nicolas Pilon
Membre du jury

RÉSUMÉ

Les maladies neurodégénératives regroupent un ensemble de neuropathologies qui se caractérisent par le dysfonctionnement progressif des neurones et leur perte irréversible au niveau du système nerveux central. Parmi ces maladies figure la maladie d'Alzheimer (MA) qui est une des conditions neurodégénératives la plus fréquente. Bien qu'aucune étiologie n'ait encore été identifiée, le vieillissement est par conséquent le principal facteur de risque de la MA. Grâce aux recherches réalisées sur le vieillissement, des caractéristiques de changements cellulaires et biochimiques, comme la sénescence cellulaire et l'*inflammaging*, ont été associées à ce phénomène. La sénescence cellulaire qui se définit par un état d'arrêt du cycle cellulaire pourrait aggraver une maladie neurodégénérative, entre autres par le biais de phénotypes sécrétoires associés à la sénescence. L'implication du proto-oncogène BMI1 dans la régulation du cycle cellulaire et la sénescence a été démontrée à travers son inhibition du locus *INK4/ARF*. De plus, une déficience en BMI1 a été rapportée dans des neurones de certains patients avec la MA, et elle est également associée à une neurodégénérescence précoce. Le complexe NF-κB participe à l'expression d'un large éventail de gènes de cytokines pro-inflammatoires impliquées dans les processus de l'*inflammaging* et de la sénescence cellulaire. Cependant, l'implication conjointe de BMI1 et de NF-κB dans les processus de neurodégénérescence demeure peu connue. Compte tenu de ce contexte, dans le cadre de ce projet de maîtrise, nous avons voulu explorer l'implication conjointe des molécules BMI1 et de la voie canonique du facteur NF-κB dans la production de cytokines pro-inflammatoires en utilisant des modèles *in vivo* et *in vitro* reproduisant un phénotype de neurodégénérescence similaire à la maladie d'Alzheimer. Nos résultats indiquent qu'une déficience en BMI1 est corrélée à une inactivation du facteur NF-κB aussi bien dans des neurones *in vitro* qu'*in vivo* ainsi qu'à une baisse de l'expression des cytokines IL6 et IL8. Bien que nous présentions des résultats générés à partir d'expériences non dupliquées, ils convergent tout de même vers des conclusions similaires à celles obtenues au niveau de pathologies cancéreuses. Ainsi notre projet apporte une information additionnelle qui pourrait servir à la compréhension des mécanismes sous-jacents au phénomène de l'*inflammaging* dans la neurodégénérescence.

Mots clés : Neurodégénérescence, maladie d'Alzheimer, sénescence, phénotypes sécrétoires associés à la sénescence (PSAS), BMI1, NF-κB, *inflammaging*.

ABSTRACT

Neurodegenerative diseases are a group of neuropathologies characterized by the progressive dysfunction of neurons and their death in the central nervous system. Among these diseases, Alzheimer's disease (AD) is the most common one. Although no aetiology has yet been identified, aging is therefore the main risk factor for AD. Thanks to several research work on aging, cellular characteristics and biochemical changes, such as senescence and inflammaging, have been associated with this phenomenon. Senescence, which is defined as a state of cell cycle arrest, could worsen neurodegenerative diseases throughout senescence associated secretory phenotypes. The involvement of the proto-oncogene BMI1 in cell cycle regulation and senescence has been demonstrated through its inhibition of the INK4/ARF locus. Additionally, BMI1 deficiency has been reported in neurons of AD patients, and it is also associated with early neurodegeneration. The NF- κ B complex participates in the expression of a wide range of pro-inflammatory cytokine involved in the processes of inflammaging and cellular senescence. However, little is known about the joint involvement of BMI1 and NF- κ B molecules in neurodegeneration processes. Given this context, within the framework of this master's project, we wanted to explore the combined implication of BMI1 and the canonical pathway of the NF- κ B factor in the production of pro-inflammatory cytokines using *in vivo* and *in vitro* models reproducing a neurodegenerative phenotype similar to Alzheimer's disease. Our results indicate that a deficiency in BMI1 is correlated to an inactivation of the NF- κ B expression both *in vitro* and *in vivo* neurones, as well as with a decrease in the expression of cytokines IL6 and IL8. Although we present results generated from unduplicated experiments, they nonetheless converge towards similar conclusions obtained in studies carried out on cancerous pathologies. Thus, our project provides additional information that could help to understand the mechanisms underlying the inflammaging phenomena in neurodegeneration.

Keywords: Neurodegeneration, Alzheimer's disease, cellular senescence, senescence-associated secretory phenotype (SASP), BMI1, NF- κ B, inflammaging.

TABLE DES MATIÈRE

IDENTIFICATION DU JURY	2
RÉSUMÉ	3
ABSTRACT.....	4
LISTE DES FIGURES	7
LISTE DES TABLEAUX.....	10
LISTE DES SIGLES ET ABREVIATIONS	11
REMERCIEMENTS	14
AVANT-PROPOS.....	15
RAISONNEMENT SCIENTIFIQUE	18
La maladie d'Alzheimer	18
1. Définition	18
2. Physiopathologie	18
3. Facteurs de risques	21
Rôle de la sénescence cellulaire dans le vieillissement et la neurodégénérescence et ses mécanismes d'induction	23
Rôle du facteur NF- κ B dans l' <i>inflammaging</i> dans un contexte de neurodégénérescence	28
Rôle du BMI1 dans la neurodégénérescence et la sénescence.....	32
PROBLÉMATIQUE ET OBJECTIF	37
MATERIEL ET MÉTHODE.....	38
Cultures cellulaires <i>in vitro</i>	38
1. Cultures primaires <i>in vitro</i> de neurones humains post-mitotiques.....	38
2. Culture <i>in vitro</i> de cellules immortalisées de type HEK293T.....	41
Délétion du gène BMI1 avec la technologie CRISPR/cas9	41
Inhibition de BMI1	42
Inhibition de la voie NF- κ B avec la molécule <i>caffeic acid phenethyl ester</i> (CAPE)	42
Extraction des protéines à partir de cultures cellulaires	43
Immuno-buvardage	44
Extraction de l'ARN à partir de cultures cellulaires et RT-qPCR.....	44
RESULTATS ET DISCUSSION	45
Résultats.....	45
L'inhibition de la voie NF- κ B dans les HEK293T induit une diminution de l'expression de BMI1.....	45

La perte de fonction génique de BMI1 et l'inhibition du BMI1 au niveau de HEK293T induisent une diminution de p65-totale et de l'IL8	46
La stimulation de la voie NF-κB induit une activation de p65 uniquement au niveau des échantillons HEK293T déficients en BMI1	47
Régression du réseau de connexions dendritiques et diminution des ramifications axonales des neurones matures post-mitotiques après 45 jours de culture <i>in vitro</i>.....	49
L'amputation du gène BMI1 au niveau de neurones matures post-mitotiques induit une diminution de p65-Totale	52
Au niveau de neurones mature <i>in vitro</i>, la déficience en BMI1 n'est pas associée à une production d'IL6 et IL8.....	54
L'amputation du gène BMI1 au niveau de neurones matures post-mitotiques est également corrélée à une absence de l'activation de STAT3.....	55
L'inhibition du BMI1 n'induit pas la production de la cytokine IL8 au niveau de neurones matures.....	56
La déficience en BMI1 dans des neurones matures post-mitotiques n'induit pas l'activation de p38MAPK	56
Les cerveaux de souris déficients en <i>Bmi1</i> (<i>Bmi1</i>^{+/-}) présentent une déficience en p65-totale lorsque comparés aux souris <i>Bmi1</i>^{+/+} indépendamment de l'âge.....	58
Discussion	60
CONCLUSION	66
ANNEXES	67
RÉFÉRENCES.....	68

LISTE DES FIGURES

Liste des figures	Pages
Figure 1: Image microscopique (10x) du circuit de connexion neuronale de cellules humaines matures et mises en culture in vitro en 3D. Source: A.Moursli_Labo G.Bernier_CRHMR-Mars.2020.	19
Figure 2: Formation de plaques séniles de β amyloïde et d'enchevêtrements neurofibrillaires qui mènent à une apoptose neuronale. Créé avec https://biorender.com	20
Figure 3: Image d'une TDM montrant une atrophie cérébrale au niveau d'un cerveau d'un patient avec la MA. Source: Nutt D., Imperial College London.	21
Figure 4: Figure reproduisant les caractéristiques moléculaires de la sénescence et les effets bénéfiques comme délétères des cellules sénescents sur leur micro-environnement. Source : adapté à partir de Domhnall M. et al. Senescence and aging 2017 and Martiez M. et al. Experimental Gerontology, 2016. Créé avec https://biorender.com	26
Figure 5: Mécanismes d'activation de l'arrêt du cycle cellulaire et induction de la sénescence cellulaire. Source: Figure reproduite de Herranz N. et al. J. of clinical invest. 2018. Créé avec https://biorender.com	28
Figure 6: Activation de la voie canonique de NF- κ B. Sources: Feng-Sheng Shih et al. 2011, Lawrence T 2009; Salminen A. et al. 2011. Créé avec https://biorender.com	31
Figure 7: Composition du nucléosome et fonction de BMI1 au sein du complexe PRC1	34
Figure 5: Inhibition du locus <i>INK4/ARF</i> par BMI1 démontrant une fonction anti sénescence. Source : Figure reproduite de Herranz N. et al. J. of clinical invest. 2018. Créé avec https://biorender.com	35
Figure 6: Activation du locus <i>INK4/ARF</i> au niveau de cellule souches et progénitrices hématopoïétiques. Source : Yan Liu et al.2013. Créé avec https://biorender.com	36
Figure 7: Étapes de différenciation des cellules humaines embryonnaires en neurones matures post-mitotiques. Créé avec https://biorender.com	40
Figure 8: Analyse par immuno-buvardage de l'expression du BMI1 et de p65-totale suite à l'inhibition du facteur NF- κ B au niveau de cellules HEK293T après 24h d'incubation à différentes concentrations de la CAPE.	45
Figure 9: Analyse par immuno-buvardage de l'expression de p65-totale au niveau de cellules HEK293T suite au <i>knockout</i> du BMI1 avec CRISPR/cas9.	46
Figure 10: Analyse par RT-qPCR de l'expression de l'IL8 et de p65-totale dans une population de cellules HEK293T déficientes en BMI1 comparé à un contrôle.	47

- Figure 11:** Analyse par immuno-buvardage de l'activation de la voie canonique du facteur NF- κ B avec la LPS au niveau de cellules HEK293T. 48
- Figure 12:** a) Image microscopique (4x) : les flèches rouges indiquent la formation de neurosphères. b) Image microscopique (10x) : la flèche jaune indique le début des projections axonales qui partent à partir des neurones pour se connecter à d'autres corps cellulaires. c) Image microscopique (20x) : grossissement de la même neurosphère qui permet une meilleure visualisation de l'accumulation en trois dimensions de corps cellulaires et les projections axonales. Source : A.Moursli_Labo G.Bernier_CRHMR_Mars2020. 50
- Figure 13:** Image microscopique (10x) indiquant le pic de développement du réseau dendritique et axonale des cultures en 3D de neurones à 45 jours de maturité post-mitotique. Source : A.Moursli_Labo G.Bernier_CRHMR_Mars2020. 50
- Figure 14:** Image microscopique (4x) indiquant la régression progressive du réseau dendritique et axonal autour de 50 à 60 jours de cultures en 3D de neurones post-mitotiques. Source :A.Moursli_CRHMR_Mars2020. 51
- Figure 15:** Image microscopique (4x) indiquant la disparition complète du réseau dendritique et axonal à environ 85 jours de culture *in vitro* de neurones post-mitotiques. Source : A.Moursli_Labo G.Bernier_CRHMR_Mars2020. 51
- Figure 16:** a) Image microscopique (10x) de neurones matures *Scrambled* (contrôle) à 59 jours de culture. b) Image microscopique (10x) montrant une régression du réseau axonal et dendritique de manière prématurée comparativement au groupe contrôle, 24h suivant la troisième transfection avec le mix CRISPR/cas9/gRNA. Source: A.Moursli_Labo G.Bernier_CRHMR_Mars2020. 52
- Figure 17:** Analyse par immuno-buvardage des résultats de la délétion du gène BMI1 au niveau de neurones matures post-mitotique. La délétion du gène BMI1 induit une baisse de l'expression de p65-totale de près de 80% comparé au groupe de neurones contrôle (*Scrambled*). 53
- Figure 18:** Analyse par RT-qPCR des résultats de la délétion du gène du BMI1 avec CRISPR/cas9. Absence de l'expression des ARN messagers des sous unités p50 et p65 au niveau des neurones déficients en BMI1. 54
- Figure 19:** Analyse par RT-qPCR de l'expression des IL6 et IL8 au niveau de neurones matures post-mitotiques suite à la délétion du gène BMI1 avec CRISPR/cas9. 54
- Figure 20:** Analyse par immuno-buvardage des résultats du knockout de BMI1 au niveau de neurones matures post mitotiques indiquant qu'une déficience en BMI1 se traduit par une inactivation des facteurs stat3 et NF- κ B. 55
- Figure 21:** Analyse par RT-qPCR de l'expression de l'IL8 au niveau de neurones matures post-mitotiques suite à l'inhibition de BMI1 avec un plasmide (shBMI1). 56

Figure 22: Analyse par immuno-buvardage des résultats de l'inhibition de BMI1 au niveau de neurones matures post mitotiques âgés entre 50 et 60 jours, indiquant une absence de l'activation de p38MAPK au niveau du groupe traité. **57**

Figure 23: Analyse par immuno-buvardage de l'expression de p65-totale au niveau de cerveaux de souris *Bmi1*^{+/-} indique une déficience en p65 comparé au cerveau de souris *Bmi1*^{+/+}. **59**

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Âge et géotypages des souris utilisées dans le cadre du projet.....43

LISTE DES SIGLES ET ABREVIATIONS

%	Pourcentage
°C	Degrés Celsius
53BP1	<i>p53 binding protein 1</i>
AD	<i>Alzheimer disease</i>
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
APOE	Apolipoprotéine E
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ATM	<i>Ataxia telangiectasia mutated</i>
ATR	<i>Ataxia telangiectasia and Rad3 related</i>
BACE1-2	<i>β-site APP cleaving enzyme 1-2</i>
BAX	<i>BCL2 Associated X, Apoptosis Regulator</i>
BMI1	<i>B-cell-specific Moloney leukemia virus insertion site 1</i>
BRCA1,2	<i>Breast cancer susceptibility gene 1, 2</i>
BSA	<i>Bovine serum albumins</i>
CAPE	<i>Caffeic acid phenethyl ester</i>
CDC25	<i>Cell division cycle 25</i>
CDK4-6	<i>Cyclin-dependent kinase 4-6</i>
CHK1-2	<i>Checkpoint kinase 1-2</i>
Chr.1-14-21	Chromosome 1, 14 et 21
CRISPR/cas9	<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/cas9</i>
CXCLs	<i>Chemokine C-X-C motif Ligands</i>
DDR	<i>DNA damage response</i>
DMEM/F12	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12</i>
DSB	<i>Double strand break</i>
DSMIV	<i>Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders IV</i>
FOXP1	<i>Forkhead box protein G1</i>
H2Aub	<i>Histone 2 A monoubiquitination</i>

H2A, H2B, H3 et H4	Histones des classes H2A, H2B, H3 et H4
HEK293T	<i>Human embryonic kidney 293 cells</i>
HUES9	<i>Human embryonic stem cell line 9</i>
H9	<i>Human embryonic stem cell line</i>
IL6	Interleukine 6
IL8	Interleukine 8
Ink4/ARF	<i>Inhibitors of CDK4/Alternative reading frame</i>
KO	<i>Knock out</i>
KD	<i>Knock down</i>
LOAD	<i>Late Onset Alzheimer Disease</i>
LPS	Lipopolysaccharide
MA	Maladie d'Alzheimer
MAP	<i>Microtubule associated protein</i>
MAPKAPK3	<i>MAP kinase-activated protein kinase 3</i>
MDC1	<i>Mediator of DNA damage checkpoint protein 1</i>
MDM2	Murine double minute 2
MSK1-2	<i>Mitogen and stress activated kinase 1-2</i>
mTOR	<i>Mechanistic Target Of Rapamycin</i>
NBS1	Protéine Nebrin
NF-κB	<i>Nuclear Factor-kappa B- Transcription factor</i>
OMS	Organisation mondiale de la santé
PCR1-2	<i>Polycom Repressive Complex 1-2</i>
PcG	<i>Polycom Group</i>
PPA	Protéine précurseur de l'amyloïde
p16	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A- multiple tumor suppressor 1</i>
p21CIP1	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 1</i>
p50	Protéine 50 sous unité du facteur NF-κB
p52	Protéine 52 sous unité du facteur NF-κB
p53	<i>Tumor protein 53- Transcription factor</i>
Rb	<i>Retinoblastoma protein</i>
p65	Facteur de transcription p65
p-p38	Phosphoprotéine 38

P38MAPK	<i>Mitogen activated protein kinase</i>
PAMPs	<i>Pathogen-associated molecular patterns</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PRR	<i>Pattern recognition receptor</i>
PSEN 1-2	<i>Préséniline 1-2</i>
qRT-PCR	<i>Quantitative Reverse Transcription polymerase chain reaction</i>
RBBP8	<i>Retinoblastoma-binding protein 8</i>
RelA	<i>V-rel avian reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TBS-T	<i>Tris-buffered saline-Tween</i>
SA-β-gal	<i>Senescence-associated β-galactosidase</i>
SAHF	<i>Senescence-associated heterochromatin foci</i>
SASP	<i>Senescence-associated secretory phenotypes</i>
Stat3	<i>Signal transducer and activator of transcription 3</i>
p-Stat3	<i>Phospho-Signal transducer and activator of transcription 3</i>
ShBMI1	<i>Small hairpin BMI1</i>
SIPS	<i>Stress-induced premature senescence</i>
SCSMC	<i>Système Canadien de surveillance des maladies chroniques</i>
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i>
TNFR	<i>Tumor necrosis factor receptor</i>
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
WB	<i>Western Blot</i>
WT	<i>Wild type</i>
WHO	<i>World Health Organisation</i>

REMERCIEMENTS

La motivation est souvent le moteur de la volonté, et il en faut certes beaucoup pour entreprendre des études supérieures. Mais voilà que parfois toute la motivation et la volonté du monde ne peuvent suffire à surmonter les différents obstacles qui peuvent se dresser à travers notre chemin. L'appui et l'aide que l'on peut recevoir des personnes qui croisent notre voie font souvent toute la différence. À cet égard, j'aimerais remercier certains membres de mon laboratoire avec qui j'ai travaillé, spécialement Dr. P. Nkanza, Boris, Roy, Andrea, Dre. V. Lachance, Benoit et Dounia. Je tiens particulièrement à exprimer ma gratitude à Dr. Bruno Larrivée et à sa merveilleuse équipe qui m'ont accueillie comme si j'étais une des leurs, particulièrement la Dre. C. Viillard et Kevin. Il est presque impossible de demeurer insensible à la patience, la générosité et l'esprit scientifique du Dr. Larrivée, sans oublier le respect qu'il a envers les étudiants et ses collègues; il est une véritable source d'inspiration. Mes remerciements vont aussi à Dr. Mike Sapieha et à son équipe qui ont toujours été là quand j'avais une question épineuse en lien avec une technique ou un protocole. Mes remerciements vont sans conteste aux Drs. Francis Rodier et Hugo Wurtele pour leurs conseils et soutien durant les dernières étapes de ma maîtrise. En gardant le meilleur pour la fin, mes remerciements vont à mes parents, à mon frère et à sa conjointe pour leur support moral et financier. Mon infinie gratitude va à une femme brave, intelligente et généreuse, soit ma mère. Elle m'a toujours poussée à donner le meilleur de moi-même, à continuer d'apprendre et à satisfaire cette curiosité insatiable pour les sciences et la médecine.

AVANT-PROPOS

L'objectif de ce projet de maîtrise a été d'étudier l'implication des molécules BMI1 et NF- κ B dans la production de cytokines pro-inflammatoires en utilisant des modèles *in vitro* et *in vivo* reproduisant un phénotype de neurodégénérescence similaire à la maladie d'Alzheimer.

La maladie d'Alzheimer est une des maladies neurodégénératives les plus fréquente et elle représente environ deux tiers des cas de démence¹. C'est une pathologie qui pose plusieurs défis tant au niveau de sa genèse que de son diagnostic précoce et de sa prise en charge thérapeutique². En 2010, le *Alzheimer's Disease International* (ADI) estimait l'impact économique mondial de la démence à environ 604 milliards \$³. Alors qu'en 2015, ce coût s'élevait à plus de 818 milliards \$³. Selon l'Organisation mondiale de la santé (OMS), environ 50 millions de personnes ont reçu un diagnostic de démence en 2019, soit une estimation de près de 10 millions de nouveaux cas par an. Malheureusement, l'impact de cette maladie est important non seulement sur la personne qui en souffre, mais également sur sa famille, le système de santé et la société en général. On reconnaît à la MA deux principales caractéristiques histopathologiques, soit la formation extracellulaire de plaques séniles de β amyloïde 42-43 et la formation intracellulaire d'enchevêtrements neurofibrillaires secondaires à l'excès de phosphorylation de la protéine Tau⁴. Plusieurs facteurs de risque génétiques comme non génétiques ont été associés au développement de la MA, cependant, aucune cause directe n'a encore été identifiée⁴. Le vieillissement est par conséquent, le facteur de risque le plus important associé à la maladie d'Alzheimer⁵. La sénescence cellulaire est un phénomène possédant des propriétés bénéfiques comme délétères sur les tissus pouvant aggraver une maladie neurodégénérative comme la MA⁶. Il a été démontré que les cellules sénescents exprimant la protéine inhibitrice du cycle cellulaire p16^{INK4A}, entraînaient activement la détérioration des tissus avec l'âge^{7,8} et contribuait à plusieurs maladies associées au vieillissement⁹. La protéine BMI1, membre du groupe des Polycomb (PcG), est justement impliquée dans la régulation du cycle cellulaire et la senescence¹⁰, à travers l'inhibition du locus *INK4/ARF*¹¹ et l'expression des protéines *p16INK4A* et *p14ARF*¹⁰. De plus, la déficience en BMI1 a été associée à la fois à des signes précoces de neurodégénérescence dans des modèles de souris^{12,13} mais également à la forme sporadique tardive de la MA dans des neurones de cerveaux de patients en post mortem¹⁴. Une des caractéristiques des cellules sénescents qui leur permet d'avoir un effet sur leur microenvironnement, est leur habilité à sécréter des molécules pro-

inflammatoires appelées phénotypes sécrétoires associés à la sénescence (PSAS)⁶. En effet, l'inflammation chronique est un des mécanismes biologiques majeur sous-jacent aux processus du vieillissement et des maladies dont le principal facteur de risque est le vieillissement¹⁵. Le facteur NF-κB en contrôlant la transcription des gènes de cytokines pro-inflammatoires en lien avec les PSAS a une fonction pro-sénescence¹⁶ et de ce fait, un rôle dans la médiation inflammatoire au niveau des tissus du cerveau et dans les phénomènes de *l'inflammaging* et la neurodégénérescence^{15,2}.

Compte tenu de l'implication des molécules BMI1 et NF-κB dans les phénomènes de vieillissement et de neurodégénérescence à travers leur rôles respectifs dans les processus de la sénescence et de *l'inflammaging*, nous nous sommes intéressés à leur interaction dans un contexte de neurodégénérescence.

Méthodologie: Afin de répondre à l'objectif de notre projet de recherche, nous avons étudié les variations de l'expression du facteur NF-κB dans un contexte de déficience en BMI1; *in vitro* au niveau de cellules immortalisées HEK293T et de neurones matures post-mitotiques, et *in vivo* au niveau de cerveaux de souris *Bmi1*^{+/-} et *Bmi1*^{+/+}. Pour ce faire nous avons utilisé la technique d'édition du génome CRISPR/cas9 pour des expériences d'inactivation génique (*knockout*) du BMI1 et des plasmides codant pour un *petit ARN en épingle à cheveux* (shRNA) dirigé contre BMI1. Nous avons également procédé à l'extraction de protéines à partir de cerveaux de souris *Bmi1*^{+/-} et *Bmi1*^{+/+} (WT) afin de quantifier l'expression de NF-κB. D'un autre côté, l'étude de l'expression du BMI1 dans un contexte de déficience en NF-κB, s'est basée sur l'inhibition chimique de la voie NF-κB avec la molécule CAPE au niveau de cellules HEK293T. Nous avons par la suite procédé à l'analyse de nos résultats d'expériences en utilisant des techniques de RT-qPCR et d'immunobuvardage.

Résultats : Les résultats obtenus indiquent que dans un contexte de déficience en BMI1 le facteur de transcription NF-κB est inhibé aussi bien au niveau de neurones matures post-mitotiques *in vitro* que dans les cerveaux de souris *Bmi1*^{+/-}. Nous observons aussi une baisse de l'expression des IL6 et IL8 aussi bien au niveau des cellules HEK293T qu'au niveau de neurones matures post-mitotiques avec un *knockout* ou une déplétion de BMI1. Nous observons aussi que l'inhibition de la voie NF-κB provoque une réduction de l'expression du BMI1 dans les cellules HEK293T. Ces

résultats suggèrent l'existence d'une relation entre BMI1 et le facteur de transcription NF- κ B et où BMI1 participerait à l'activation de la voie NF- κ B.

Conclusion et avantage du projet: La maladie d'Alzheimer est une condition de santé extrêmement débilitante. Son diagnostic précoce demeure impossible de même qu'il n'existe aucun traitement pouvant stopper son évolution. De plus en plus, on reconnaît aux processus inflammatoires chroniques de faible degré ou *l'inflammaging*, un rôle important dans la genèse de la démence, le déclin cognitif et d'autres phénotypes neurodégénératifs liés au vieillissement. Bien que dans le cadre de ce projet nous présentons des résultats générés à partir d'expériences non dupliquées, la motivation première de ce travail était d'apporter une information additionnelle qui pourrait servir à la compréhension des mécanismes sous-jacents aux phénomènes de *l'inflammaging* dans le contexte de la neurodégénérescence.

RAISONNEMENT SCIENTIFIQUE

La maladie d'Alzheimer

1. Définition

Décrite depuis plus de 100 ans par le Dr. Alzheimer, la maladie d'Alzheimer (MA) est une pathologie neurologique chronique du type dégénératif¹⁷. 95% des cas de MA sont du type sporadique tardif et se manifestent après l'âge de 65 ans⁴. Des études de cohortes prospectives telles que celle de Villemagne VL et al., suggèrent que la MA peut avoir un cours préclinique de plus de 20 ans avant même que les premiers symptômes cliniques de déclin cognitif ne se présentent¹⁸. Généralement, les sujets atteints de cette condition présentent une perte progressive de la mémoire à court terme suivi par la perte de la mémoire à long terme⁴. Des troubles de nature neuropsychiatrique telle que l'agitation, les hallucinations auditives où des épisodes de paranoïa peuvent également être observés chez certains patients⁴. Compte tenu du caractère non spécifique et très variable de la symptomatologie de la MA, un large éventail de pathologies neuropsychiatriques peuvent avoir la même présentation ce qui rend le diagnostic précoce souvent difficile à établir¹⁸.

2. Physiopathologie

Le cerveau humain est un organe complexe composé de plus de 100 millions de cellules nerveuses et gliales qui communiquent entre elles via des neurotransmetteurs^{4,19}. Cette communication a lieu au niveau de terminaisons axonales et dendritiques spécifiques connues par les boutons synaptiques. Le cerveau compte plus de 100 milliards de ces terminaisons synaptiques⁴. La communication entre les neurones à travers des connexions synaptiques est vitale et permet la diffusion de l'information à travers les circuits neuronaux afin de former la base cellulaire de la mémoire, la pensée, l'émotion, des mouvements, de l'apprentissage etc.⁴ (Figure 1).

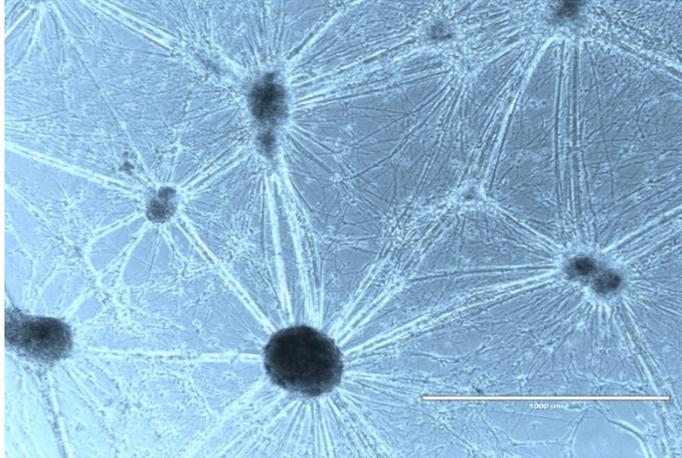


Figure 24: Image microscopique (10x) du circuit de connexion neuronale de cellules humaines matures et mises en culture in vitro en 3D. Source : A.Moursli_Labo G.Bernier_CRHMR- Mars.2020.

Au cours de la maladie d'Alzheimer, il se produit un remarquable déclin cognitif qui résulte de la dégénérescence progressive de la fonction cholinergique²⁰. Deux phénomènes histopathologiques cardinaux caractérisent la MA, soit l'accumulation extracellulaire anormale de plaques insolubles de bêta-amyloïde 42 et l'accumulation intracellulaire de neurofilaments de protéine Tau hyperphosphorylée²¹. De ce fait, l'intégrité du réseau neuroglial au niveau des régions corticales fronto-temporales, de l'hippocampe et du système limbique est perturbée⁴. La protéine précurseur de la bêta amyloïde (APP) est une large protéine localisée au niveau et autour de la membrane cellulaire des neurones. L'agrégation du peptide β amyloïde produit à partir du clivage de l'APP est non seulement toxique et interfère avec la signalisation cellulaire, mais peut également être impliquée dans le déclenchement d'un état chronique d'inflammation responsable de lésions neurologiques irréversibles²². De par leur action protéolytique séquentielle, deux principales enzymes sont impliquées dans la production de la β -amyloïde 42, la β -sécrétase (BACE1) « *β -site APP cleaving enzyme* » et la γ -sécrétase (BACE2)²².

En plus de la formation extracellulaire de plaque de β amyloïde, la phosphorylation anormale et excessive de la protéine Tau donne lieu à des enchevêtrements neurofibrillaires intracellulaires^{23,24}. Cette protéine fait partie d'un grand groupe de protéines qui interagissent avec la tubuline pour former les différentes structures intracellulaires du cytosquelette^{23,24}. Le cytosquelette, lui-même composé de protéines associées aux microtubules ou MAP, est l'élément central qui permet aux neurones du système nerveux central d'avoir de longues projections axonales²⁴ (Figure 2).

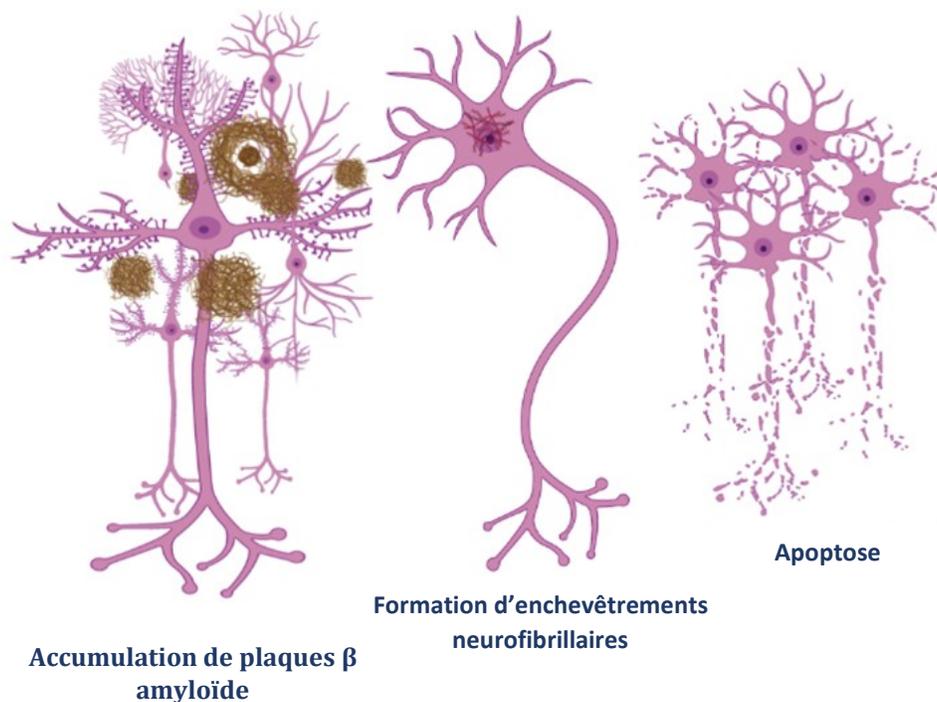


Figure 25: Formation de plaques séniles de β amyloïde et d'enchevêtrements neurofibrillaires qui mènent à une apoptose neuronale. Créé avec <https://biorender.com>

Dans la MA, outre l'effet toxique des plaques séniles et le dysfonctionnement neurotrophique, l'apoptose des neurones est la conséquence de l'activation de plusieurs voies de signalisations et de mécanismes biochimiques²⁰. Nous pouvons citer par exemple l'altération du transport microtubulaire, la diminution du métabolisme du glucose, la présence d'une excitotoxicité, le stress oxydatif, le dysfonctionnement mitochondrial et les processus inflammatoires²⁰. En effet, parmi la longue liste de facteurs déclenchant des mécanismes de la mort cellulaire figure la production de cytokines pro-inflammatoires telles que les TNF α et l'interleukine 1 β secondaire à l'activation de la voie NF- κ B^{20, 25}.

Au niveau anatomique, l'apoptose neuronale affecte à la fois la substance grise comme la substance blanche du cerveau et se traduit par une atrophie ou un amincissement de différentes régions du cerveau²⁶. Grâce aux images de tomographie par émission de positons et de résonance magnétique, l'atrophie du cortex cérébral a une distribution globale avec une prédominance au niveau des régions du lobe temporal²⁶ (Figure 3).

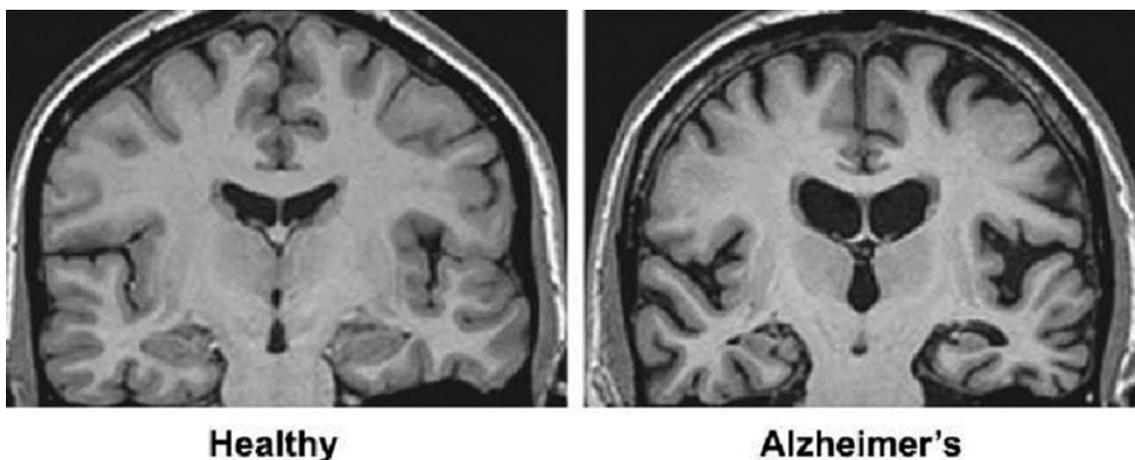


Figure 26: Image d'une TDM montrant une atrophie cérébrale au niveau d'un cerveau d'un patient avec la MA. Source: Nutt, D. Imperial College London (2017)¹⁴⁴.

3. Facteurs de risques

a. Facteurs de risques génétiques :

Jusqu'à nos jours aucun gène ou agent causal direct de la MA n'a été identifié. Néanmoins plusieurs mutations génétiques identifiées, peuvent augmenter le risque de développer aussi bien la forme héréditaire de la MA que la forme sporadique tardive de la MA. Par exemple, les variations génétiques de l'allèle apolipoprotéine E (apoE), localisé au chromosome 19, ont été associées à un risque élevé de développer la forme sporadique tardive^{21,27}. L'apoE est exprimée en quantités importantes principalement au niveau du foie et du cerveau²⁸. Elle joue un rôle important dans le métabolisme et le transport des lipides et du cholestérol²⁷. Au niveau du système nerveux central elle est principalement sécrétée par les cellules gliales (astrocyte et microglie) et en moindre quantité par les neurones²⁷. Chez l'être humain, l'apoE existe sous trois isoformes, les epsilon 2, 3 et 4 ($\epsilon 2$, $\epsilon 3$ et $\epsilon 4$)^{27,28}.

Bien que ces trois isoformes ne diffèrent entre eux qu'à travers un ou deux acides aminés, au résidu 112 ou 158, ces différences sont suffisantes pour induire d'importantes modifications aussi bien dans la structure que dans la fonction de l'apoE^{28,29}. Sur les trois isoformes de l'apoE, seule l'apoE $\epsilon 4$ est associée à un risque élevé de développement de la forme sporadique de la MA, avec une forte corrélation de dose-dépendance entre l'âge d'apparition des symptômes³⁰ et le degré du déclin cognitif³¹.

La deuxième forme de la MA est dite familiale et elle représente moins de 5% des cas, elle est héréditaire de manière autosomique dominante avec une pénétrance presque complète³². Les mutations rencontrées dans cette forme affectent le fonctionnement de la protéine précurseur de l'amyloïde (APP) (chr.21), de la préséniline 1 (PSEN1) (chr.14) et de la préséniline 2 (PSEN2) (chr.1)³². La trisomie 21 ou le syndrome de Down est également un autre facteur de risque génétique important associé à la MA³³. La majorité des patients souffrant de ce syndrome finissent par développer des troubles cognitifs accompagnés de changements neurologiques similaires à la MA dès l'âge de 40 ans car ils sont porteurs de trois copies du gène APP localisé au chromosome 21^{33, 34}.

b. Facteurs de risques non génétiques

b.1 Facteurs de risques modifiables : Il existe de plus en plus de données empiriques et probantes démontrant les effets bénéfiques associés à la modification de certains facteurs de risques liés aux habitudes de vie et qui permettent de réduire le risque d'apparition de la MA. Ces facteurs sont principalement associés au diabète sucré, au tabagisme, à l'obésité, à la dépression, à l'inactivité intellectuelle et physique, à l'hypertension artérielle, et au faible niveau de scolarité³⁵.

b.2 Facteurs de risques non modifiables liés à l'âge : La fascination de l'être humain pour la durée maximale passée sur terre, ou la longévité, trouve son origine en Afrique, il y a plus de 100 000 ans, avec l'émergence de la pensée complexe³⁶. Bien qu'une distinction existe entre la longévité et le vieillissement, dans les maladies neurodégénératives telle que la maladie d'Alzheimer, le vieillissement est le principal facteur de risque³⁷. Par exemple, en 2014, la prévalence de cette maladie chez les personnes âgées de 95 ans et plus était de 50% aux États Unis^{1, 37}. Il a aussi été démontré que le vieillissement altérait les fonctions cérébrales, comme la fonction cognitive dépendante de l'hippocampe et ce en dehors d'un contexte de pathologie neurodégénérative³⁸.

Le vieillissement, comme phénomène biologique inévitable, est associé à des changements aussi bien dans l'apparence physique que dans les fonctions des différentes structures tissulaires d'un individu ou d'un organisme³⁷. Au cours des dernières années, les recherches sur le vieillissement ont été marquées par des percées sans précédent, avec la découverte de voies génétiques, de processus biochimiques et de caractéristiques moléculaires impliqués dans le contrôle, dans une certaine mesure, du phénomène du vieillissement. Dans le cadre de ce mémoire nous allons aborder

deux de ces mécanismes moléculaires compte tenu de leur forte interconnexion et implication dans les processus physiopathologiques des maladies neurodégénératives; soit la sénescence cellulaire et l'*inflammaging*^{37,39}.

Rôle de la sénescence cellulaire dans le vieillissement et la neurodégénérescence et ses mécanismes d'induction

La sénescence cellulaire telle que décrite initialement par L.Hayflick et P.Moorehead au niveau des fibroblastes est un arrêt de la croissance et du cycle cellulaire. Au cours de ce phénomène, les cellules atteignent un stade de croissance maximale avec un arrêt de leur cycle et commencent à exhiber un phénotype sécrétoire associé à la sénescence (SASP)^{9,40,41}. Plusieurs études ont démontré que les cellules sénescents participaient aux dysfonctionnements tissulaires et contribuaient activement à l'accélération du processus de vieillissement. En effet, l'implication de la sénescence dans les processus du vieillissement a été expliquée par la «théorie de pléiotropie antagoniste»⁴². Selon cette théorie, élaborée par le biologiste George C. Williams en 1957, un processus biologique peut être à la fois bénéfique comme néfaste pour un organisme⁴². Dans l'optique de démystifier les mécanismes moléculaires sous-jacents aux effets du temps sur les tissus, Ng M. H. et al. démontraient en 2009, qu'il n'y avait aucune corrélation entre l'âge d'un donneur de fibroblastes et l'arrêt du cycle cellulaire de ces mêmes fibroblastes *in vitro* ou du déclin de l'activité de la télomérase. D'un autre côté, d'autres études démontraient que l'accumulation de cellules sénescents dans des tissus sains participait fortement au vieillissement de ces mêmes tissus *in vivo*^{43 44}. De plus, les cellules sénescents exprimant la protéine p16^{INK4A} qui induit un arrêt du cycle cellulaire, participeraient activement à la détérioration des tissus avec l'âge^{7,8,9} et au développement de plusieurs maladies associées au vieillissement comme l'athérosclérose^{45,9}. De nombreux travaux de recherche ont pu démontrer que l'accumulation de cellules sénescents au niveau de plusieurs tissus vieillissants ou avec une maladie chronique accélérât le déclin des fonctions tissulaires des organes touchés⁴⁶, néanmoins au niveau du cerveau les mécanismes cellulaires qui contribuent à la physiopathologie des maladies neurodégénératives est une question toujours à l'étude⁹.

D'autre part, toujours selon la « théorie de pléiotropie antagoniste », bien que la sénescence cellulaire soit fortement associée au vieillissement et à l'aggravation de certaines maladies chroniques et cancéreuses⁴⁷, on reconnaît également aux cellules sénescents un rôle bénéfique

dans différentes fonctions physiologiques⁴². Ces cellules, sont dans les faits néfastes uniquement lorsqu'elles s'accumulent et persistent au niveau des tissus⁴⁸. Alors que lorsqu'elles sont transitoires et systématiquement éliminées par les cellules immunitaires, elles contribuent positivement aux processus de cicatrisation, au développement embryonnaire, à la suppression des tumeurs et à la régénération des tissus et du système immunitaires^{49, 50, 51} (Figure 4).

Au niveau du cerveau de plus en plus d'études démontrent le rôle de la sénescence dans les phénomènes du vieillissement et des maladies neurodégénératives⁹. En effet, au cours de la sénescence, les neurones tout comme les cellules mitotiques, peuvent être soumis à de considérables remaniements et à de nombreuses altérations de leurs voies de sécrétion⁹. Il s'agit d'un processus homéostatique paradoxal qui participe au déclin du potentiel régénératif des tissus et de leurs fonctions⁵². Dans une récente étude, le groupe D. Moreno-Blas et al., démontre que les neurones, bien qu'ils soient non-mitotiques, acquièrent les mêmes caractéristiques de la sénescence que les cellules mitotiques et ce de manière plus précoce que les cellules gliales⁴⁸. Ces caractéristiques se traduisent par : une augmentation de la taille cellulaire et une accumulation de granules de stress au niveau du cytoplasme avec la formation de multiple vacuolisation⁵³; l'activation d'enzymes lysosomiales associées à la β -galactosidase (SA- β -gal), la persistance de dommages à l'ADN; l'accumulation de lipofuscine et l'expression des p16(*INK4A*) et p21(*CIP1/WAF1*)⁵⁴ et la sécrétion de phénotypes pro-inflammatoires associés à la sénescence⁹. De plus, la chromatine subit également des transformations étendues pour former des foyers surnommés foyers d'hétérochromatine associés à la sénescence « *senescence-associated heterochromatin foci* » (SAHF)⁵⁵.

Étant donné qu'initialement le phénomène de la sénescence cellulaire a été défini au niveau de cellules mitotiques, les principaux mécanismes d'induction qui ont été étudiés et rapportés en littérature concernent le passage d'une cellule d'un état mitotique à un état non mitotique. Cependant très peu d'études ont démystifié les mécanismes d'induction de la sénescence au niveau de cellules non mitotiques comme les neurones corticaux. De manière générale, la sénescence est une forme de réponse cellulaire à un stress qui peut être déclenchée par différents mécanismes ou agents. Dans le contexte de la *sénescence répllicative*, un des premiers mécanismes d'induction décrit, est principalement liée aux processus naturels de réplication et de division cellulaire^{44, 56}. Dans cette forme, l'érosion des télomères - des capuchons qui protègent l'extrémité des

chromosomes - a lieu à chaque cycle cellulaire ce qui active les voies de réponse aux dommages à l'ADN (DDR) et mène à l'arrêt de la croissance, de la différenciation et du cycle cellulaire^{44, 57}. Chez les humains comme les rongeurs, le déficit en télomérase se traduit par un raccourcissement des télomères et un début précoce de pathologies associées à la perte de la capacité régénérative des tissus⁵⁸. Au niveau du cerveau, Whittermore et al. 2019 démontre que le raccourcissement des télomères peut contribuer ou même causer un vieillissement cérébral à travers leur étude des effets potentiellement thérapeutiques de la télomérase sur les mécanismes moléculaires de la neurodégénérescence chez la souris⁵⁸.

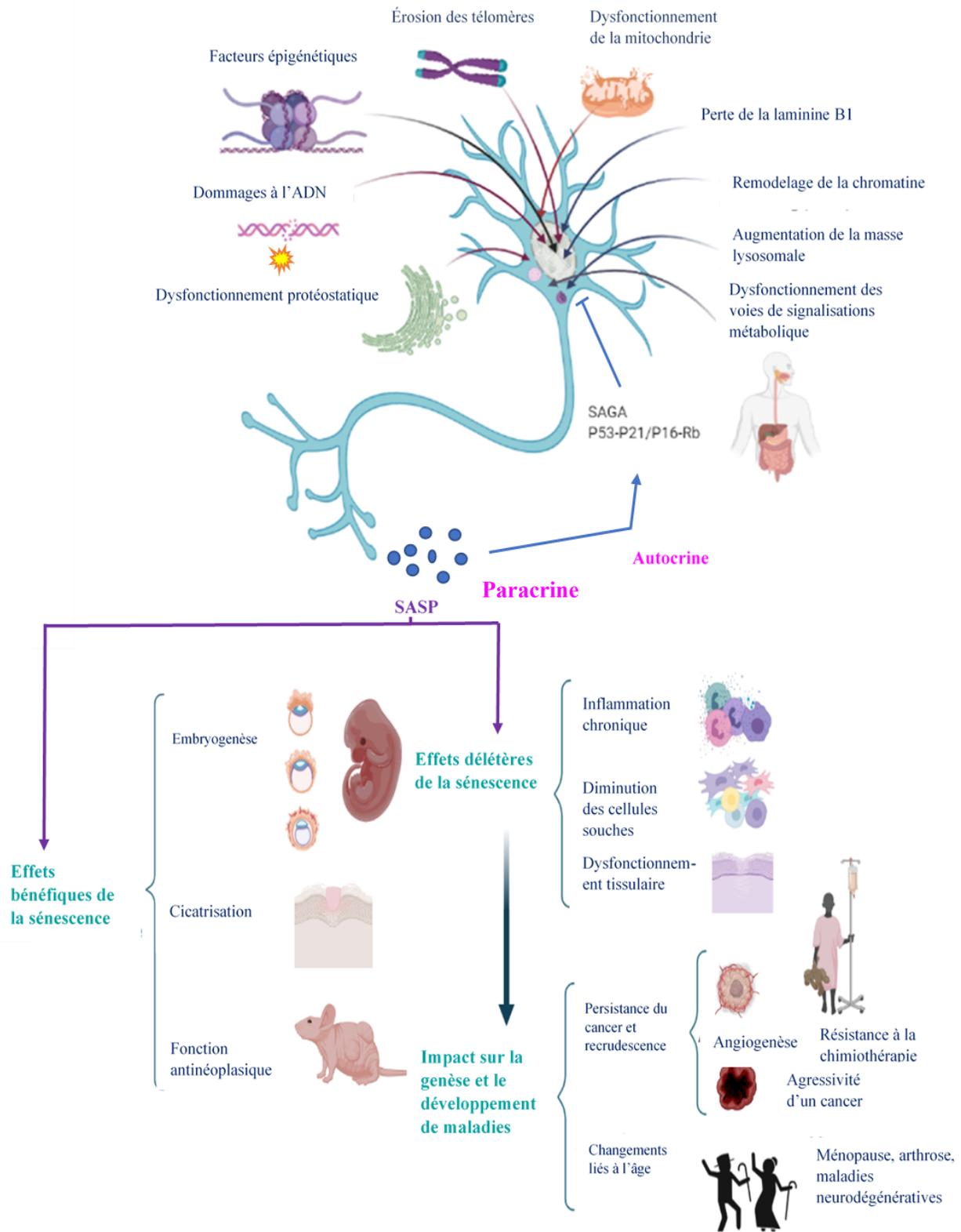


Figure 28: Figure reproduisant les caractéristiques moléculaires de la sénescence et les effets bénéfiques comme délétères des cellules sénescents sur leur micro-environnement. Source : adapté à partir de Domhnall M. et al. Senescence and aging 2017 and Martiez M. et al. Experimental Gerontology, 2016. Créée avec <https://biorender.com>

D'autres facteurs de stress, autre que la réplication, peuvent également induire une forme de sénescence au niveau des neurones et la plupart d'entre eux mènent à des dommages prématurés de l'ADN. Dans cette catégorie figurent les agents de chimiothérapie ou radiothérapie qui endommagent le double brin d'ADN à différentes localisations du génome et induisent des perturbations épigénomiques provoquant une instabilité de la chromatine⁵⁹. Les brisures du double brin d'ADN ou « *double strand break* » (DSB), sont les plus puissants inducteurs de la réponse aux dommages à l'ADN (DDR). L'accumulation de DSB est une cause d'induction de la **sénescence prématurée** et ce processus est connu sous le nom de SIPS « *Stress-Induced Premature Senescence* »⁶⁰. Plusieurs agents peuvent contribuer aux DSB, tels que les espèces réactives de l'oxygène (ROS), l'activation d'oncogènes, la persistance de signaux mitogènes, le stress réplicatif ou encore la radiothérapie⁴⁷ (Figure 5).

Donc que ce soit durant une sénescence répllicative ou prématurée, la majorité des inducteurs de sénescence finissent en bout de ligne par causer des dommages génomiques et épigénomiques. Au niveau des cellules mitotiques, l'arrêt du cycle cellulaire qui en résulte est le produit de l'activation des voies de suppression des tumeurs p53 / p21CIP1 et p16INK4a / Rb. Ainsi, on pense que la capacité des cellules sénescents à entrer en mode programmé d'arrêt du cycle cellulaire est principalement maintenue grâce à l'activation des protéines p53 et p16⁴¹. Ces protéines une fois phosphorylées inhibent les Cyclines E- CDK2 et les Cyclines D- CDK4/6, ce qui mène à une hypophosphorylation du Rb et un blocage du cycle cellulaire à la phase G1⁶¹. Comme mentionné précédemment, les facteurs de stress les plus connus qui activent la voie p53 sont également associés aux mécanismes de réponse aux dommages à l'ADN. Lorsqu'une cellule est exposée à une source intracellulaire ou extracellulaire provoquant une rupture du double brin d'ADN, ces dommages sont détectés par les kinases ATM (*Ataxia telangiectasia mutated*) et ATR (*Ataxia telangiectasia and Rad3-related protein*)^{62,63,64}. Ces kinases amplifient le signal de lésion et activent un groupe de médiateurs. Ces médiateurs, composés des protéines 53BP1, MDC1, CHK2, BRCA1, RBBP8 et CHK1 procèdent à leur tour à l'activation de p53 et à la stimulation du point de contrôle du cycle cellulaire. En tant que facteur de transcription, p53 une fois activée régule à la hausse l'expression de p21CIP1/WAF1⁴¹ et en même temps CHK1 et CHK2 inhibent l'activation du CDC25 (Figure 5).

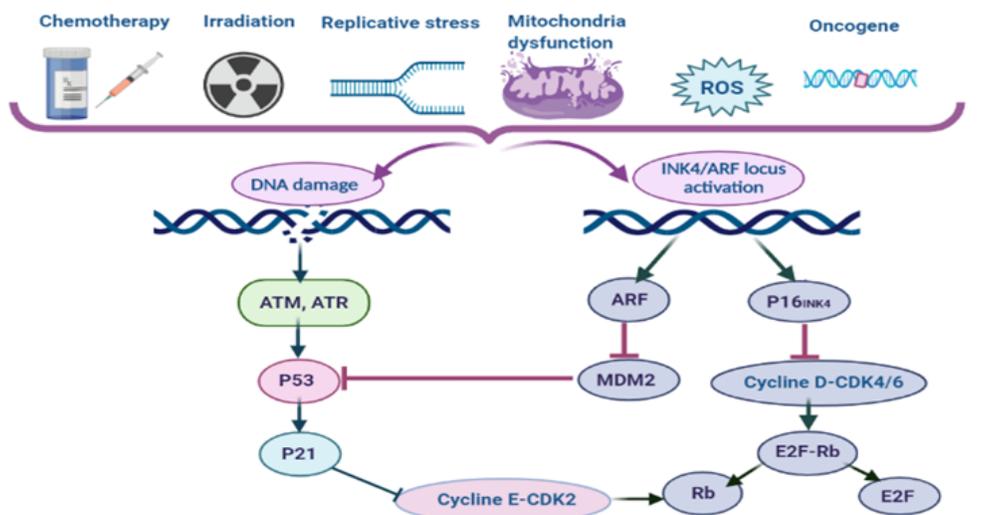


Figure 5: Mécanismes d'activation de l'arrêt du cycle cellulaire et induction de la sénescence. Source : Figure reproduite de Herranz N. et al. J. of clinical invest. 2018. Créée avec <https://biorender.com>

Rôle du facteur NF-κB dans l'*inflammaging* dans un contexte de neurodégénérescence

Dans de nombreux états physiologiques ainsi que pathologiques, l'inflammation est une caractéristique omniprésente avec le vieillissement⁶⁵. Chez les personnes âgées, l'inflammation peut avoir un profil chronique indépendamment de la présence ou non d'une maladie⁶⁵. Cet état chronique de l'inflammation, connu par la terminologie de l'*inflammaging*, est secondaire à plusieurs changements moléculaires, tel que la sénescence cellulaire, l'accumulation de débris cellulaires et les phénotypes sécrétoires associés à la sénescence^{65, 66}. En effet, en 2008, Campisi J. et al. démontraient que les cellules sénescents étaient capables de produire des molécules pro-inflammatoires et oncogéniques que le groupe a surnommé « *senescence-associated secretory phenotypes* » (SASP), soit les phénotypes sécrétoires associés à la sénescence⁶⁷. Il a été démontré qu'une activation continue de la réponse aux dommages à l'ADN au niveau des neurones donnait lieu à de multiples caractéristiques compatibles avec la sénescence cellulaire, y compris l'hyperproduction de phénotypes pro-oxydants, pro-inflammatoires et de remodelage de la matrice⁶⁸. Les neurones avec un type sénescents, peuvent influencer négativement leur microenvironnement à travers les molécules pro-inflammatoires qu'ils produisent et favoriser ainsi l'induction du même phénotype dans les cellules environnantes, ce qui mène à un vieillissement et à la genèse de maladies neurodégénératives liées à l'âge⁶⁹.

Dans une récente étude, D. Moreno-Blas et al. 2019, ont été capables de prouver que les neurones corticaux sécrètent des molécules du SASP avec des fonctions paracrines pouvant induire à la fois

la sénescence de fibroblastes embryonnaires de souris mais aussi et paradoxalement la prolifération de cellules gliales. Leurs observations portent à croire que les molécules qui sont sécrétées par les neurones corticaux sénescents de souris et de rats contribueraient à l'altération de l'organisation des tissus environnants. Autrement dit, les molécules du SASP produites par les neurones participeraient au maintien et à l'induction de la sénescence mais aussi à la prolifération du réseau glial⁴⁸. Ces résultats viennent renforcer les études antérieures faites au niveau des cellules mitotiques, et qui confèrent aux molécules SASP des propriétés bioactives qui ont un effet pro-inflammatoire sur la cellule et son microenvironnement⁷⁰.

Les mécanismes moléculaires sous-jacents à la production des SASP au niveau des cellules mitotiques ont fait l'objet de plusieurs études, cependant ces mécanismes demeurent toujours partiellement compris au niveau des neurones corticaux ou dans un contexte de neurodégénérescence. Au niveau des cellules mitotiques, la production de ces phénotypes est principalement régulée par le facteur de transcription NF- κ B⁷¹. En effet, de nombreuses études reconnaissent à la voie NF- κ B, principale acteur de la réponse immunitaire innée, une fonction clé dans la production des SASP⁶⁷. Aussi, le système immunitaire inné est de plus en plus impliqué dans la physiopathologie de nombreuses maladies chroniques telle que la maladie d'Alzheimer (MA)². Le rôle du facteur NF- κ B, dans les principaux facteurs de risque de la MA tel que le vieillissement, a été montré à travers les dommages causés par l'inflammation cérébrale spécifique des tissus médiés par le complexe NF- κ B chez des modèles vertébrés de la MA^{2, 72 73}. D'autre part, l'apolipoprotéine E4 (ApoE4), le principal facteur de risque génétique de la forme sporadique tardive de la MA est associé à une inflammation cérébrale accrue qui serait liée à une dérégulation de la voie de signalisation du facteur NF- κ B⁷⁴.

À cet égard, dans le cadre de ce projet de maîtrise, en prenant en considération le rôle important joué par le complexe NF- κ B dans les différents mécanismes physiopathologiques de la MA et la neurodégénérescence, nous nous sommes intéressées aux possibles facteurs activateurs ou répresseurs de la voie NF- κ B.

Le facteur nucléaire des chaînes légères Kappa amplificateur de lymphocytes B activées, ou en anglais « *Nuclear Factor Kappa-light-chain enhancer of activated B lymphocytes* » (NF- κ B), fait partie de la famille des facteurs de transcription que l'on retrouve dans plusieurs organismes vivants incluant les cellules mammaires⁷⁵. Il joue un rôle central dans la défense de l'hôte, les

réponses inflammatoires, le stress oxydatif, l'apoptose, la sénescence cellulaire et le vieillissement¹⁶. À l'instar des autres facteurs de transcription qui ont une localisation nucléaire, NF- κ B est localisé au niveau du cytoplasme et son action dépend de son activation et sa translocation au niveau du noyau⁷⁶. Le complexe NF- κ B est composé de 5 membres les RelA ou p65, cRel, RelB, p52 et p50, qui potentiellement peuvent former 15 dimères. Cependant la forme la plus répandue dans la majorité des cellules est l'hétérodimère composé des deux sous unités p50 et p65 (RelA) associées au facteur I κ B α ⁷⁷.

Deux principales voies de signalisation caractérisent le mode d'activation du facteur NF- κ B; la voie canonique et non canonique. Dans le cadre de ce projet nous nous sommes intéressées à la voie canonique car elle est impliquée dans les réponses inflammatoires et immunitaires innées; alors que la voie non canonique joue un rôle à la fois dans la différenciation et la maturation des cellules immunitaires mais aussi dans l'organogenèse lymphoïde et la genèse de maladies auto-immunes et immuno-cancéreuses⁷⁶.

La voie canonique peut être activée par le biais de différents stimuli allant des ligands de récepteurs de cytokines, aux membres de la superfamille de récepteurs TNF (TNFR), en passant par les récepteurs des lymphocytes T (TCR) et B et les récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (PRR) dont font partie les récepteurs Toll-like (TLR)⁷⁸. Dans la voie canonique le facteur NF- κ B est séquestré au niveau du cytoplasme à travers sa liaison avec l'I κ B α , une Kinase membre de la famille des I κ B. Lorsque la kinase I κ B est activée, cela mène à la phosphorylation des sérines 32 et 36 de I κ B α ⁷⁹. Suite à ces phosphorylations, I κ B devient une cible pour l'ubiquitination ce qui mène à sa dégradation par le complexe 26S protéasome⁸⁰. La dégradation de l'I κ B α est le premier évènement qui marque l'activation du facteur NF- κ B. Une fois dans le noyau, l'hétérodimère NF- κ B va reconnaître la région promotrice du gène cible en se liant au site κ B⁸¹ (Figure 6).

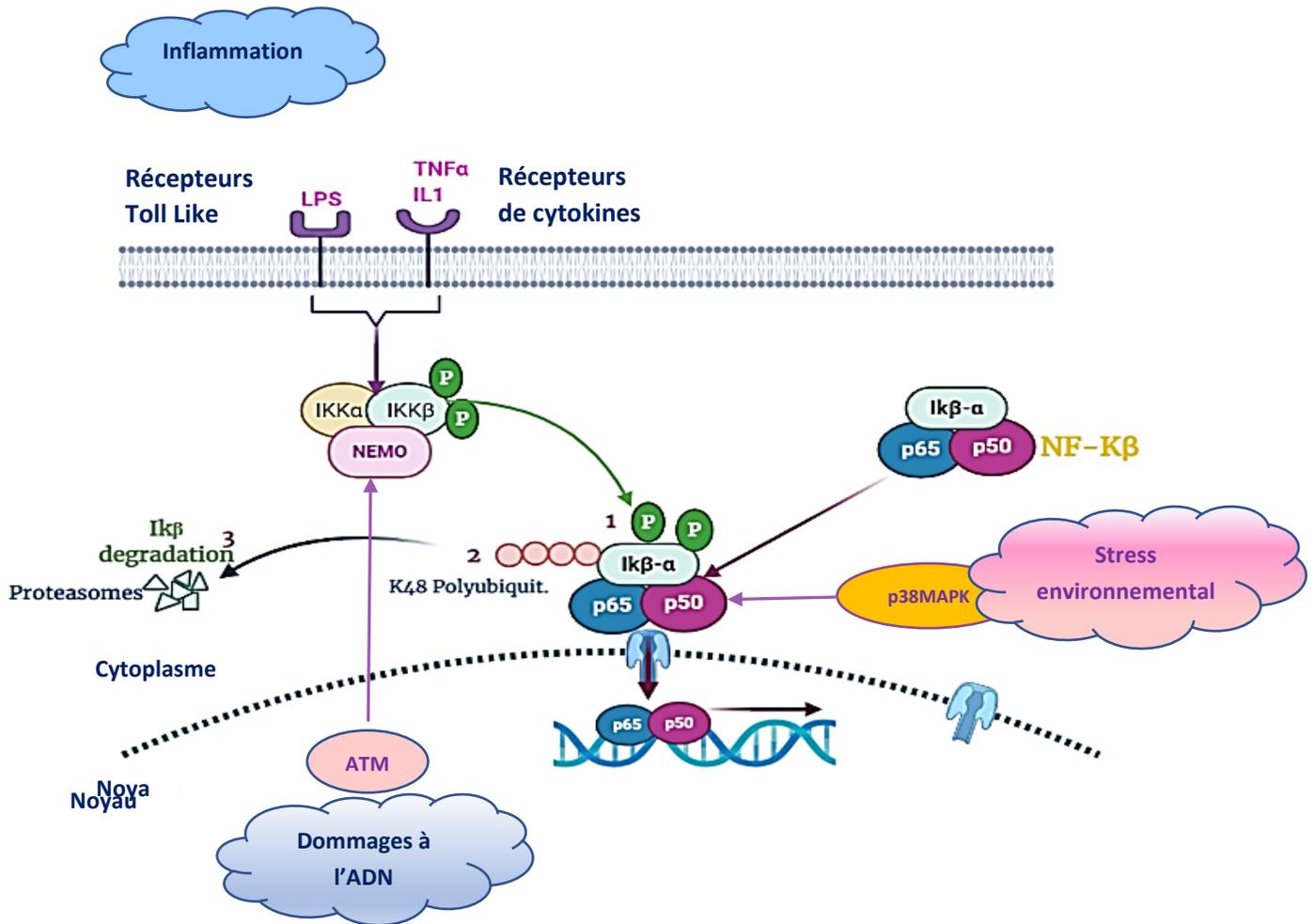


Figure 6: Activation de la voie canonique de NF-κB. Sources: Feng-Sheng Shih et al. 2011, Lawrence T. 2009; Salminen A. et al. 2011. Créée avec <https://biorender.com>

La production de phénotypes pro-inflammatoires associées à la sénescence ou à *l'inflammaging* répond à un modèle hautement organisé et hiérarchisé qui est déclenché suite à l'activation des récepteurs cytokines et PRR de la voie NF-κB¹⁶. Une fois activé, le facteur de transcription NF-κB contrôle et induit la transcription de gènes cibles qui ont été classifiés en deux groupes^{82,55}. Un groupe de gènes impliqués dans la réponse primaire suite à l'activation de la voie NF-κB et un groupe impliqué dans la réponse secondaire et qui requièrent plus de cofacteurs afin d'initier la transcription⁸². Parmi ces gènes nous retrouvons ceux de plusieurs molécules pro-inflammatoires, tels que les IL6, IL8 et MCP1. Ces gènes font partie du deuxième groupe de gènes ciblés par le complexe NF-κB qui nécessitent une première activation de IκBα⁵⁵. Il s'agit d'un système d'activation qui fonctionne en boucle dès que les IL1α et IL1β qui sont produits par une cellule

sénescence, se lie aux récepteurs IL1r et déclenchent la cascade qui mène à la dégradation de la kinase Ik β ⁷¹. Ce mécanisme d'activation est aussi observé avec les inflammasomes, acteurs clés de la réponse immunitaire innée et de la défense contre les agents pathogènes et les dommages cellulaires⁸³. Les inflammasomes régulent l'activation de la production des phénotypes pro-inflammatoires associés à la sénescence à travers une activité protéolytique de la *cysteine-aspartic protease* Caspase 1, une fois qu'ils ont activé les récepteurs PRR dont font partie les récepteurs Toll-Like^{71,84}. Ces récepteurs ont la particularité de reconnaître des modèles moléculaires associés aux agents pathogènes ou en anglais « *pathogen-associated molecular patterns* » (PAMPs). Au niveau du système nerveux central les récepteurs PRR ont une distribution cellulaire ubiquitaire. On les retrouve aussi bien au niveau des cellules gliales qu'au niveau des neurones corticaux. Étant donné que dans un contexte de sénescence cellulaire, ces récepteurs jouent un rôle important dans la voie d'activation du facteur NF- κ B, nous nous sommes particulièrement intéressés à l'activation des récepteurs Toll-like en utilisant des molécules telles que les lipopolysaccharide (LPS). De plus, comme les phénotypes sécrétoires pro-inflammatoire associés à la sénescence ou *l'inflammaging* représentent un large éventail de molécules telles que les interleukines, chimiokines, protéases et facteurs de croissance^{16,55,66,65}, dans le cadre de notre projet nous avons concentré nos expériences et nos analyses sur les interleukines IL6 et IL8, qui sont les gènes cibles du facteur de transcription NF- κ B.

Rôle du BMI1 dans la neurodégénérescence et la sénescence

Au niveau du système nerveux, outre les processus transcriptionnels, la régulation de l'expression génique dépend également de modulations contrôlées par des mécanismes épigénétiques tels que la méthylation de l'ADN, les modifications d'histones, le remodelage des nucléosomes et de la chromatine et la post-traduction médiée par les ARN non codants⁸⁵. Ainsi, plusieurs mécanismes et protéines qui régulent les événements épigénétiques, y compris la méthylation de l'ADN, le remodelage de la chromatine et les modifications post-traductionnelles des histones, sont impliqués dans de multiples aspects de la fonction neuronale et leurs dysfonctionnements ont été associés à des conditions neurodégénératives⁸⁶. Dans le cadre de ce projet de maîtrise nous nous sommes particulièrement intéressés à la protéine BMI1 de par sa forte implication à la fois dans la régulation épigénétique de l'expression génique mais aussi dans les phénomènes de la sénescence cellulaire et neurodégénérescence. La protéine BMI1 a une distribution ubiquitaire et elle est essentielle au maintien de la fonction de plusieurs organes⁸⁷. À cet égard, les modèles de

souris *Bmi1*^{-/-} ont une durée de vie raccourcie, généralement ne dépassant pas 1 mois, et présentent une fibrose pulmonaire associée à la sénescence cellulaire, des dommages à l'ADN et un phénotype sécrétoire associé à la sénescence⁸⁸.

La molécule BMI1, qui fait partie d'un groupe de protéines dit Polycomb (PcG), a initialement été identifiée dans un contexte de cancer hématologique en raison de son implication dans l'accélération de la genèse des lymphomes induits par le c-Myc⁸⁹. Les protéines PcG jouent un rôle majeur dans le remodelage de la structure de la chromatine au niveau de différentes régions promotrices ou répressives de la transcription⁸⁹. Ce sont des régulateurs épigénétiques qui permettent de préserver l'expression de gènes liés au « *patterning* » durant le développement embryonnaire⁹⁰. Ils sont aussi indispensables à la différenciation des cellules souches et surtout à l'homéostasie des tissus⁹¹.

Deux complexes protéiques constituent le groupe PcG, le complexe répressif polycomb 1 (PRC1) et le complexe répressif polycomb 2 (PRC2). La molécule BMI1 qui fait partie du complexe PRC1, participe à la mono-ubiquitination de la lysine 119 de l'H2A (H2AK119ub1)⁹². La mono-ubiquitination de l'H2A résulte de l'activation de la E3 ubiquitine ligase des deux sous unités catalytiques du PRC1, les RING1A « *really interesting new gene 1A* » et RING1B/RNF2, par BMI1⁹³. En effet, l'activité d'ubiquitination du complexe d'ubiquitine PRC1 est augmentée au niveau du noyau grâce à la phosphorylation de BMI1⁹⁴ (Figure 7).

Le H2AK119ub1 mène à la suppression des gènes Hox qui sont impliqués dans la détermination de l'identité cellulaire⁹⁵. Seulement 10% des histones 2A du nucléosome sont mono-ubiquitinés au site K119⁹³. Alors que les protéines du complexe (PRC2), EZH2, EED et SUV12 sont quant à elles impliquées dans des réactions de méthyltransférases et ciblent la mono-, di- et triméthylation de l'histone H3 lysine 27 (H3K27me1, 2,3)⁹¹. (Figure 7).

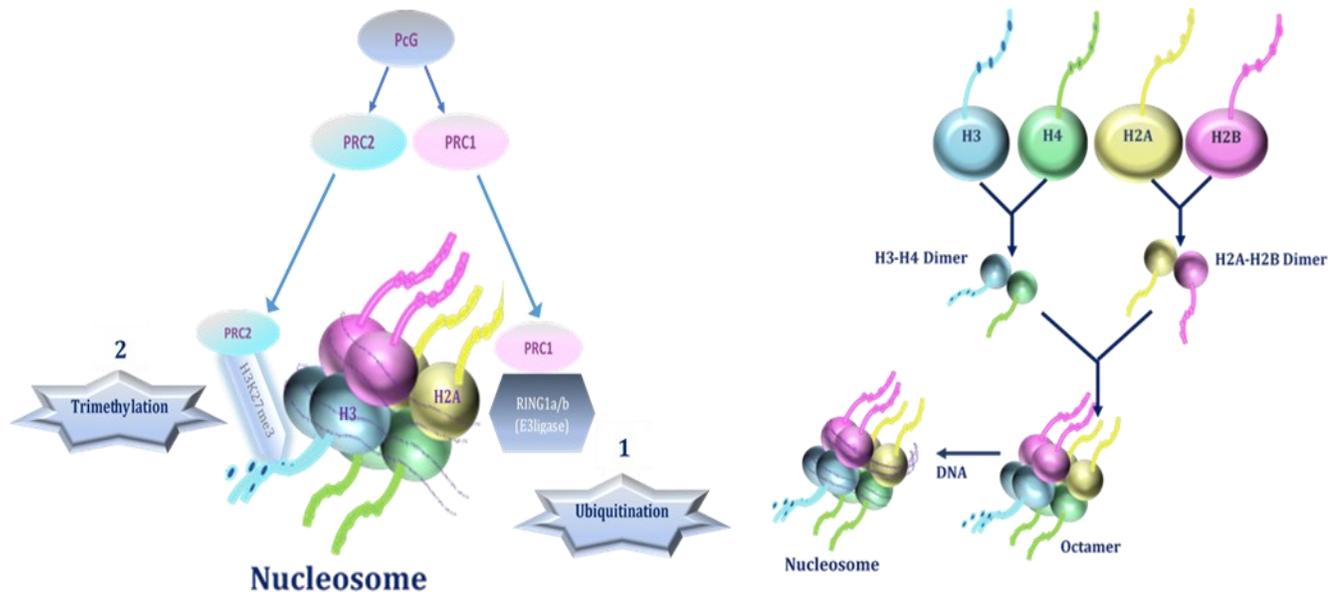


Figure 7: Composition du nucléosome et fonction du BMI1 au sein du complexe PRC1

Outre son rôle indispensable dans la suppression de l'expression de plusieurs gènes régulateurs et la compaction de la chromatine, on reconnaît à BMI1 une fonction tout aussi importante dans la régulation épigénétique des événements du cycle cellulaire à travers son implication dans l'arrêt du cycle cellulaire et l'induction de la sénescence⁹⁶. Avec les travaux de Jacobs et al (1999)¹⁰, il a été démontré que la molécule BMI1 permettait aux fibroblastes de continuer à proliférer et d'éviter d'entrer en sénescence, suite à la suppression du locus *INK4A /ARF* (*Cdkn2a*) codant pour les protéines *p16 (INK4a)* et *p14/p19ARF (Alternative reading frame, ARF)*. Les protéines, $p16^{\text{INK4A}}$ et $p14/ p19^{\text{ARF}}$, sont respectivement connues à travers leur fonction majeure dans l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1 et G2, en reliant les deux voies de suppression tumorale des pRB et p53⁹⁷. En raison de leur forte implication dans l'arrêt de la croissance et du cycle cellulaire, ces protéines ont par conséquent un rôle clé dans les réactions en cascades des événements de la sénescence cellulaire⁹⁸. Grâce à ce rôle de suppression du locus *INK4a /ARF* (*Cdkn2a*), la fonction de BMI1 dans les processus de renouvellement des cellules souches adultes est essentielle (Figure 8).

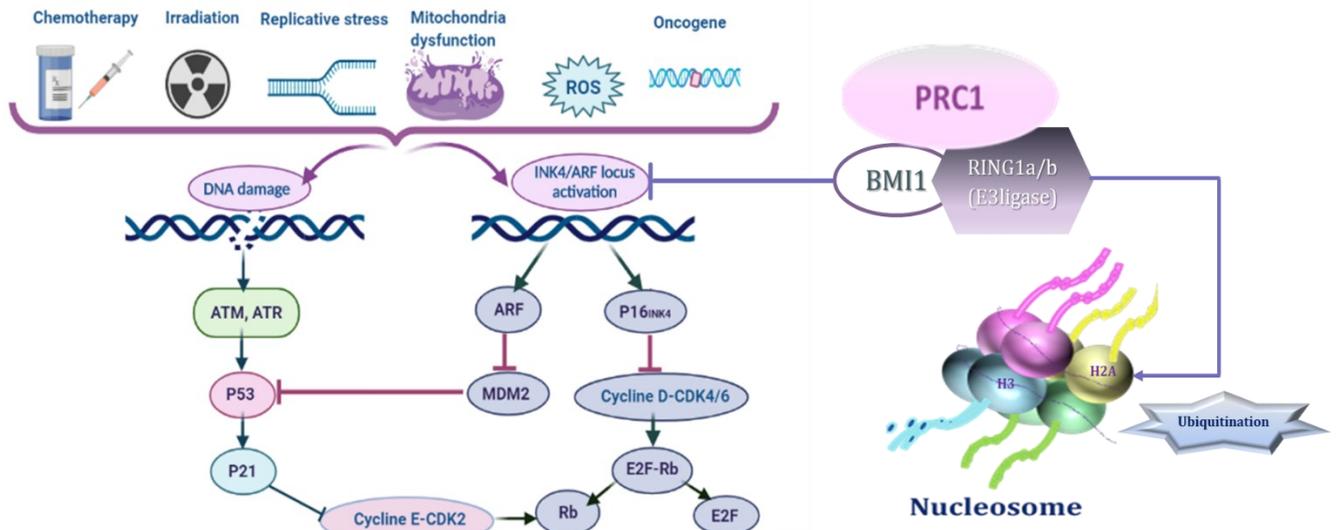


Figure 29: Inhibition du locus INK4/ARF par la molécule BMI1 démontrant sa fonction anti sénescence.
 Source : Figure reproduite de Nicolas Herranz et al. J. of clinical invest. 2018. Créée avec <https://biorender.com>

Par exemple au niveau des cellules souches et progénitrices hématopoïétiques de souris, en dehors d'un contexte de dommage à l'ADN, de prolifération ou de quiescence cellulaire, BMI1 est constamment associé à la chromatine et maintient le locus *INK4A/ARF* dans un état silencieux¹¹. En réponse à l'activation de la voie de signalisation de l'axe PI3K/AKT/mTOR (Phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) – Protéine Kinase B (AKT) – *mechanistic target of Rapamycin*), AKT phosphoryle BMI1 en Ser316. Cette phosphorylation altère la fonction de BMI1 qui consiste en l'ubiquitylation de l'histone H2A et conduit à sa dissociation de la chromatine et à la dérégulation du locus *INK4A/ARF*¹¹. Ce mécanisme mène à l'augmentation et donc à une forme d'abondance de p16^{Ink4a} et p19Arf au niveau des cellules souches et progénitrices hématopoïétiques et induit un arrêt du cycle cellulaire¹¹ (Figure 9)

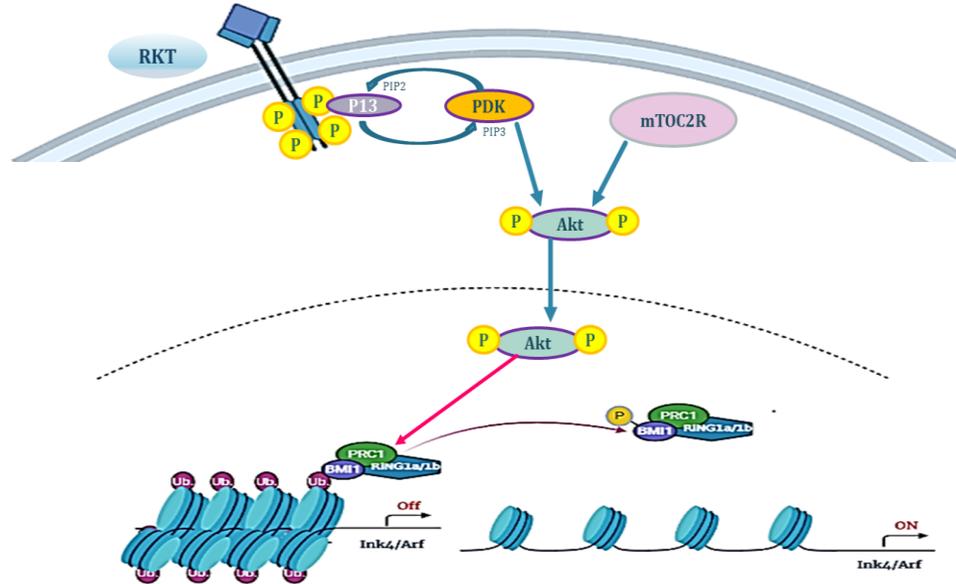


Figure 30: Activation du locus INK4/ARF au niveau de cellule souches et progénitrices hématopoïétiques. Source : Yan Liu et al.2013. Créé avec <https://biorender.com>

Au niveau du cerveau, BMI1 est exprimé au niveau de la zone germinale supraventriculaire et *in vitro* son expression est particulièrement importante au niveau des cellules souches neuronales et les progéniteurs, mais pas au niveau des neurones matures différenciés⁹⁹. La perte de BMI1 se traduit par une diminution de la prolifération dans les zones connues pour contenir des progéniteurs tel que le cortex du nouveau-né et la zone sous-ventriculaire du nouveau-né et de l'adulte⁹⁹. Au niveau des neurones, l'implication de BMI1 dans les mécanismes de production du SASP demeure toujours obscure. Dans le cadre d'une récente étude publiée par Balakrishnan et al. (2020)¹⁰⁰, le groupe démontre que l'inhibition de BMI1 au niveau des cellules d'un type rare de cancer du cerveau ciblant la population pédiatrique, le gliome infiltrant du tronc cérébral (GITC), induirait la production de certaines molécules du SASP telles que les IL6, IL8, VEGF (*Vascular endothelial growth factor*) et CXCLs (*Chemokine C-X-C motif Ligands*). L'étude révèle que BMI1 et H2Aub participent à la suppression des gènes impliqués dans l'induction de la sénescence et des phénotypes sécrétoires associés à la sénescence en se liant aux régions promotrices de p19, p21 et de IL6. Ainsi dans un contexte de déficience en BMI1, ces régions qui sont normalement en suppression sont surexprimées. Les résultats de l'étude de Bussian et al. 2018 convergent justement dans ce sens. En effet, le groupe démontre comment l'accumulation de cellules sénescents au niveau de cerveau de souris, médiée par la signalisation extracellulaire de p16Ink4a,

contribue à une aberrante hyper-phosphorylation de la protéine tau et à son agrégation pour former des filaments neurofibrillaires⁹.

Dans un contexte de neurodégénérescence, la fonction de BMI1 au niveau des neurones n'est pas tout à fait éclaircie. Cependant nous savons maintenant qu'une déficience en BMI1 a été rapportée dans le cerveau de patients post-mortem présentant la forme sporadique tardive de la maladie d'Alzheimer tardive (LOAD)¹⁴. Dans le cadre de cette même étude, il a été démontré que l'inhibition du BMI1 au niveau de neurones corticaux en culture entraînait une sécrétion de la β amyloïde 42 (A β 42), une accumulation de plaques amyloïdes et la formation d'enchevêtrement de p-Tau.

PROBLÉMATIQUE ET OBJECTIF

Le vieillissement est le principal facteur de risque de plusieurs maladies neurodégénératives particulièrement la maladie d'Alzheimer (MA). L'implication des phénomènes de la sénescence cellulaire et de *l'inflammaging* dans les processus du vieillissement et d'aggravation de maladies chroniques ont fait l'objet de plusieurs études. Cependant, au niveau des cellules post-mitotiques, telle que les neurones, les mécanismes inducteurs d'un état de sénescence et de production de cytokines pro-inflammatoires, en lien à la fois avec les phénotypes sécrétoires associés à la sénescence et à *l'inflammaging*, demeurent toujours partiellement compris particulièrement dans un contexte de neurodégénérescence. L'implication du proto-oncogène BMI1 dans les phénomènes de vieillissement précoce, de neurodégénérescence et de sénescence cellulaire a été documenté à travers son rôle suppresseur du locus *INK4a/ARF*^{9,101, 12.} De plus, au niveau des neurones corticaux, la déficience en BMI1 a été observée en post mortem dans le cerveau de patients atteints de la forme sporadique tardive de la MA⁹. Bien que nous n'ayons trouvé que très peu de publications, pour ne pas dire aucune, sur l'implication conjointe de BMI1 et NF- κ B dans les mécanismes de la neurodégénérescence et de *l'inflammaging*, en contrepartie la littérature regorge de publications démontrant la forte implication de la voie NF- κ B dans la production de phénotypes sécrétoires associés à la sénescence et dans *l'inflammaging*.

C'est donc dans ce contexte que notre projet de maîtrise s'inscrit. Nous avons voulu explorer l'implication de BMI1 et de la voie canonique d'activation du facteur NF- κ B dans la production de cytokines pro-inflammatoires en utilisant des modèles *in vivo* et *in vitro* reproduisant un phénotype de neurodégénérescence similaire à la maladie d'Alzheimer.

MATERIEL ET MÉTHODE

Cultures cellulaires *in vitro*

Afin de répondre à notre question de recherche nous avons utilisé deux types de cellules différentes, les cultures de neurones et les HEK293T :

1. Cultures primaires *in vitro* de neurones humains post-mitotiques

En suivant le protocole élaboré par le laboratoire, nous avons généré des neurones post-mitotiques à partir de cellules souches embryonnaires humaines (CSEH) de type H9 (*WiCell Research Institute*) et *Human Embryonic Stem Cell* (HUES9). Le protocole utilisé a été développé dans le laboratoire et comprend trois étapes : une première phase d'amplification des cellules souches qui dure 3 à 4 semaines, une deuxième phase de différenciation en neurones progéniteurs qui peut durer jusqu'à 2 semaines et une troisième phase de différenciation en neurones post-mitotiques.

Durant la ***première phase d'amplification***, les CSEH sont décongelées à partir de l'azote liquide et mises en culture soit dans des plaques de 12 ou de 24 puits dans un milieu de culture pour cellules souches le (*PeptoGrow hES cell media*). Les plaques de cultures sont préalablement recouvertes avec du Matrigel ES (*Corning Matrigel hESC-qualified Matrix*) à 1x de DMEM/F12 et incubées à 37°C durant 30 à 45 minutes. Une fois le milieu DMEM/F12 contenant le Matrigel aspiré, les CSEH sont mises en culture dans leur milieu spécifique en présence d'un inhibiteur de la voie Rho/Rock (*Rho/Rho-associated coiled-coil containing protein kinase*) qui cible les protéines Rock1 et Rock2. La voie de signalisation (Rho / ROCK) est une voie importante dans le système nerveux central puisqu'elle est en lien avec l'activation de signaux inhibiteurs qui bloquent la régénération des neurones *in vitro*¹⁰². L'utilisation de cet inhibiteur durant la phase d'amplification des cellules souches permet d'améliorer leur survie ainsi que leur expansion¹⁰³. Le milieu de culture est ensuite changé à un rythme journalier jusqu'à obtenir une confluence cellulaire d'environ 80% par puits.

Par la suite, on procède à la ***deuxième phase qui consiste à différencier les cellules souches en progéniteurs de neurone***. Pour distinguer les cellules souches des progéniteurs de neurones, nous utilisons un microscope EVOS avec une lunette de visée et un port de caméra localisé dans la salle de culture. Nous nous basons sur les deux caractéristiques suivantes pour les distinguer :

- Les cellules souches ont la capacité de proliférer, de se multiplier et de s'amplifier continuellement sans se regrouper en amas cellulaires sphériques.

- Alors que les progéniteurs de neurones prolifèrent en présence de facteur de croissance épidermique recombinant humain (*Epidermal growth factor EGF*) et forment des neurosphères qui ne sont nuls autres que des regroupements de cellules en amas sphériques en trois dimensions¹⁰⁴. Il est possible de quantifier le nombre de neurosphères qui se forment par puit en les comptant au microscope à 4x de résolution¹⁰³.

Durant la deuxième phase, nous rajoutons au milieu de culture DMEM/F12, les protéines Noggin (250 ng/ml) et LDN1931189 Hydrochloride. Ces deux protéines permettent la différenciation des cellules souches en neurones. En effet, le Noggin, ou NOG, est une protéine qui inhibe les protéines impliquées dans la morphogénèse osseuse ou en anglais les *bone morphogenic proteins* (BMP)¹⁰⁵. Les BMP agissent comme suppresseurs de neurogénèse et limitent le nombre de précurseurs de neurones, la prolifération et la différenciation des cellules neuronales^{104,106,107}. Tout comme le Noggin, le LDN1931189 est une molécule qui inhibe les protéines BMPs en ciblant les récepteurs BMP de type 1, les kinases du lymphome anaplasique (*Anaplastic lymphoma kinase*) en anglais (ALK), les ALK2, ALK3 et ALK6¹⁰⁸. À la fin de cette période, le milieu de culture est remplacé par un autre milieu, le DDM/B27. Ce milieu est dépourvu de Noggin et LND, et les neurones sont gardés durant 7 jours dans ce même milieu.

Cette période de sept jours est suivie de la ***phase finale de différenciation des cellules en neurones***. Durant cette phase la maturité des neurones corticaux *in vitro* se reconnaît sur la base de caractéristiques visibles au microscope et de marqueurs cellulaires :

- Caractéristiques cellulaires visibles au microscope : À partir des neurosphères, composées essentiellement de corps cellulaires, à 20x de résolution, il est possible de visualiser les extensions axonales à partir de la forme pyramidale des neurones. Les neurosphères établissent des connexions avec d'autres neurosphères à travers ces connexions axonales, alors que les projections dendritiques, qui permettent la communication entre deux neurones proches ne sont visibles qu'à 40x de grossissement.
- Dans le cadre de ce protocole, la maturité des neurones corticaux en culture a également été validée, antérieurement, par Immunofluorescence ou Immuno-buvardage avec les marqueurs suivants; FOXG1 (*Forkhead box protein G1*); le marqueur des neurones la Tubulin β III; la Protéine Associée aux Microtubules 2 (MAP2); NeuN; ainsi qu'avec les

marqueurs glutamatergiques, GABAergiques et cholinergiques (vGLUT1, GABA, et ChAT)¹⁴.

Lors de cette phase finale, nous débutons le décompte des jours de culture des neurones post-mitotiques à partir du premier jour qui suit la période de 7 jours. Durant cette dernière étape, les cellules sont transférées à une nouvelle plaque préalablement recouvertes avec du Matrigel et du *Growth Factor Reduced* (GFR) incubé à 37°C durant 30 à 45 minutes. Les cellules sont gardées durant 24h00 dans du milieu DDM/B27 avec les inhibiteurs de Rho/Rock. Après 24h00, la moitié du milieu est changée et les cellules sont gardées durant 4 jours dans le même milieu. Un changement de milieu de culture a lieu à une fréquence régulière de 3 à 4 jours et les cellules sont incubées à 37°C. Afin de reproduire un phénotype *in vitro*, de vieillissement neuronal, nous avons maintenu les neurones en culture durant 50 à 55 jours environ (voire même 75 jours). En effet, nous avons opté pour cette durée en nous basant sur les nombreux travaux réalisés sur la sénescence cellulaire, le vieillissement des neurones et la neurodégénérescence^{48,109}. Nous avons pu observer, tel que rapporté dans ces études, un début de dégénérescence naturelle des neurones après une durée de 45 à 50 jours de culture *in vitro*, qui se traduit par une régression spontanée du réseau axonal qui lie les neurosphères entre elles, l'accumulation de débris cellulaires et le besoin d'augmenter la fréquence des changements du milieu de culture^{48,109}. L'objectif étant d'établir une forme de parallélisme entre le vieillissement des neurones dans le cerveau humain (*in vivo*) avec celui des neurones en culture *in vitro*. (Figure 10).

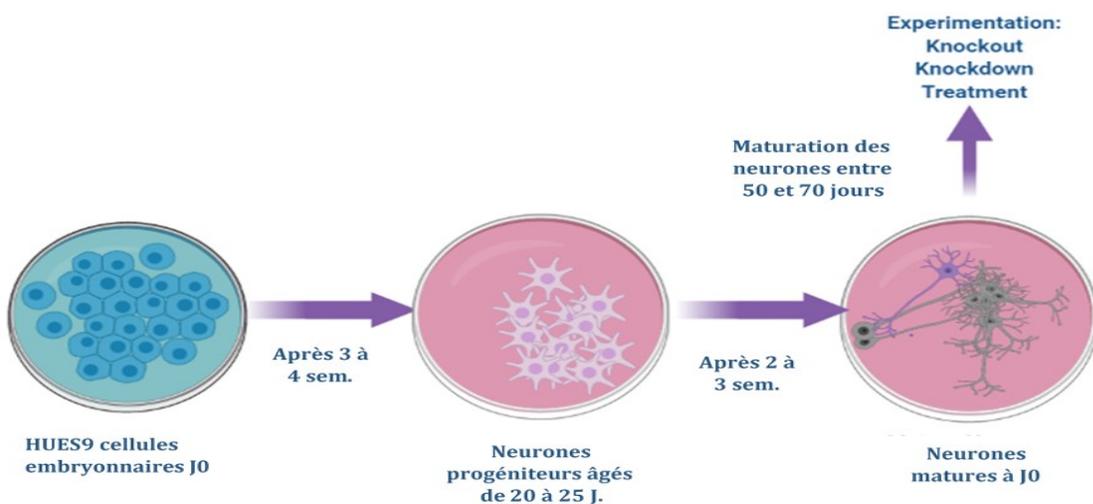


Figure 31: Étapes de différenciation des cellules humaines embryonnaires en neurones matures post mitotiques. Créé avec <https://biorender.com>

2. Culture *in vitro* de cellules immortalisées de type HEK293T

Afin de valider et de comparer les résultats obtenus sur les cultures de neurones post-mitotiques matures nous avons également utilisé des cellules tumorigéniques du type HEK293T. Pour leur culture le milieu *Dulbecco's Modified Eagle's Medium/F12* (DMEM/F12), avec du *Fetal Bovine serum* à 10% (FBS 10%) et 1% de streptomycine et érythromycine, a été utilisé. À une confluence de 80% les cellules étaient lavées, centrifugées et changées de contenant et de milieu.

Délétion du gène BMI1 avec la technologie CRISPR/cas9

Afin d'apprécier la variation dans l'expression du facteur de transcription NF- κ B dans un contexte de déficience en BMI1 nous avons procédé à une délétion du gène BMI1 en utilisant le complexe CRISPR/cas9 « Regroupement régulièrement intercalées de courtes répétitions palindromiques/cas9 » ou en anglais « *Clustered regularly interspaced short palindromic repeat/cas9 system* ». La délétion du gène BMI1 a été réalisée avec des plasmides provenant de la compagnie *Applied Biological Materials* (abm.inc) comprenant un mix complet de CRISPR/cas9 et de sgARN ciblant les séquences de l'exon 3 du gène BMI1; F-ATTGTTCGTTACCTGGAGACCA, R-TGGTCTTGTGAACTTGGACATCA. Afin de délivrer le Mastermix aux neurones nous avons utilisé un agent de transfection de type TransIT-X2 (Mirus inc.) avec un milieu Gibco™ Opti-MEM™ (*Reduced Serum Medium*). Avant chaque transfection les cellules étaient maintenues durant 24 à 48h dans un milieu de culture dépourvu d'antibiotique. Au total nous avons réalisé trois transfections sur une durée de 8 à 9 jours. À chaque transfection, les cellules étaient incubées 24h à 37°C dans le Mastermix CRISPR/cas9, ensuite le milieu était changé avec du milieu DDM/B27 dépourvu en antibiotique. Les cellules étaient par la suite gardées dans le même milieu durant 48h avant de procéder à la deuxième transfection. La même opération était répétée avant la dernière transfection. Au terme des trois transfections, les neurones étaient gardés en incubation à 37°C, avec un changement de milieu tous les trois jours jusqu'à échéance de deux semaines avant de procéder à leur récolte et à l'extraction de protéines et d'ARN. Après la troisième transfection les cellules étaient gardées en culture pendant 10 à 13 jours avant d'être récoltées et analysées.

Le même protocole a été appliqué aux cellules HEK293T avec de légères variations adaptées à la culture de ce type de cellules. Contrairement aux neurones, les HEK293T continuent leur prolifération même après la troisième transfection et peuvent atteindre une confluence de 90% à

95% suite à la deuxième transfection. Compte tenu de cette réalité, pour leur maintien en culture durant les deux semaines qui ont suivi la dernière transfection, nous avons été obligés de les diviser dans plusieurs puits après chaque lavage et changement de milieu avant de les analyser.

Inhibition de BMI1

Pour inhiber l'expression de BMI1 au niveau des cellules HEK293T et les neurones post-mitotiques, nous avons utilisé un système de plasmides exprimant un/des shRNAs ciblant l'ARN messager de BMI1 (ShBMI1) et *small hairpin scrambled* (ScrBMI1) faisant office de contrôle négatif. Comme expliqué à la section de la culture in vitro des neurones, la transfection des neurones post-mitotiques matures s'est effectuée autour de 50 à 55 jours de maturité. Nous avons utilisé un agent de transfection de type TransIT-X2 (Mirus inc.) avec un milieu Gibco™ Opti-MEM™ (*Reduced Serum Medium*). Les cellules ont été incubées durant 24h00, à la suite de quoi le milieu a été changé et 24h00 plus tard les cellules ont été récoltées à des fins d'extraction des protéines et de l'ARN. La même procédure a été appliquée pour la déplétion de BMI1 dans les HEK293T.

Que ce soit pour de délétion du gène comme pour l'inhibition de BMI1 nous avons utilisé les techniques de qRT-pcr et immuno-buvardage pour valider l'expérience.

Inhibition de la voie NF-κB avec la molécule *caffeic acid phenethyl ester* (CAPE)

Comme expliqué précédemment, peu de données existent sur les mécanismes d'interactions directes ou indirectes entre le proto-oncogène BMI1 et le facteur de transcription NF-κB. À cet égard, afin d'étudier la variation de l'expression de BMI1 dans un contexte de carence en NF-κB, nous avons utilisé un inhibiteur de la voie NF-κB, la *Caffeic Acid Phenethyl Ester* (CAPE). La CAPE est un dérivé actif de la propolis avec des propriétés documentés anti-apoptotique, anti-inflammatoire, anti-carcinogénique, antimitotique et immunomodulatrice⁷⁷. Plusieurs études ont rapporté le puissant pouvoir de la CAPE à inhiber la fonction du facteur de transcription NF-κB en bloquant sa translocation dans le noyau et son arrimage à l'ADN^{77,110}. Dans cette expérience, nous avons utilisé les cellules HEK293T que nous avons incubées 24 heures avec des concentrations variées de CAPE allant de 5 µg/mL à 30 µg/mL. Afin de s'assurer que ces expériences n'induisaient pas d'apoptose cellulaire, les cellules ont été gardées environ 48 heures

en culture à 37°C suivants la fin de la période d'incubation avec la CAPE, pour ensuite procéder à l'extraction des protéines.

Extraction des protéines à partir de cultures cellulaires

Le milieu de culture est aspiré et les cellules sont lavées durant 1 à 2 min avec un tampon PBS. Une fois le tampon PBS aspiré, une deuxième quantité de PBS était rajoutée aux cellules pour les décoller de manière mécanique sans avoir recours à la trypsine. Ensuite, les cellules sont centrifugées durant 5 minutes à raison de 184 g. Pour la lyse cellulaire un mélange composé de RIPA (*radio immunoprecipitation assay buffer*) et d'une solution inhibitrice de protéases (Roche Diagnostics) fut utilisé. Le mélange était ensuite incubé durant 30 min à 4°C suivi d'une sonication de 30 secondes.

Extraction de protéines à partir de cerveaux de souris *Bmi1*^{+/+} et *Bmi1*^{+/-}

Afin d'apprécier l'expression du facteur NF-κB *in vivo* chez des souris présentant un phénotype histopathologique proche de celui de la maladie d'Alzheimer, nous avons utilisé un modèle de souris présentant une déficience en *Bmi1*. Les souris que nous avons utilisées sont des souris *Bmi1*^{+/-} qui ont généreusement été offert au laboratoire par le laboratoire M. Van Lohuizen. Elles ont été maintenues avec le modèle génétique C57BL/6 J obtenus à partir du laboratoire Jackson. L'utilisation de ces souris s'est faite avec l'accord du comité d'éthique des animaux (CPA) du Centre de Recherche de l'hôpital Maison-neuve Rosemont (CR-HMR).

Les protéines extraites proviennent de 9 cerveaux de souris (cervelet et hémisphères cérébrales) comme indiqué au [tableau 1](#) suivant :

Tableau 1 : Âge et génotypes des souris utilisées dans le cadre du projet.

Âge	<i>Bmi1</i> ^{-/-} n	<i>Bmi1</i> ^{+/-} n	<i>Bmi1</i> ^{+/+} n
20 jours	1	-	-
1 à 2 mois	-	2	2
>16 mois	-	2	2

Les souris ont été euthanasiées avec la méthode de luxation cervicale, et une fois extraits, les cerveaux étaient immédiatement immergés dans du tampon PBS (1x). Pour la lyse des tissus cérébraux un cocktail composé de RIPA (*radio immunoprecipitation assay buffer*) et d'une solution inhibitrice de protéases (Roche Diagnostics) a été utilisé. Nous avons par la suite procédé à la sonication des protéines durant 30 secondes à raison de 3 cycles.

Immuno-buvardage

Pour l'analyse protéique de nos échantillons, nous avons utilisé le buvardage de type Western. Les protéines extraites des échantillons, ont été quantifiées en utilisant la méthode de Bradford au bleu de Coomassie. L'électrophorèse des protéines se faisait sur gel de polyacrylamide 10% en présence de sodium-dodécyl-sulfate (SDS-Page) durant environ 1h20 min avec des voltages de migration variant entre 100V et 140V (Bio-rad). Le transfert des protéines se faisait à une membrane de nitrocellulose de 0.2mm (Bio-rad) durant 2h avec un voltage de 20V. À la fin de chaque transfert, et afin de valider son succès, une vérification au rouge ponceau été effectuée. Les membranes étaient ensuite bloquées durant 1h soit dans du lait écrémé 5%-1xTBS-T ou dans du BSA à 3%-1xTBS-T pour les protéines phosphorylées. L'incubation avec l'anticorps primaire se faisait durant la nuit à 4 °C, par la suite la membrane était lavée 3 fois durant 5min avec de la TBS-T 0.05%-1X et incubée durant 1h avec un anticorps secondaire « *horseradish peroxidase-conjugated* » correspondant à l'anticorps primaire. À la fin de cette période d'incubation, la membrane était encore une fois lavée à trois reprises à raison de 5 min avant la révélation.

Extraction de l'ARN à partir de cultures cellulaires et RT-qPCR

Pour réaliser des PCR en temps réel (RT-qPCR), l'ARN a été extrait à partir des échantillons de cultures cellulaires en utilisant le réactif TRIzol (Invitrogen). Une fois extrait, l'ARN a ensuite été quantifié au TECAN et conservé à -80°C. Pour faire nos RT-qPCR, nous avons procédé à la reverse transcription de l'ARN en ADNc en utilisant une reverse transcriptase appartenant aux Kit *iScript™ Reverse Transcription* de (Bio-rad). Les RT-qPCR ont été réalisées en triplicata en utilisant le master mix MBI *Evolution EvaGreen qPCR* de la compagnie Montréal Biothec Inc. avec l'appareille Real-Time PCR (ABI 7000) du centre de recherche du HMR.

RESULTATS ET DISCUSSION

Résultats

L'inhibition de la voie NF-κB dans les HEK293T induit une diminution de l'expression de BMI1

Peu d'études ont exploré la relation directe ou indirecte entre le proto-oncogène BMI1 et le facteur de transcription NF-κB dans le contexte de neurodégénérescence ou de vieillissement. Cependant certains travaux réalisés sur les cancers gastriques et hépatiques confèrent au BMI1 un rôle important dans l'activation de NF-κB^{111, 112}. À cet effet, en nous servant de cellules immortalisées de type HEK293T, nous avons voulu savoir dans un premier temps si la relation entre BMI1 et NF-κB était interdépendante. Autrement dit, est-ce qu'une inhibition de NF-κB allait induire une variation dans l'expression de BMI1. À cet égard, pour inhiber la voie NF-κB nous avons utilisé une molécule chimique soit la Caffeic acid phenethyl ester (CAPE). Comme abordé dans la section matériel et méthodes, nous avons exposé les cultures de HEK293T à différentes concentrations de la molécule CAPE durant des périodes d'incubations à 37°C, allant de 1h à 72h. L'inhibition efficace de NF-κB a été obtenue suite à une incubation de 24 h avec des concentrations croissantes de CAPE : 10, 15 et 25 µg/mL. Les résultats que nous montrons à la [figure 11](#) sont ceux obtenus à partir d'une seule expérience (n=1) et analysés avec la technique d'immuno-buvardage. Ils indiquent qu'à des concentrations efficaces d'inhibition du facteur NF-κB soit 10, 15 et 25 µg/mL, on remarque une baisse et une inhibition conjointe de BMI1. Alors qu'à la concentration de 30 µg/mL l'effet inhibiteur de la CAPE sur NF-κB ne s'observe pas, de la même façon qu'aucune variation dans l'expression de BMI1 ne s'observe.

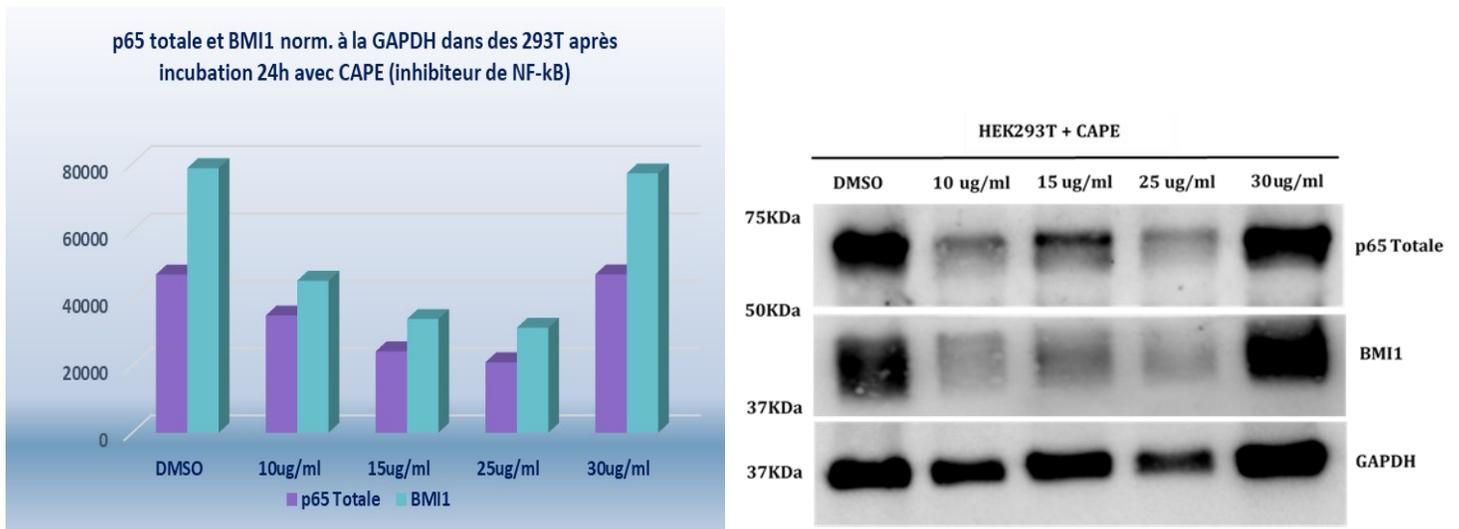


Figure 32: Analyse par immuno-buvardage de l'expression de BMI1 et de p65-Totale suite à l'inhibition du facteur NF-κB au niveau de cellules HEK293T après 24h00 d'incubation à différentes concentrations de CAPE.

La perte de fonction génique de BMI1 et l'inhibition du BMI1 au niveau de HEK293T induisent une diminution de p65-totale et de l'IL8

Comme présenté plus haut, l'inhibition du facteur NF- κ B s'accompagne d'une baisse de l'expression de BMI1 au niveau des HEK293T. En partant de ces résultats nous voulions savoir si le même effet était observé au niveau de l'expression de la p65-totale dans un contexte d'absence totale du gène BMI1. En utilisant la technologie CRISPR/cas9 nous avons procédé à des expériences de *knockout* de BMI1 dans les cellules HEK293T.

Au niveau des cellules HEK293T nous avons seulement pu obtenir un *knockout* d'environ 45% malgré plusieurs tentatives. Les résultats que nous présentons aux figures 10 sont donc ceux d'une seule expérience (n=1). Dans un premier temps nous avons validé le *knockout* en analysant nos résultats à l'aide d'immuno-buvardage et de qRT-pcr. Au niveau des cellules HEK293T *knockout*, bien que le *knockout* ne soit que partiel nous observons tout de même une baisse des niveaux protéiques de p65 totale (figure 10). Ces résultats, additionnées au précédent suggèrent qu'il existerait une interaction interdépendante entre le proto-oncogène BMI1 et la sous-unité p65 du facteur NF- κ B où l'absence de l'un induit une baisse ou une perte de l'expression de l'autre et vice versa.

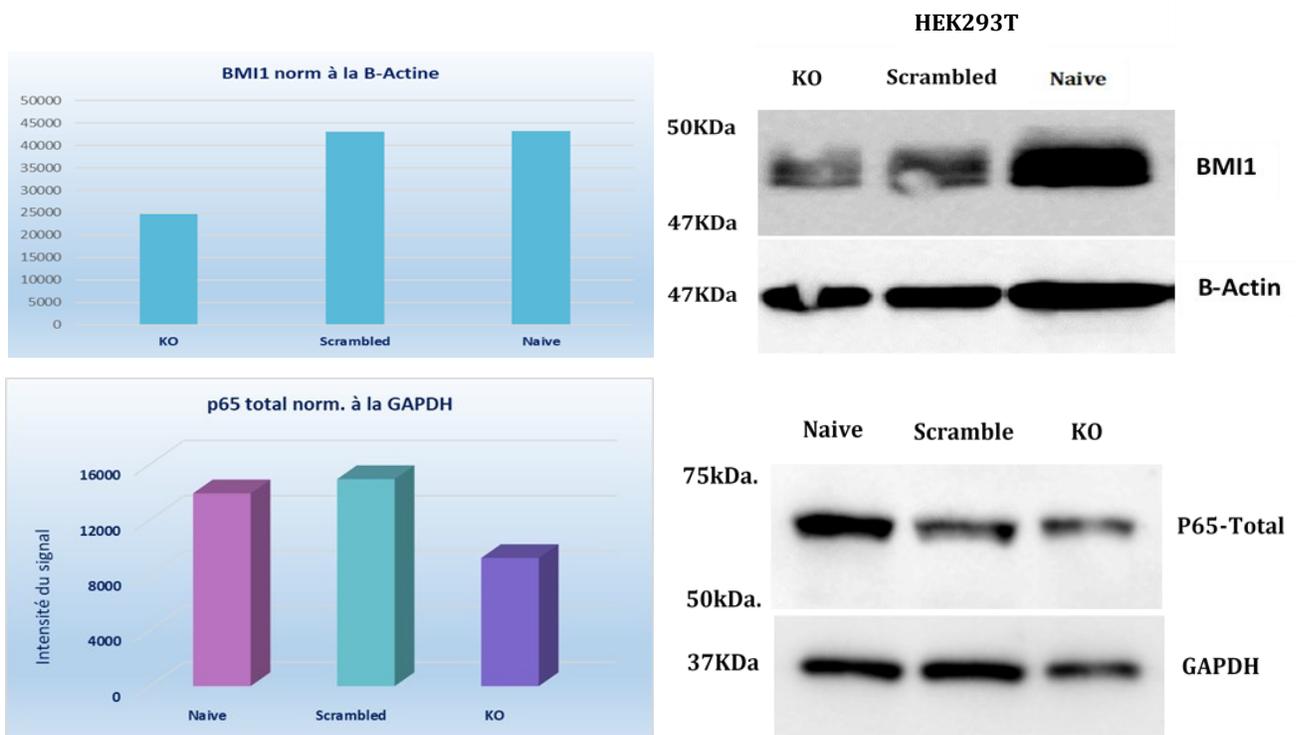


Figure 33: Analyse par immuno-buvardage de l'expression de p65-Totale au niveau des cellules HEK293T suite au *Knockout* de BMI1 avec CRISPR/cas9.

Afin de vérifier si la déficience en BMI1 pouvait induire une baisse ou une augmentation dans l'expression d'interleukines, telle que l'IL8, dont le gène est ciblé par le facteur de transcription NF- κ B, nous avons inhibé BMI1 (*knockdown*) dans les cellules HEK293T à l'aide d'un plasmide ShBMI1. Nous avons par la suite utilisé la RT-qPCR pour valider le knockdown de BMI1 et l'expression du gène de l'IL8. Les résultats présentés ci-dessous sont ceux d'une seule expérience (n=1) et ils indiquent une baisse de l'expression de l'IL8 au niveau des cellules ShBMI1 comparé aux cellules contrôles, de même qu'une légère baisse de l'ARN messager de p65 (Figure 11).

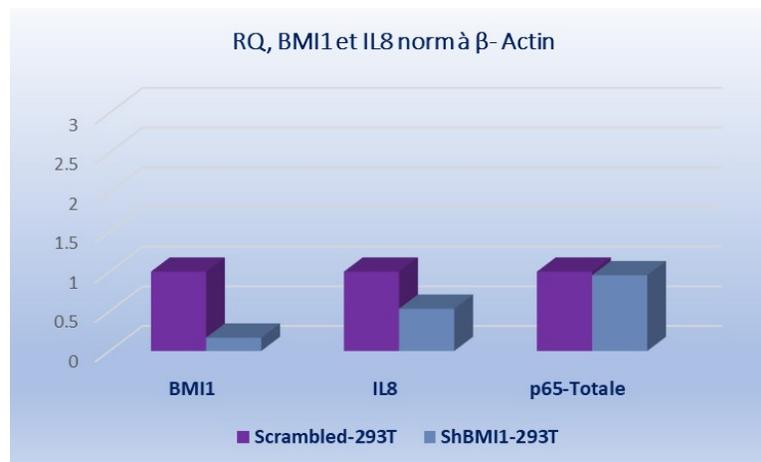


Figure 34: Analyse par RT-qPCR de l'expression de l'IL8 et de p65-totale dans une population de cellules HEK293T déficientes en BMI1 comparé à un contrôle.

La stimulation de la voie NF- κ B induit une activation de p65 uniquement au niveau des échantillons HEK293T déficients en BMI1

Pour résumer les résultats présentés plus haut, nous rapportons que l'inhibition du facteur NF- κ B avec la molécule CAPE induit également la diminution de l'expression de BMI1. D'un autre côté l'inhibition de BMI1 induit également une diminution de l'expression de p65-totale ainsi que de l'IL8. Sur la base de ces résultats nous avons voulu savoir si la déficience en BMI1 pouvait interférer avec la voie canonique d'activation de NF- κ B et la réponse immunitaire innée à travers les récepteurs PRR. Pour ce faire nous avons procédé à l'activation des récepteurs *Toll Like Receptors* (TLRs) avec la LPS (lipopolysaccharides). Grâce à leur habilité à reconnaître différentes molécules apparentées aux composants de plusieurs agents pathogènes, les récepteurs TLRs jouent un rôle critique dans la réponse immunitaire innée des cellules¹¹³. À cet effet, les cellules HEK293T sh_BMI1 et sh_scrambled ont été incubées 24h avec la LPS (100ng/mL).

L'analyse avec la technique d'immuno-buvardage du résultat que nous avons obtenu à partir d'une seule expérience (n=1), indique une légère augmentation de la forme active de p65 totale, soit p-p65, uniquement dans les cellules déficientes en BMI1 mais pas nécessairement au niveau du groupe contrôle (Figure 14). Cette augmentation ce chiffre à environ 8% après la quantification des protéines avec le logiciel d'Imaris (Fiji). Alors que dans le groupe contrôle (DMSO), la déficience en BMI1 n'induit aucune activation de la voie NF-κB.

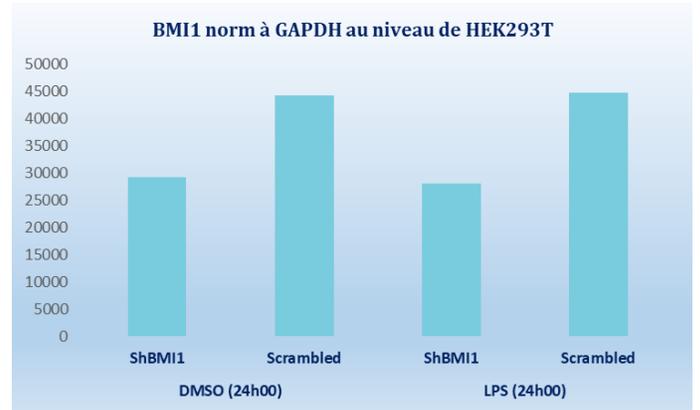
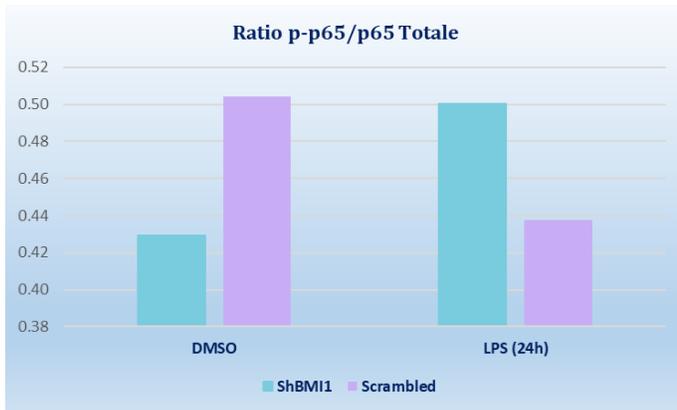
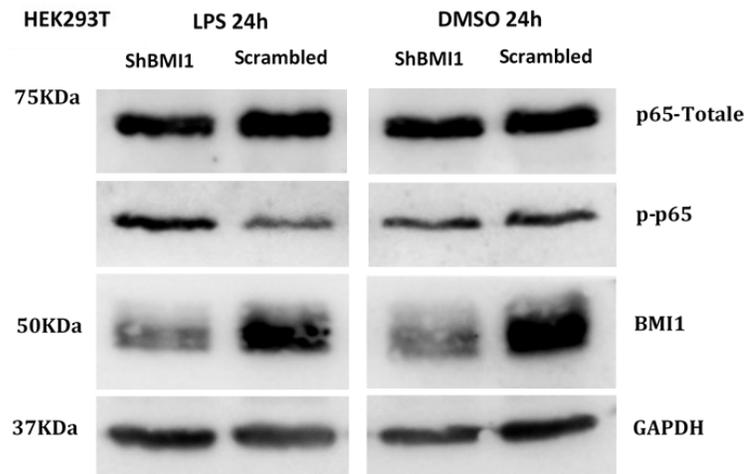


Figure 35: Analyse par immuno-buvardage de l'activation de la voie canonique du facteur NF-κB avec la LPS au niveau de cellules HEK293T.

Régression du réseau de connexions dendritiques et diminution des ramifications axonales des neurones matures post-mitotiques après 45 jours de culture *in vitro*

Afin de répondre à notre problématique de recherche en lien avec le phénomène de neurodégénérescence, nous avons utilisé des cultures de neurones *in vitro* obtenues par des procédés de différenciation de cellules souches humaines en neurones corticaux. Comme expliqué à la section de matériel et méthode, pour étudier la neurodégénérescence et le vieillissement des neurones *in vitro*, nous avons utilisé des neurones post-mitotiques matures gardés en culture plus de 45 jours afin d'établir un semblant de parallélisme entre la maturité du réseau neuronal cortical *in vivo* chez l'être humain et la maturité des neurones post-mitotiques *in vitro*. À cet égard nous nous sommes posé deux questions :

- À quel moment exactement sur la base du protocole déjà développé et utilisé par le laboratoire, les neurones maintenus en culture atteignaient un point maximal de réseautage dendritique et de projections axonales?
- Quelle était la durée maximale du maintien en culture de neurones matures post-mitotiques?

Dans le cadre de ce projet, la réponse à ces deux questions s'est principalement basée sur des observations qualitatives, puisque les marqueurs biologiques des cellules à chaque phase de leur développement avaient déjà été déterminés antérieurement par d'autres membres du laboratoire.

À la phase de progéniteurs neuronaux :

À travers des observations microscopiques nous pouvons constater que lors du tout premier stade de leur différenciation les cellules souches neuronales prolifèrent sous forme de sphères pour former des amas cellulaires de dimensions variables appelés « neurosphères »¹¹⁴. À la fin de la phase de progéniteurs, les neurones en culture, exhibent un corps cellulaire à partir du quel partent des projections axonales qui permettent de connecter les corps cellulaires des neurosphères entre elles. C'est le début du développement du réseau de connexions axonales et des branchements dendritiques entre les neurosphères. Ce stade-ci de la différenciation neuronale se distingue du stade avancé à travers la rareté et l'immaturation du réseau de connexions dendritiques et axonales entre les différentes neurosphères comme montré à la (Figure 15.)

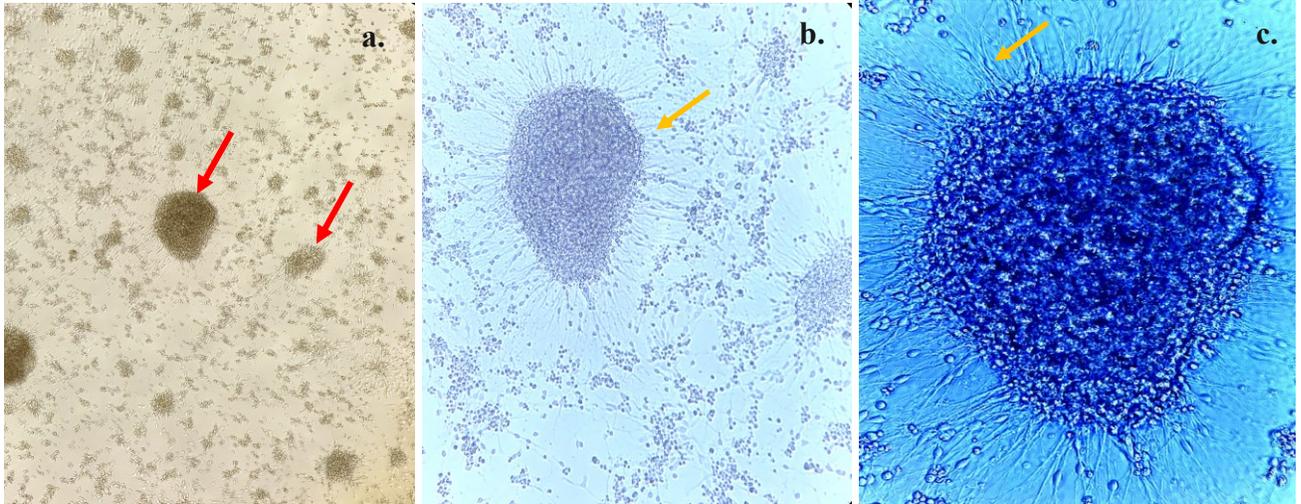


Figure 36: a) Image microscopique (4x) : les flèches rouges indiquent la formation de neurosphères. b) Image microscopique (10x) : la flèche jaune indique le début des projections axonales qui partent à partir des neurones pour se connecter à d'autres corps cellulaires. c) Image microscopique (20x) : grossissement de la même neurosphère qui permet une meilleure visualisation de l'accumulation en trois dimensions de corps cellulaires et les projections axonales. Source A.Moursli_Labo G.Bernier_CRHMR_Mars2020

À la phase de neurones mature post mitotique (35 et 45 jours)

À des stades avancés de leur développement, vers environ 35 à 45 jours, les neurones en culture atteignent un pic de maturité qui se traduit par un important réseau stable en 3 dimensions de projections axonales et connexion dendritiques comme montré à (Figure 16):

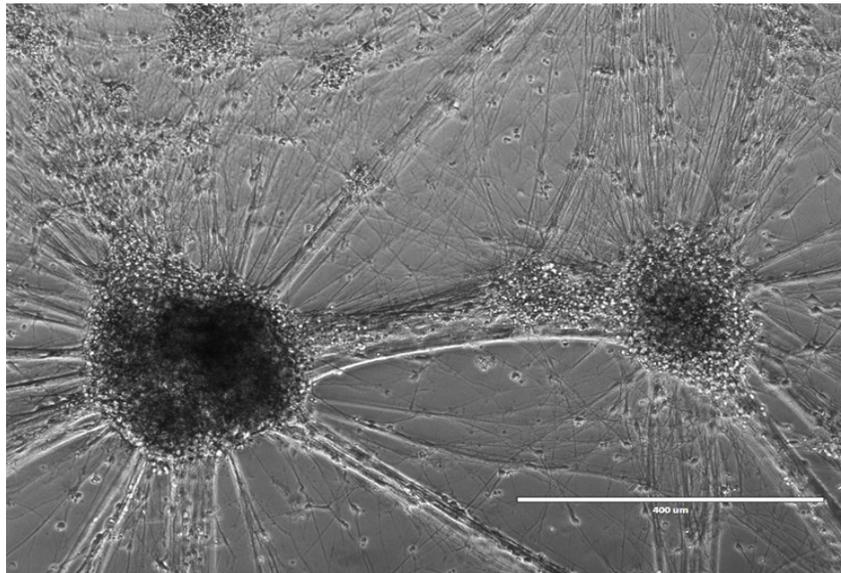


Figure 37: Image microscopique (10x) indiquant le pic de développement du réseau dendritique et axonale des cultures en 3D de neurones à 45 jours de maturité post-mitotique. Source A.Moursli_Labo G.Bernier_CRHMR_Mars2020.

À la phase de neurones mature post mitotique après 45 jours de culture in vitro

Après 45 jours de culture *in vitro*, le réseau complexe de connexions axonales et dendritiques a progressivement tendance à régresser. Nous pouvons observer un amoindrissement des projections axonales autour de 50 à 60 jours de culture *in vitro* comme indiqué à (Figure 17) .

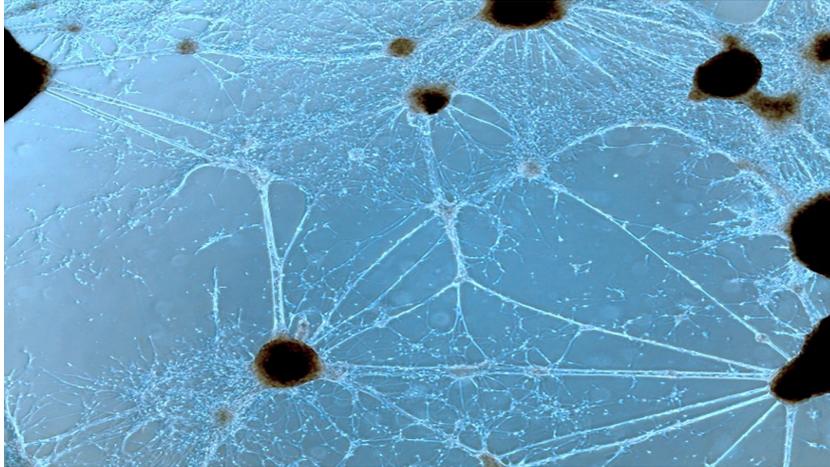


Figure 38: Image microscopique (4x) indiquant la régression progressive du réseau dendritique et axonal autour de 50 à 60 jours de cultures en 3D de neurones post-mitotique. Source :A.Moursli_CRHMR_Mars2020.

Après 80 à 85 jours de culture *in vitro*, il est possible d’observer une régression quasi complète du réseau axonal, une apoptose cellulaire et la disparition des colonies de neurones qui habituellement s’organisent en trois dimensions (Figure 18).

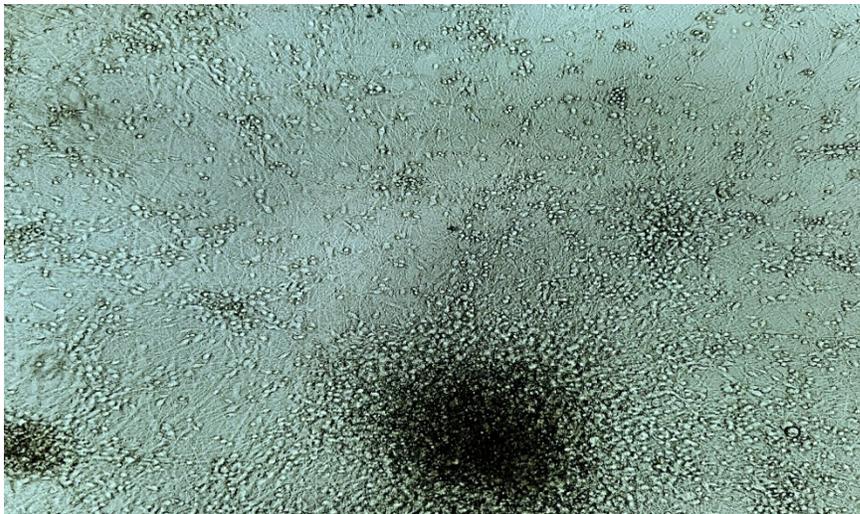


Figure 39: Image microscopique (4x) indiquant la disparition complète du réseau dendritique et axonal à environ 85 jours de culture *in vitro* de neurones post-mitotique. Source : A.Moursli_Labo G.Bernier_CRHMR_Mars2020.

L'amputation du gène BMI1 au niveau de neurones matures post-mitotiques induit une diminution de p65-Totale

Afin d'étudier les variations d'expression du facteur NF- κ B dans un contexte de déficience en BMI1, au niveau de neurones matures *in vitro*, nous avons procédé à des expériences de délétion du gène BMI1 et d'inhibition de BMI1 à 50 jours de culture. Plusieurs travaux de recherche qui se sont intéressés au vieillissement des neurones, de la sénescence neuronale et de la neurodégénérescence ont démontré que lorsque les neurones étaient maintenus en culture plus de 45 jours, ils pouvaient exhiber des caractéristiques de sénescence cellulaire et de neurodégénérescence^{115,116,38,48}. Étant donné que nous commençons à observer des signes de neurodégénérescence *in vitro* après 45 jours sur plusieurs cultures de neurones, en combinant ces observations avec celles rapportées dans la littérature nous avons opté pour une période comprise entre 50 et 60 jours de culture *in vitro* pour procéder à nos expériences.

Avec la technologie CRISPR/cas9 nous avons procédé au *knockout* de BMI1 en ciblant les séquences de l'exon 3 du gène BMI1. Le protocole que nous avons utilisé a nécessité la réalisation de trois transfections qui étaient espacées de 2 à 3 jours après 24h d'incubation. Nous avons constaté qu'à la troisième transfection, les cellules transfectées pouvaient exhiber les mêmes caractéristiques microscopiques que les neurones gardés en culture plus de 70 jours, comparativement au groupe non transfecté (Figure 19).

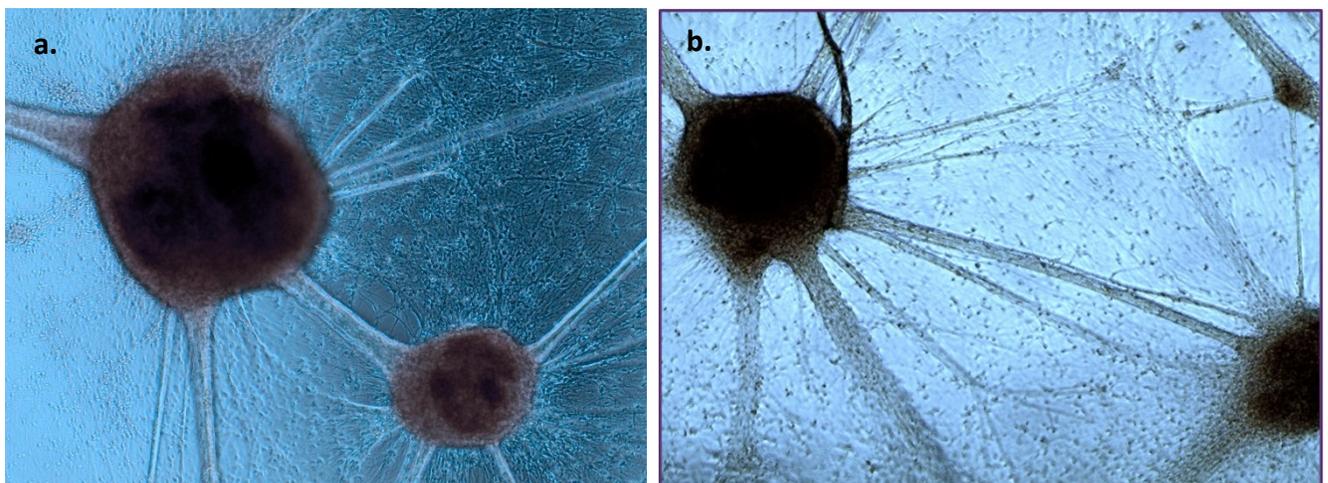


Figure 40: a) Image microscopique (10x) de neurones matures *Scrambled* (contrôle) à 59 jours de culture. b) Image microscopique (10x) montrant une régression du réseau axonal et dendritique de manière prématurée comparativement au groupe contrôle, 24h00 suivant la troisième transfection avec le mix CRISPR/cas9/gRNA. Source :A.Moursli_Labo G.Bernier_CRHMR_Mars2020.

Avec la technique d'Immuno-buvardage nous avons analysé les résultats d'une expérience (n=1) de la délétion du gène BMI1 avec le CRISPR/cas9. Nous obtenons une baisse de l'expression de la sous-unité p65-Totale d'environ 82% dans les neurones corticaux matures comparativement au groupe contrôle (Figure 20). Ces résultats rejoignent ceux présentés plus haut au niveau des HEK293T. Il apparaît que la déficience en BMI1 est associée à une diminution de l'expression de NF- κ B aussi bien dans des cellules immortalisées comme au niveau des cellules non mitotiques telles que des neurones matures.

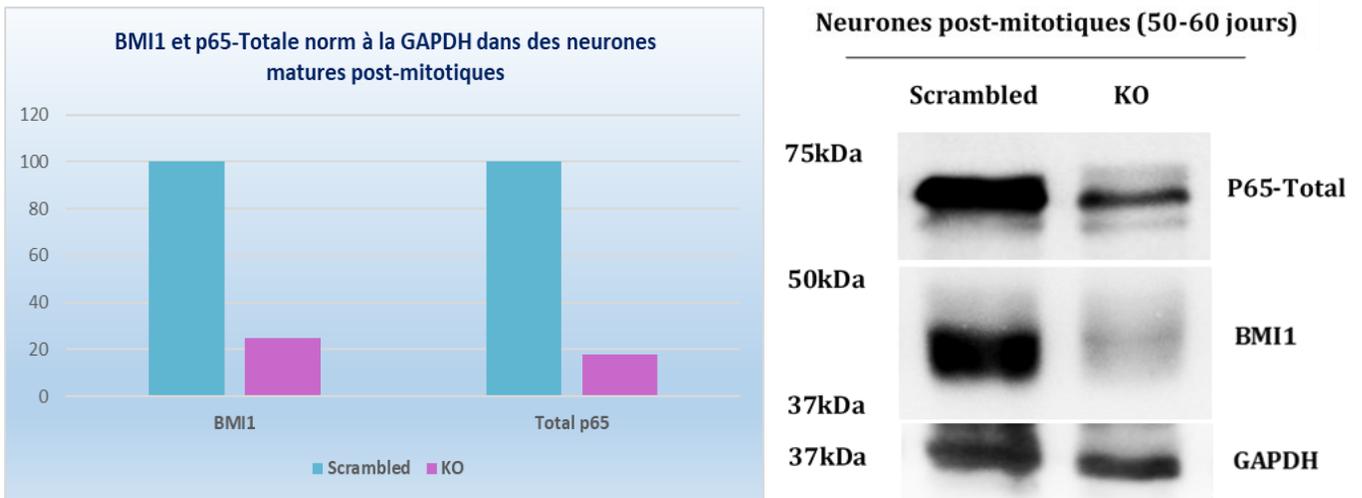


Figure 41: Analyse par immuno-buvardage des résultats de la délétion du gène BMI1 au niveau de neurones matures post-mitotiques. La délétion du gène BMI1 induit une baisse de l'expression de p65-totale de près de 80% comparé au groupe de neurones contrôle (*Scrambled*)

En plus de la technique du buvardage, nous avons également eu recours à la méthode RT-qPCR, d'un côté pour valider l'efficacité du *knockout* de BMI1 mais également pour analyser l'expression des deux sous-unités p50 et p65 du complexe NF- κ B au niveau des neurones déficients en BMI1. Les résultats de RT-qPCR obtenus sont en corrélation avec ceux des niveaux protéiques puisque nous observons une baisse très importante des p65 et p50 au niveau des neurones *knockout* comparativement au groupe contrôle (n=1) (Figure 21).

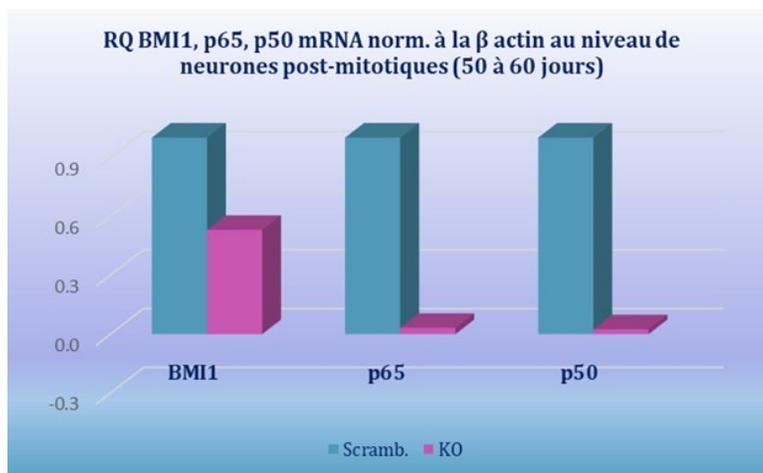


Figure 42: Analyse par RT-qPCR des résultats de la délétion du gène du BMI1 avec CRISPR/cas9. Absence de l'expression des ARN messagers des sous unités p50 et p65 au niveau des neurones déficients en BMI1.

Au niveau de neurones mature *in vitro*, la déficience en BMI1 n'est pas associée à une production d'IL6 et IL8

En nous appuyant sur les résultats présentés à la figure 21, nous avons analysé au niveau transcriptionnel l'expression de certains gènes ciblés par le facteur de transcription NF- κ B et qui sont aussi été associées à *l'inflammaging*, soit les interleukines 6 et 8. Comme indiqué à la figure 22, l'analyse par RT-qPCR démontre que l'expression des ARNm de l'IL6 et de IL8 est diminuée au niveau du groupe de neurones avec une délétion du gène *BMI1*. Ces résultats, viennent corroborer, dans une certaine mesure car il s'agit d'une seule expérience (n=1), les résultats de RT-qPCR présentés à la figure 21 et qui indiquent une diminution dans l'expression des sous unités p65 et p50 du facteur NF- κ B.

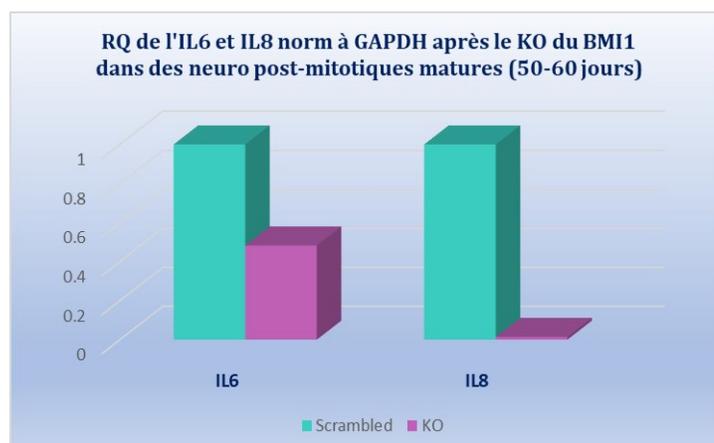


Figure 43: Analyse par RT-qPCR de l'expression des IL6 et IL8 au niveau de neurones mature post-mitotiques suite à la délétion du gène BMI1 avec CRISPR/cas9

L'amputation du gène BMI1 au niveau de neurones matures post-mitotiques est également corrélée à une absence de l'activation de STAT3

La protéine STAT3, tout comme le facteur NF- κ B, est une molécule qui fait partie de la famille des facteurs de transcription¹¹⁷. Dans le contexte de notre projet nous nous sommes intéressés à cette protéine d'une part en raison de son rôle dans les phénomènes de la sénescence^{118,119}, mais aussi en raison de son interaction physique avec le facteur de transcription NF- κ B au niveau de l'ADN lors de la transcription de certains gènes cibles telle que celui de l'IL6¹¹⁷. Dans les fibroblastes pulmonaires humains, le passage de la cellule en état de sénescence s'accompagnerait d'une augmentation de la translocation du Stat3 vers le noyau et les mitochondries¹¹⁸. Une fois activé par le biais de MSK2, le facteur Stat3 participerait à augmenter la rétention intranucléaire de NF- κ B à travers son acétylation via la p300 acétyltransférase¹²⁰. Avec la baisse de l'expression de NF- κ B au niveau des neurones et HEK293T déficients en BMI1 (figures 12, 14 et 20), nous nous sommes demandé si au niveau de ces mêmes neurones nous allions obtenir un effet antagoniste à celui obtenu avec la protéine p65-totale, autrement dit une activation de STAT3 qui serait secondaire à une production d'IL6. En effet, une des voies d'activation du facteur STAT3 (tyr705) fait appel aux récepteurs de cytokines et l'IL6, ce qui participerait à une induction prématurée de la sénescence¹¹⁷. Bien au contraire, nos résultats indiquent que l'absence de BMI1 n'induit pas l'activation du facteur Stat3 (n=1). (Figure 23).

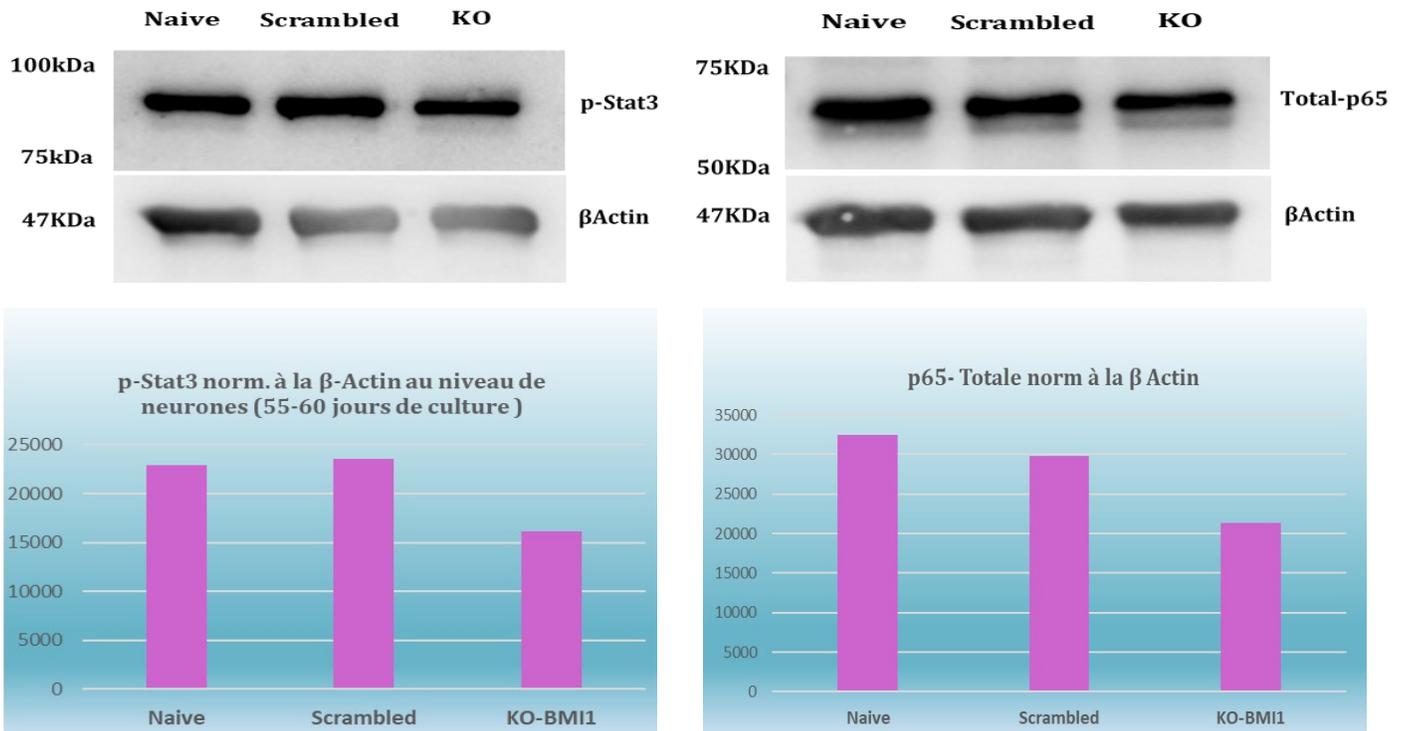


Figure 44: Analyse par immuno-buvardage des résultats du knockout de BMI1 au niveau de neurones matures post mitotiques indiquant qu'une déficience en BMI1 se traduit par une inactivation des facteurs stat3 et NF- κ B. 55

L'inhibition du BMI1 n'induit pas la production de la cytokine IL8 au niveau de neurones matures

En nous appuyant sur les résultats présentés aux figures 21 et 22, nous avons voulu savoir si l'inhibition de BMI1 avec un shBMI1 allait influencer l'expression des cytokines ciblées par le facteur de transcription NF- κ B soit l'IL8. Comme indiqué à la figure 24, l'analyse par RT-qPCR nous a permis de valider le *knockdown* de BMI1 et l'expression de l'ARNm de l'IL8. Les résultats que nous montrons sont ceux d'une seule expérience, viennent corroborer, dans une certaine mesure, ceux aux figures 21 et 22 qui indiquent une diminution dans l'expression des sous unités p65 et p50 du facteur NF- κ B et des interleukines 6 et 8 dans un contexte de déficience en BMI1.

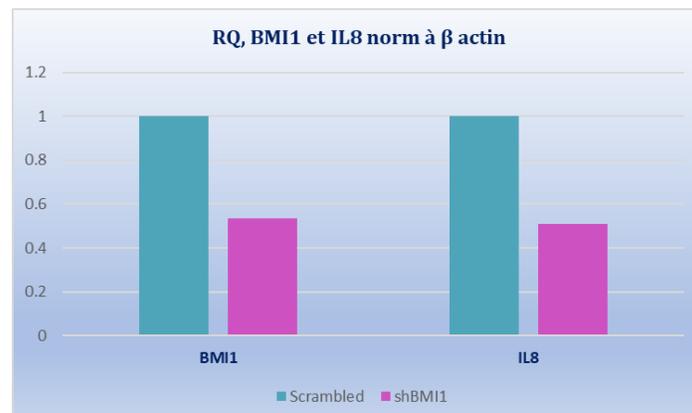


Figure 45: Analyse par RT-qPCR de l'expression de l'IL8 au niveau de neurones mature post-mitotiques suite à l'inhibition de BMI1 avec un plasmide (ShBMI1)

La déficience en BMI1 dans des neurones matures post-mitotiques n'induit pas l'activation de p38MAPK

Les protéines kinases activées par les mitogènes p38 (p38MAPK) font partie d'une voie de signalisation cible de plusieurs facteurs de stress cellulaires telle que les dommages à l'ADN ou encore le stress oxydatif⁶⁷. Ces protéines jouent également un rôle important dans l'induction de la sénescence cellulaire au niveau de cellules mitotiques et la production de cytokines en lien avec les phénotypes sécrétoires associés à la sénescence et l'*inflammaging*¹²¹. La molécule p38MAPK remplirait cette fonction à travers l'activation simultanée de p53 et de pRb et donc l'induction de l'arrêt du cycle cellulaire⁶⁷. Il a également été rapporté que p38MAPK contribuait à l'amplification du signal d'activation de NF- κ B à travers l'activation de protéines kinases activées par des mitogènes- et le stress (MSK1 et MSK2)¹²². Les MSK (1 et 2) activent p65 par sa phosphorylation en Ser 276. De plus, à travers l'action de MSK2, p38MARK contribue également à une réponse inflammatoire par le biais de l'activation du facteur de transcription Stat3¹²².

Étant donnée le rôle de p38MAPK dans l'induction de la sénescence et la potentialisation de l'activation de NF- κ B, nous avons voulu savoir si l'expression de p-p38 était modulé à la baisse dans un contexte de déficiences en BMI1 comme c'était le cas avec p65-Totale et le facteur stat3. À cet égard, les résultats d'une seule expérience (n=1) indiquent qu'au niveau des neurones matures post-mitotiques ShBMI1 nous obtenons une diminution de l'activation de p38MAK comparé au groupe contrôle. Cette diminution est en corrélation avec la baisse de l'expression de p65-totale comme indiqué à la figure 25.

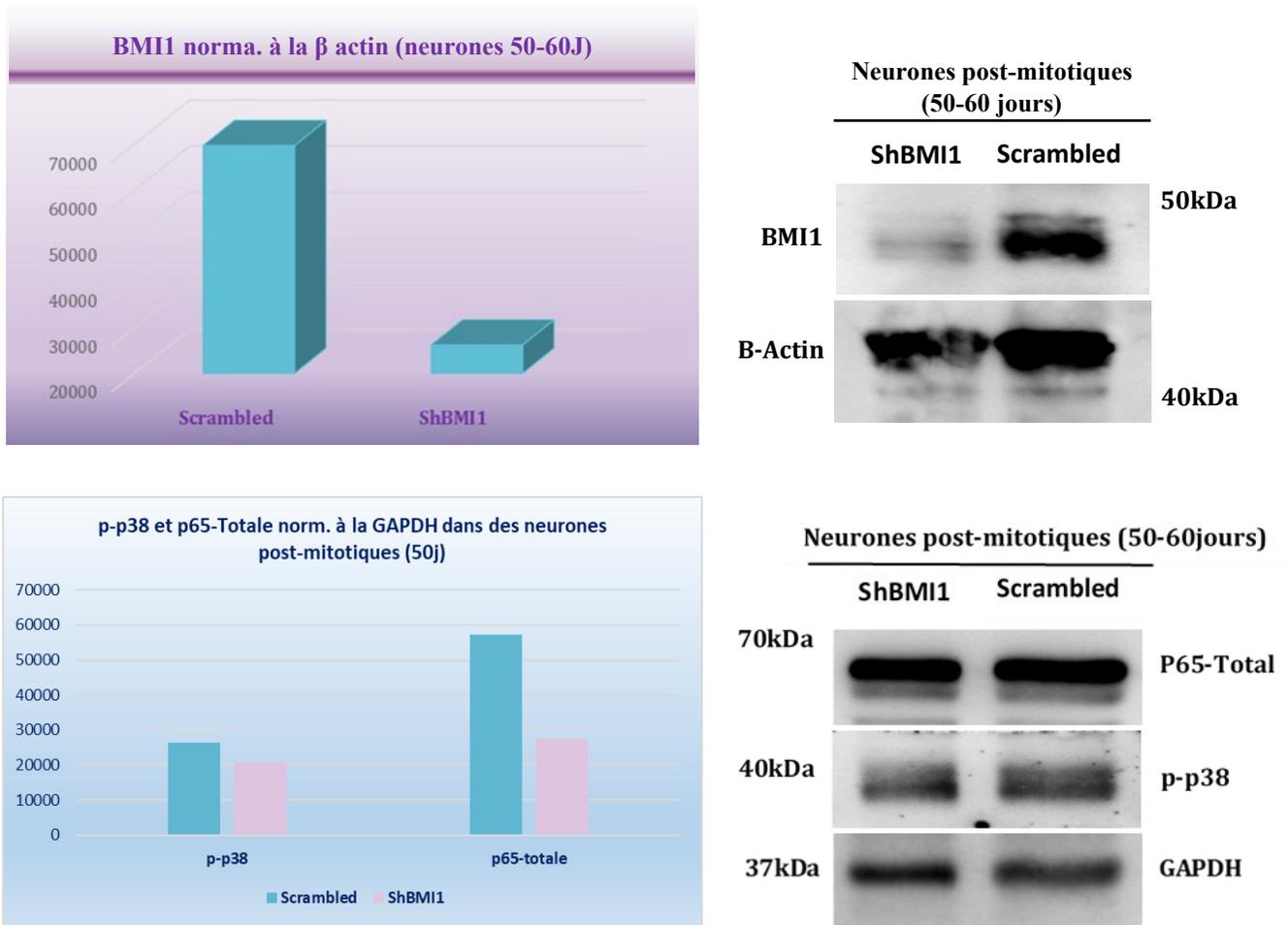
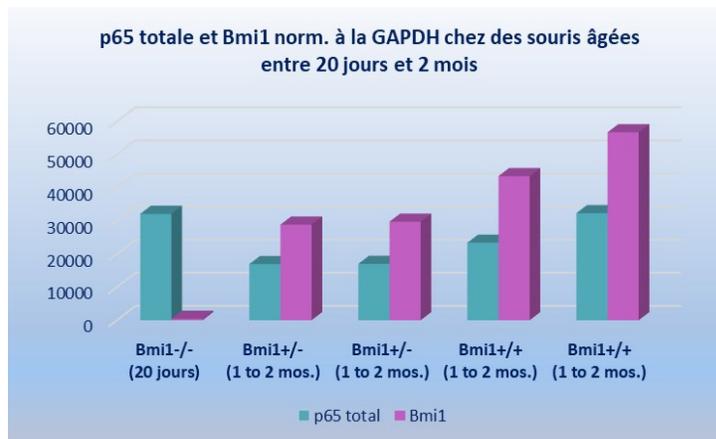
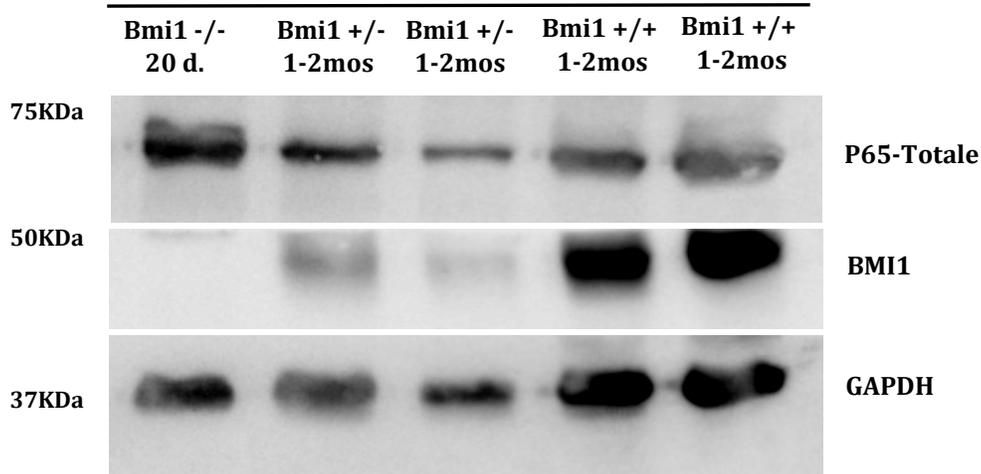


Figure 46: Analyse par immuno-buvardage des résultats de l'inhibition de BMI1 au niveau de neurones matures post mitotiques âgés entre 50 et 60 jours, indiquant une absence de l'activation de p38MAPK au niveau du groupe traité.

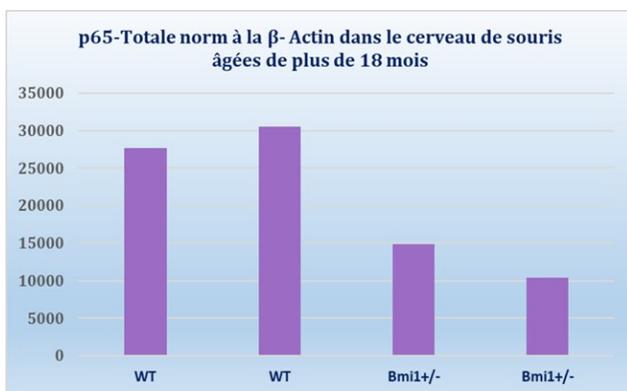
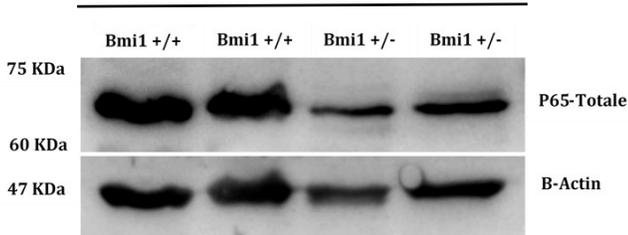
Les cerveaux de souris déficients en *Bmi1* (*Bmi1*^{-/-}) présentent une déficience en p65-totale lorsque comparés aux souris *Bmi1*^{+/+} indépendamment de l'âge.

Nous avons extrait et analysé des protéines provenant de neuf cerveaux de souris *Bmi1*^{+/-} et *Bmi1*^{+/+} âgées entre 20 jours et 24 mois. Nos résultats d'immuno-buvardage indiquent que la sous-unité p65-totale du facteur NF-κB est exprimée à la baisse dans un contexte de déficience en BMI1, soit chez les souris *Bmi1*^{+/-}. Cette baisse ne semble pas dépendre de l'âge des rongeurs, puisqu'elle est observée aussi bien chez les souris de moins de 2 mois comme celles âgées de plus de 16 mois. Néanmoins, il est intéressant de souligner que chez les souris totalement dépourvues du gène du BMI1, soit les *Bmi1*^{-/-}, l'expression de p65-Totale est largement augmentée et quasi-comparable à celle observée chez les souris *Bmi1*^{+/+} (Figure 26). Les souris *Bmi1*^{-/-} ont souvent une durée de vie qui dépasse rarement les 20 jours car l'absence totale du gène *Bmi1*^{-/-} est incompatible à la survie. Généralement les souris déficientes en *Bmi1* présentent de multiples retards de développement musculosquelettiques et de croissance, de nombreuses anomalies du système nerveux et hématopoïétique et une grande létalité postnatale^{123,124,125}. En effet, tout au long de la vie d'un organisme, les différents tissus qui le composent sont maintenus et régénérés grâce à un petit nombre de cellules souches adultes qui confèrent à cet organisme une forme de longévité^{126,127}. À cet égard, le BMI1 en tant que membre du groupe de polycomb (PcG), joue un rôle essentiel dans l'auto-renouvellement de ces cellules souches qu'elles soient d'origine hématopoïétique adulte ou neuronale^{126,127}. Ce rôle se traduit principalement par ses fonctions répressives de certains gènes impliqués dans les mécanismes de la sénescence cellulaire^{126,127}. Donc, une des causes de la courte durée de vie observée chez les souris *Bmi1*^{-/-} s'expliquerait potentiellement par l'induction d'un phénomène précoce et généralisé de sénescence cellulaire affectant plusieurs tissus et organes et par conséquent l'incapacité des cellules souches à se régénérer et à se différencier menant au décès de l'animal.

Souris âgées de moins de deux mois



Souris âgées de plus de 18 mois



Souris âgées de plus de 18 mois

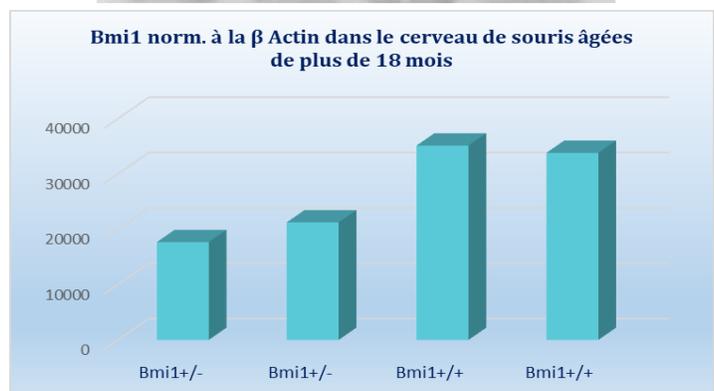
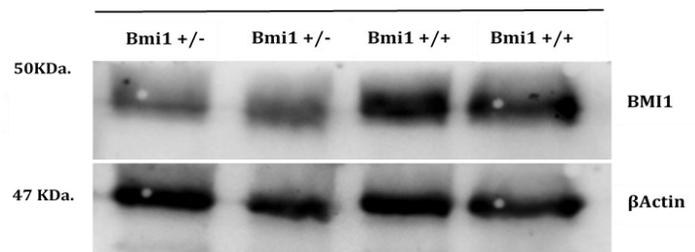


Figure 48: Analyse par immuno-buvardage de l'expression de p65-totale au niveau de cerveaux de souris *Bmi1* +/- indique une déficience en p65 comparé au cerveau de souris *Bmi1* +/+.

Discussion

Au meilleur de notre connaissance, l'étude de l'implication conjointe des molécules BMI1 et NF- κ B dans les mécanismes sous-jacents à l'*inflammaging* dans le contexte particulier de la neurodégénérescence n'a encore fait l'objet d'aucune publication. Néanmoins, l'interaction entre ces deux molécules a été décrite dans des travaux en lien avec des pathologies cancéreuses, auto-immunes et inflammatoires. Par exemple dans des études qui ont ciblés certains cancers tels que le cancer du sein, du pancréas et le cancer colorectal, la surexpression de l'oncogène BMI1 pourrait participer à l'activation du facteur NF- κ B et son inhibition participerait à bloquer l'activation de la cascade de signalisation du NF- κ B^{111,128,129}

Au niveau des neurones, qui sont des cellules non mitotiques, de prime abord il ne semble y avoir aucune connexion directe évidente entre les fonctions de ces deux molécules. En effet, le BMI1 qui est un oncogène participe à la répression de l'expression de certains gènes ayant un rôle principalement dans la prolifération cellulaire et l'auto-renouvellement (*self-renewal*) des cellules souches neuronales^{7,8,124,125}. Tandis que le facteur NF- κ B, qui est un facteur de transcription avec une localisation initialement cytoplasmique, requière une activation pour ensuite se transloquer dans le noyau et participer à la transcription de gènes impliqués dans les réponses immunitaires (adaptives et innées) et dans la survie de la cellule¹⁵.

En étant une protéine qui fait partie du PRC1, BMI1 joue un rôle majeur dans le remodelage de la structure de la chromatine afin de bloquer la transcription de gènes cibles tels que les gènes *CDKN2A-INK4A/ARF* et *HOX*^{130,131}. En plus de BMI1 et de Ring1B, une troisième protéine, soit Ring1A, participe à la composition du complexe PRC1. L'intégrité et la stabilité de ce complexe sont maintenues grâce à la liaison de BMI1 à la protéine Ring1B (Rnf2), qui est une ubiquitine ligase E3¹. Afin de pouvoir exercer leurs fonctions épigénétiques, les PcG sont intimement liés à la chromatine. Cette force de liaison se fragilise lors de la phosphorylation de BMI1 ainsi que d'autres protéines du PcG avec la protéine 3pK (MAPKAP kinase 3). MAPKAP kinase 3 représente un point de convergence en aval des voies de signalisation ERK et p38 une fois activées¹²⁹. La phosphorylation de BMI1 mène à la séparation du complexe PRC1 de la chromatine et la dérégulation des gènes cibles¹²⁹. Parmi ces gènes cibles figurent l'inhibition du locus *INK4A/ARF*¹⁰, ce qui confère à BMI1 un rôle important dans la prolifération cellulaire¹⁰. En effet, lorsqu'une cellule est exposée par exemple à une situation de stress pouvant induire la sénescence, la voie de signalisation de p38 est activée, il s'en suit une phosphorylation de BMI1

par MAPKAPK3, suivi de la séparation du complexe PRC1 de la chromatine et la transcription du locus *INK4A/ARF*¹²⁹. Comme expliqué lors de notre raisonnement scientifique, la perte de fonction de BMI1 est justement impliquée dans les phénomènes d'induction de la sénescence en partie à travers le rôle occupé dans la cascade de réactions enzymatiques qui mènent à l'activation de p16 et à l'arrêt du cycle cellulaire à travers l'inhibition de CDK4/6⁴⁷. D'un autre côté, l'activation d'ATM (DDR), suite à des dommages à l'ADN, mène également à l'activation de la voie p38 ce qui en retour active le facteur de transcription NF-κB à travers l'activation des MSK 1 et 2, et induit la production de phénotypes sécrétoires associés à la sénescence⁶⁷. Étant donné que nous savons très peu sur le degré d'implication de BMI1 dans les phénomènes associés à l'*inflammaging* et à la production de phénotypes pro-inflammatoires, spécifiquement au niveau de neurones corticaux ou dans un contexte de neurodégénérescence, dans le cadre de notre projet de maîtrise, nous nous sommes donc intéressés au rôle de cette molécule dans la production de cytokines pro-inflammatoires en utilisant des modèles *in vitro* et *in vivo* reproduisant un phénotype de neurodégénérescence.

Sur la base des résultats d'expériences (n=1) de délétion et d'inhibition de BMI1 *in vitro*, aussi bien au niveau de cellules HEK293T qu'au niveau de neurones matures post-mitotiques âgés entre 50 et 60 jours, il nous apparait que la déficience en BMI1 induit une inhibition du facteur de transcription NF-κB. Ces résultats s'observent également *in vivo* au niveau de cerveaux de souris *Bmi1*^{+/-} âgées aussi bien de 16 mois et plus comme de 2 mois et moins, suggérant que l'âge des souris ne semble pas être une variable qui influence ces résultats. D'un autre côté l'inhibition *in vitro* de la voie NF-κB au niveau de cellules HEK293T, avec un inhibiteur soit la molécule CAPE, a induit une baisse inattendue et systématique de l'expression du proto-oncogène BMI1. Ces résultats ont été obtenus avec 3 concentrations différentes de CAPE. À travers ces résultats, nous avons pu répondre à nos premiers questionnements sur la possibilité d'une interaction entre les molécules BMI1 et NF-κB. En effet, nous avons remarqué que lorsque le facteur NF-κB n'était pas inhibé au niveau des échantillons de DMSO ou lorsque la concentration de CAPE était trop élevée, l'expression de BMI1 n'était pas inhibé et elle était corrélée à l'expression de NF-κB. Autrement dit une baisse de l'expression de NF-κB s'accompagne d'une baisse de l'expression de BMI1.

À travers nos résultats, il apparaît que la protéine BMI1 semble avoir un rôle dans les fonctions du facteur NF- κ B. En effet, il existe fort probablement une interaction indirecte entre eux aussi bien *in vitro* au niveau de neurones matures post-mitotiques qu'*in vivo* dans le cerveau de souris. Les deux molécules varient en corrélation dans les mêmes directions, une inhibition du BMI1 induit une baisse de l'expression du facteur de transcription NF- κ B et vice-versa.

En outre, au niveau des neurones matures post-mitotiques, la délétion du gène BMI1 avec le CRISPR/cas9, n'induit aucune augmentation de la forme active de p65 comparativement aux cellules contrôles. Pareillement, cette baisse est également observée au niveau transcriptionnel avec les analyses d'ADNc qui nous indiquent une absence de l'expression des sous-unités p50 et p65. Dans un contexte de sénescence, la présence de phénotypes pro-inflammatoires n'est pas toujours systématique⁴¹, probablement parce que les protéines p16^{INK4A} et p14^{ARF} participent à l'inhibition direct du facteur NF- κ B⁶⁷. Étant donné que BMI1 est un puissant répresseur du locus *INK4/ARF*, dans un contexte de déficience en BMI1, l'inhibition de p65 observée trouverait possiblement son explication par l'activation des protéines p16^{INK4A} et p14^{ARF} qui en retour inhiberaient le facteur NF- κ B. Les analyses par RT-qPCR des échantillons de délétion et d'inhibition de BMI1, au niveau des neurones, révèlent de surcroît une baisse de l'expression des cytokines ciblées par le facteur NF- κ B soit les IL6 et IL8.

D'autres part, les résultats que nous présentons sont en accords avec certaines conclusions émises par Y. Okuyama et al (2018)¹³². En effet, le groupe démontre que BMI1 joue un rôle important dans la régulation de l'ubiquitination de I κ B α lors des cascades d'activation de NF- κ B. Les conclusions de leur étude confèrent à la molécule BMI1 une nouvelle fonction cytoplasmique dans les processus d'activation de NF- κ B. En se liant aux unités constitutives du complexe SCF (*Skp*, *Cullin*, *F-box*), une ubiquitine ligase de I κ B α , la protéine BMI1 participerait à l'ubiquitination de I κ B α et donc à sa dégradation, ce qui permettrait une activation du complexe NF- κ B et sa translocation dans le noyau.

Dans le cadre de nos résultats nous démontrons aussi que la déficience en BMI1 s'accompagne d'une inactivation du facteur de transcription STAT3. Comme mentionné auparavant, une fois activé, ce facteur est transloqué dans le noyau où il va physiquement interagir avec le facteur de transcription NF- κ B et permettre que son action soit prolongée durant la transcription des gènes visés par le facteur NF- κ B¹³⁰. L'activation du facteur STAT3 et sa phosphorylation au niveau de

la tyrosine 705, dépendent entre autres de son activation à travers des récepteurs cytokines¹³³. Parmi ces cytokines, l'IL6 a été identifié dans un contexte de sénescence prématurée et aussi dans les états de *l'inflammaging*^{66,117}. Il apparait à travers nos résultats que la déficience en BMI1 interfère avec la relation synergique qui existe entre les facteurs STAT3 et NF-κB en induisant une inhibition du facteur NF-κB et de ce fait l'expression de l'IL6 et l'inactivation du facteur STAT3.

D'autre part, un autre élément intéressant ressort à travers l'analyse de l'expression du facteur de transcription NF-κB au niveau de cerveaux de souris *Bmi1*^{-/-}. En effet, nous rapportons à la [figure 26](#), qu'au niveau du cerveau d'une souris âgée de 20 jours avec une déficience complète en *Bmi1*, le niveau d'expression de p65 totale est supérieur à celui des cerveaux de souris *Bmi1*^{+/-}. Comme expliqué dans la section des résultats, une déficience totale en *Bmi1* est incompatible avec la survie des souris au-delà de 3 à 4 semaines. Une des explications probables serait liée à l'induction d'un phénomène précoce et généralisé de sénescence cellulaire affectant plusieurs tissus et organes, et par conséquent l'incapacité des cellules souches à se régénérer et à se différencier ce qui mène au décès de l'animal. L'hypothèse moléculaire de ces événements serait également liée à l'activation des voies de signalisations qui mènent à une apoptose cellulaire suite à des dommages importants du double brin d'ADN qui ne peuvent être réparés en raison de cette déficience totale en BMI1. En effet, en 2009 le groupe de Liu J et al¹³⁴ démontrait que les cellules dérivées de souris *Bmi1*^{-/-} exhibaient une altération de la fonction mitochondriale, une augmentation intracellulaire d'espèces réactives de l'oxygène (*Reactive oxygen species*) et l'activation subséquente des voies de réponse aux dommages à l'ADN¹³⁴. Dans cette même optique, en 2011, un autre groupe, Ginjala V. et al¹³⁵, démontrait que la protéine BMI1 jouait un rôle indispensable dans les processus de réponse aux dommages à l'ADN à travers l'ubiquitination des histones H2A, au niveau de la lysine 119, induite par des dommages à l'ADN¹³⁵. La protéine BMI1, est en effet rapidement recrutée aux sites endommagés de l'ADN, où elle va demeurer attachée durant plus de 8 h¹³⁵. La perte totale de BMI1, comme observée chez les souris *Bmi1*^{-/-}, mène ainsi à une altération des voies de réparation par recombinaison homologue des ruptures du double brin d'ADN¹³⁵. Par conséquent, non seulement la déficience totale en BMI1 génère un état de stress intracellulaire qui devient une source continue d'induction des dommages à l'ADN mais interfère également avec les processus de réparation de l'ADN. D'un autre côté, ces dommages sont de puissants activateurs du facteur NF-κB^{136,137}. L'activation de NF-κB peut avoir lieu une à deux heures suivant la rupture du double brin d'ADN à travers l'activation de l'inhibiteur du complexe κB (IκB) kinase (IKK) et la

dégradation d'IκBα¹³⁶. Dans le cerveau de souris *Bmi1*^{-/-}, la déficience totale en Bmi1 causerait donc des dommages à l'ADN qui en retour activerait de manière chronique et importante le facteur NF-κB, ce qui pourrait expliquer l'augmentation de son expression. Afin de valider cette hypothèse il serait probablement pertinent de vérifier l'expression de p-p65, la forme active de NF-κB, ainsi que l'expression des molécules ATM, ATR, p-53 et H2AXγ.

Ainsi, une des hypothèses qui expliquerait la variation dans l'expression de NF-κB observée entre les modèles de souris *Bmi1*^{-/-} (ayant une déficience endogène complète en Bmi1) et les modèles *bmi1*^{+/-} (exprimant des niveaux endogènes intermédiaires de Bmi-1), serait liée à l'induction d'un état chronique de dommages à l'ADN secondaire à une absence totale de la protéine Bmi1 dans le cerveau de souris *Bmi1*^{-/-}. Tandis qu'au niveau du cerveau des souris *bmi1*^{+/-}, la présence de la protéine Bmi1 même en quantités inférieures à celles des souris *bmi1*^{+/+}, permettrait d'éviter l'installation d'un état chronique de dommages à l'ADN et donc l'absence d'une augmentation du facteur NF-κB.

L'augmentation du facteur NF-κB dans le cerveau de la souris *Bmi1*^{-/-}, pourrait aussi s'expliquer par le fait que le facteur NF-κB fonctionne comme un modulateur positif de la sénescence cellulaire¹³⁸. Comme rapporté précédemment, les souris *Bmi1*^{-/-}, ont une déficience totale en Bmi1 qui cause un état de stress endogène justifiant la présence d'un état de sénescence cellulaire précoce et généralisé des tissus. D'un autre côté, nous savons que les souris *Bmi1*^{-/-} sont enclin à une mort prématurée et certaines études indiquent qu'en réponse à un stress cellulaire, le facteur NF-κB favorise l'apoptose à travers l'accumulation nucléolaire de RelA (p65-Totale)^{139, 140}. À cet égard, l'augmentation de NF-κB pourrait également s'expliquer par l'activation des voies de l'apoptose et qui mèneraient à la translocation de RelA dans le nucléole, suite à une activation par des facteurs de stress lié à la déficience en Bmi1 tel que l'inhibition de CDK4¹⁴¹. Dans ce contexte, l'apoptose serait médiée par le déplacement de la protéine nucleophosmin (NPM) à partir du nucléole vers le cytoplasme pour se lier à BAX (*BCL2 Associated X, Apoptosis Regulator*) et le chaperonner jusqu'au niveau des mitochondries¹⁴¹. Afin de valider cette hypothèse, il serait intéressant de vérifier l'expression de BAX au niveau des cerveaux de souris *Bmi1*^{-/-} et *bmi1*^{+/-}.

Bien que dans le cadre de ce projet, nous présentons des résultats générés à partir d'expériences non dupliquées, nos résultats convergent tout de même vers des conclusions similaires à celles obtenues dans des études réalisées au niveau de pathologies cancéreuses. À cet égard, nous

démontrons que la déficience en BMI1 au niveau des neurones aussi bien *in vivo* qu'*in vitro* est associée à une inactivation du facteur de transcription NF- κ B. Ces observations suggèrent que d'autres mécanismes sont impliqués dans l'activation de ce complexe dans un contexte de neurodégénérescence et qui favoriseraient le maintien d'un état inflammatoire chronique lié à l'*inflammaging*.

Limites du projet : notre projet se voulait exploratoire d'une problématique neurodégénérative complexe à plusieurs égards et qui suscite beaucoup d'intérêt. Cependant, nous reconnaissons à notre projet certaines limites dus à plusieurs facteurs que nous aimerions exposer dans ce qui suit.

Dans un premier temps les résultats présentés ont été obtenus suite à des expériences qui n'ont pas été dupliquées. Afin de donner une puissance statistique à nos observations, il serait pertinent de reproduire ces expériences aussi bien au niveau de cellules mitotiques comme non mitotiques. De plus, le choix des cellules HEK293T a été intéressant durant les premières étapes du projet car ces cellules nous ont permis d'ajuster nos concentrations et de voir le comportement de cellules mitotiques déficientes en BMI1. Néanmoins, des cellules capables d'adopter un état sénescence comme les fibroblastes, offriraient une information plus adéquate quant à l'étude des phénotypes pro-inflammatoires dans un contexte de sénescence cellulaire. Il aurait également été pertinent de reproduire ces expériences au niveau des neurones matures post-mitotiques. Cependant la génération de cultures de neurones peut en soit présenter plusieurs défis. Parmi ces facteurs limitants nous pouvons citer la dimension temporelle. En effet, les cultures de neurones humains, obtenus à partir de cellules embryonnaires humaines, demandent jusqu'à 4 mois de maintien en culture avant de pouvoir procéder à des expériences. De plus, de par leur fragilité, il n'est pas rare que ces cultures ne fassent l'objet d'infections à *Mycoplasma* ou autres microorganismes, ce qui mène à la perte totale du matériel biologique. Compte tenu de cette réalité et par soucis de rationnement, nous avons opté pour des designs expérimentaux où les cellules HEK293T étaient utilisées en premiers lieux soit pour ajuster des concentrations de molécules, ou pour des tests de délétion et d'inhibition du BMI1.

La technique du CRISPR/cas9 que nous avons utilisé afin d'induire une délétion artificielle du gène BMI1 est une puissante technologie d'édition du génome, mais avec certaines limitations liées aux facteurs suivants :

- Les effets hors cibles ne sont pas rares avec la technologie CRISPR/cas9 et sont la conséquence de mutations *indels* inattendues induites au niveau de sites qui ne sont pas ceux ciblés par le mix CRISPR/cas9. Souvent ces sites partagent des séries de séquences similaires à celles du gène ciblé¹⁴². L'effet hors cible se traduit par une délétion incomplète du gène d'intérêt, par exemple dans le cas de nos expériences il nous a été difficile d'obtenir une délétion complète du gène BMI1 supérieure à 70% au niveau des cellules HEK293T. Par contre au niveau des neurones matures post-mitotiques nous avons pu obtenir, dans deux expériences, une délétion d'environ 80% vérifiée uniquement par immunobuvardage.
- Le principe d'action de la technologie CRISPR/cas9 repose essentiellement sur la fonction de cas9 à induire des ruptures du double brin d'ADN (DSB) qui sont réparées soit par le mécanisme de jonction d'extrémités non homologues (NHEJ) ou par la réparation dirigée par l'homologie (HDR)^{132,143}. À travers son action, la cas9 cause donc des dommages à l'ADN qui activent les voies de signalisation (ATR) qui mènent à un état de sénescence cellulaire et ce qui par conséquent peut interférer avec l'efficacité et la précision de la délétion du gène cible¹³³.

CONCLUSION

La maladie d'Alzheimer est une condition de santé extrêmement débilante. Son diagnostic précoce demeure impossible de même qu'il n'existe aucun traitement pouvant stopper son évolution. De plus en plus, on reconnaît aux processus inflammatoires chroniques de faible degré ou *l'inflammaging*, un rôle important dans la genèse de la démence, le déclin cognitif et d'autres phénotypes neurodégénératifs liés au vieillissement. En effet, l'implication du facteur de transcription NF-κB dans la production des phénotypes pro-inflammatoires associés à la sénescence au niveau de cellules mitotiques a fait l'objet de plusieurs études. Néanmoins, très peu de travaux existent sur l'implication conjointe de la molécule BMI1 et du facteur NF-κB dans les mécanismes de *l'inflammaging* dans un contexte de neurodégénérescence. La motivation première de ce projet de maîtrise était d'apporter une information additionnelle qui pourrait aider à la compréhension des mécanismes sous-jacents aux phénomènes de *l'inflammaging* dans le contexte de la neurodégénérescence.

ANNEXES

1. Liste des amorces humaines utilisés en RT-qPCR

<i>Amorces</i>	<i>Reverse</i>	<i>Forward</i>
B-Actin	TTTCGTGGATGCCACAGGAC	TACCTCATGAAGATCCTCACC
NF-κB p65	ATCATTCTCTAGTGTCTGGTTGG	AGGCAAGGAATAATGCTGTCCTG
NF-κB p50	TGTTGTAATGAGTCGTCATCCT	TGGACAGCAAATCCGCCCTG
IL8	AGCAGACTAGGGTTGCCAGA	TAGCAAAATTGAGGCCAAGG
IL6	GGTCTGTTGTGGGTGGTATC	CTCCGCAAGAGACTTCCAG
GAPDH	ATCCACAGTCTTCTGGGTGG	TCACCAGGGCTGCTTTTAAC

2. Liste des Anticorps primaires utilisés dans l'immuno-buvardage

<i>Anticorps et type</i>	<i>Source</i>	<i>#cat</i>
GAPDH Souris	Santa Cruz Biotechnology	sc-166545
B Actin Souris	Genetex	GTX109639
BMI1 (D42B3) Lapin	Cell signaling technology	5856
Phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182) Lapin	Cell signaling technology	9211
NF-κB p65 Lapin	Cell signaling technology	8242
Phospho-NF-κB p65 (ser536) Lapin	Cell signaling technology	3033
p-Stat3 (Tyr 705) Lapin	Cell signaling technology	9145

RÉFÉRENCES

- ¹ Nussbaum R. L. & Ellis, C. E. (2003): Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *N. Engl. J. Med.* 348, 1356–1364.
- ² Vann Jones Simon and Ilias Kounatidis (2017): Nuclear Factor-Kappa B and Alzheimer Disease, Unifying Genetic and Environmental Risk Factors from Cell to Humans. *Front. Immunol.*, 11. Repéré à: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01805>.
- ³ Wimo Anders, Maëlen Guerchetd, Gemma-Claire Alid, Yu-Tzu Wue, A. Matthew Prinad, Bengt Winbladb, Linus Jönssonb, Zhaorui Liuf, Martin Prince (2017): The worldwide costs of dementia 2015 and comparisons with 2010. doi: 10.1016/j.jalz.2016.07.150. Epub 2016 Aug 29.
- ⁴ Gaugler J., Bryan James, Tricia Johnson, Allison Marin, and Jennifer Weuve (2019): 2019 Alzheimer's disease facts and figures. Alzheimer's Association report / Alzheimer's & Dementia 15 (2019) 321-387.
- ⁵ Lopez Oscar L., (2011): The Growing Burden of Alzheimer's Disease. *The American Journal of Managed Care.* Vol. 17, No. 13.
- ⁶ Kritsilis Marios, Sophia V. Rizou, Paraskevi N. Koutsoudaki, Konstantinos Evangelou, Vassilis G. Gorgoulis, and Dimitrios Papadopoulos (2018): Ageing, Cellular Senescence and Neurodegenerative Disease. *Int. J. Mol. Sci.* 19, 2937; doi:10.3390/ijms19102937.
- ⁷ Baker DJ et al. (2011): Clearance of p16Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders. *Nature* 479, 232–236. [PubMed: 22048312]
- ⁸ Baker DJ et al. (2016): Naturally occurring p16(Ink4a)-positive cells shorten healthy lifespan. *Nature* 530, 184–189. [PubMed: 26840489]
- ⁹ Bussian Tyler J., Asef Aziz, Charlton F. Meyer, Barbara L. Swenson, Jan M. van Deursen, and Darren J. Baker (2018): Clearance of senescent glial cells prevents tau-dependent pathology and cognitive decline. *Nature.* 562(7728): 578–582. doi:10.1038/s41586-018-0543-y.
- ¹⁰ Jacobs JJ, Scheijen B, Voncken JW, Kieboom K, Berns A, van Lohuizen M. (1999): Bmi-1 collaborates with c-Myc in tumorigenesis by inhibiting c-Myc-induced apoptosis via INK4a/ARF. *Genes Dev.* 13:2678–90.
- ¹¹ Yan Liu, Fan Liu, Hao Yu, Xinyang Zhao, Goro Sashida, Anthony Deblasio, Michael Harr, Qing-Bai She, Zhenbang Chen, Hui-Kuan Lin, Silvana Di Giandomenico, Shannon E. Elfl, Youyang Yang, Yasuhiko Miyata, Gang Huang, Silvia Menendez, Ingo K. Mellinshoff, Neal Rosen, Pier Paolo Pandolfi, Cyrus V. Hedvat, and Stephen D. Nimer (2013): Akt Phosphorylates the Transcriptional Repressor Bmi1 to Block Its Effects on the Tumor-Suppressing Ink4a-Arf Locus. *Sci Signal.* 5(247): ra77. doi:10.1126/scisignal.2003199
- ¹² Guangliang Cao; Gu, Minxia; Zhu, Min; Gao, Junying; Yin, Ying; Marshall, Charles; Xiao, Ming; Ding, Jiong; and Miao, Dengshun, (2012): Bmi-1 Absence Causes Premature Brain Degeneration. *PLoS ONE.* 7(2) 1-9. Repéré à <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032015>

-
- ¹³ El Hajjar Jida, Wassim Chato, Roy Hanna, Patrick Nkanza, NicolasTétreault, Yiu ChungTse, Tak PanWong, MohamedAbdou, Gilbert Bernier (2019): Heterochromatic genome instability and neurodegeneration sharing similarities with Alzheimer's disease in old Bmi1^{+/-} mice. Scientific report. Vol. 9, Iss. 1. DOI:10.1038/s41598-018-37444-3
- ¹⁴ Flamier Anthony, Jida El Hajard, James Adjaye, Karl J Fernandes, Mohamed Abdouh, Gilbert Bernier (2018): Modeling Late-Onset Sporadic Alzheimer's Disease through BMI1 Deficiency. Cell Rep. 29;23(9):2653-2666. doi: 10.1016/j.celrep.2018.04.097.
- ¹⁵ Ruey-Hong Shih, Chen-YuWang and Chuen-MaoYang (2015): NF-kappaB Signaling Pathways in Neurological Inflammation: A Mini Review. Front. Mol. Neurosci. 8:77. doi:10.3389/fnmol.2015.00077
- ¹⁶ Chien Yuchen, Claudio Scuoppo, Xiaowo Wang, Xueping Fang, Brian Balgley, Jessica E. Bolden, Prem Premririt, Weijun Luo, Agustin Chicas, Cheng S. Lee, Scott C. Kogan, and Scott W. Lowe (2011): Control of the senescence-associated secretory phenotype by NF-kB promotes senescence and enhances chemosensitivity. Genes et development 25:2125–2136, Repéré à <http://www.genesdev.org/cgi/doi/10.1101/gad.17276711>.
- ¹⁷ Maurer Konrad, Stephan Volk, Hector Gerbaldo, (1997): Auguste D and Alzheimer's disease. Lancet 1997; 349: 1546–49.
- ¹⁸ Villemagne VL, Burnham S, Bourgeat P, Brown B, Ellis KA, Salvado O, et al. (2013) Amyloids deposition, neurodegeneration, and cognitive decline in sporadic Alzheimer's disease: A prospective cohort study. Lancet Neurol 12:357–67.
- ¹⁹ Herculano-Houzel S. (2009): The human brain in numbers: a linearly scaled-up primate brain. Frontiers in Human Neuroscience, Vol3: 31.
- ²⁰ Alberghina Lilia & Anna Maria Colangelo (2006): The modular systems biology approach to investigate the control of apoptosis in Alzheimer's disease neurodegeneration. BMC Neuroscience. 7(Suppl 1): S2. doi:10.1186/1471-2202-7-S1-S2
- ²¹ Agostaa Federica, Keith A. Vossela, Bruce L. Millera, Raffaella Migliaccioa,c, Stephen J. Bonaseraa, Massimo Filippib, Adam L. Boxera, Anna Karydasa, Katherine L. Possina, and Maria Luisa Gorno-Tempinia, (2009) Apolipoprotein E 4 is associated with disease-specific effects on brain atrophy in Alzheimer's disease and frontotemporal dementia. The National Academy of Sciences of the USA. 106 (6) Repéré à :<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0812697106>.
- ²² Azevedo Estefania P., Foguel, D. (2018): The role of inflammation in amyloid Diseases. doi: <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.81888>.
- ²³ Hyoung-gon Lee, GeorgePerrya, Paula I. Moreiraab, Matthew R.Garretta, Quan Liua, Xiong wei Zhua, Atsushi Takedac, Akihiko Nunomurad, Mark A.Smith.(2005): Tau phosphorylation in Alzheimer's disease: pathogen or protector? Trends in molecular medicine. Volume 11, Issue 4, Pages 164-169. Repéré à <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2005.02.008>.
- ²⁴ Goran Šimi, Mirjana Babi, Leko Selina Wray, Charles Harrington, Ivana Delalle, Nataša Jovanov-Miloševi, Danira Bažadona, Luc Buée, Rohan de Silva, Giuseppe Di Giovanni, Claude Wischik and

Patrick R. Hof (2016): Tau Protein Hyperphosphorylation and Aggregation in Alzheimer's Disease and Other Tauopathies, and Possible Neuroprotective Strategies. *Biomolecules*. 6, 6. doi:10.3390/biom6010006.

²⁵ Cardone MH, Roy N, Stennicke HR, Salvesen GS, Franke TF, Stanbridge E, Frisch S, Reed JC (1998): Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science*, 282:1318-1321.

²⁶ Mann D. M. A. (1991): The topographic distribution of brain atrophy in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol*. 83:81 – 86.

²⁷ Wu Long and Liqin Zhao (2016): ApoE2 and Alzheimer's disease: time to take a closer look. *Neural Regen Res*. 11(3): 412–413. doi: 10.4103/1673-5374.179044.

²⁸ Jungsu Kim, Jacob M. Basak, and David M. Holtzman (2009): The Role of Apolipoprotein E in Alzheimer's Disease. *Neuron*. 13; 63(3): 287–303. doi: 10.1016/j.neuron.2009.06.026.

²⁹ Mahley RW, Weisgraber KH, Huang Y. Apolipoprotein E4 (2006): A causative factor and therapeutic target in neuropathology, including Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.*; 103:5644–5651.

³⁰ Farrer LA, et al. (1997): Effects of age, sex, and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease. A meta-analysis. APOE and Alzheimer Disease Meta Analysis Consortium *JAMA* 278(16):1349-56.

³¹ Cosentino S., N. Scarmeas, E. Helzner, M. M. Glymour, J. Brandt, M. Albert, D. Blacker, Y. Stern (2008): APOE ε4 allele predicts faster cognitive decline in mild Alzheimer disease. *Neurology*. 70 (19 Part 2) Repéré à: <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000304038.37421.cc>.

³² Schott J.M, N C Fox, M N Rossor (2002): genetics of the dementias. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 73(Suppl II):ii27–ii31. Repéré à http://dx.doi.org/10.1136/jnnp.73.suppl_2.ii27.

³³ Snyder Heather M., Lisa J. Bain, Adam M. Brickman, Maria C. Carrillo, Anna J. Esbensen, Joaquin M. Espinosa, Fabian Fernandez, Juan Fortea, Sigan L. Hartley, Elizabeth Head, James Hendrix, Priya S. Kishnani, Florence Lai, Patrick Lao, Cynthia Lemere, William Mobley, Elliott J. Mufson, Huntington Potter, Shahid H. Zaman, Ann-Charlotte Granholm, H. Diana Rosas, Andre Strydom, Michelle Sie Whitten, Michael S. Rafii (2020): Further understanding the connection between Alzheimer's disease and Down syndrome. *Alzheimer's Dement*; 16:1065–1077.

³⁴ Menendez M. (2005): Down syndrome, Alzheimer's disease and seizures. *Brain Dev*. 27: 246–252.

³⁵ Crous-Bou Marta, Carolina Minguillón, Nina Gramunt and José Luis Molinuevo (2017): Alzheimer's disease prevention: from risk factors to early intervention. *Alzheimer's Research & Therapy*. 9:71.

³⁶ Henshilwood CS, D'erricoc F, Mareand CW, Miloe RG, Yates R. (2001): An early bone tool industry from the middle stone age at blombos cave, south africa: Implications for the origins of modern human behaviour, symbolism and language. *J Hum Evol*. 41: 631–678.

³⁷ Hou Yujun, Xiuli Dan, Mansi Babbar, Yong Wei, Steen G Hasselbalch, Deborah L Croteau, Vilhelm A Bohr. (2019): Ageing as a risk factor for neurodegenerative disease. 15(10):565-581. doi: 10.1038/s41582-019-0244-7.

-
- ³⁸ Ishikawa S. and Fuyuki Ishikawa (2019): Proteostasis failure and cellular senescence in long-term cultured postmitotic rat neurons. *Aging Cell*. 19(1): e13071. doi: 10.1111/accel.13071
- ³⁹ López-Otín Carlos, Maria A. Blasco, Linda Partridge, Manuel Serrano, and Guido Kroemer (2013): The Hallmarks of Aging. *Cell*. 153(6): 1194–1217. doi: 10.1016/j.cell.2013.05.039
- ⁴⁰ Campisi J. (2005): Senescent Cells, Tumor Suppression, and Organismal Aging: Good Citizens, Bad Neighbors. *Cell*. 120:513-522.
- ⁴¹ Rodier F., Coppe J. P., Patil C. K., Hoeijmakers W. A., Munoz D. P., Raza S. R., et al. (2009). Persistent DNA damage signalling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion. *Nat. Cell Biol*. 11, 973–979. 10.1038/ncb1909.
- ⁴² Pawlikowski Jeff S., Peter D. Adams and David M. Nelson (2013): Senescence at a glance. *Journal of Cell Science* 126, 4061–4067. doi: 10.1242/jcs.109728.
- ⁴³ Anat Biran, Lior Zada, Paula Abou Karam, Ezra Vadai, Lior Roitman, Yossi Ovadya, Ziv Porat and Valery Krizhanovsky (2017): Quantitative identification of senescent cells in aging and disease. *Aging cell*. 16: 661–671. Doi: 10.1111/accel.12592
- ⁴⁴ Prieto Luis I., Sara I. Graves and Darren J. Baker (2020): Insights from In Vivo Studies of Cellular Senescence. *Cells*. 9:954. doi:10.3390/cells9040954. Repéré à www.mdpi.com/journal/cells.
- ⁴⁵ Childs BG et al. (2016): Senescent intimal foam cells are deleterious at all stages of atherosclerosis. *Science* 354, 472–477. [PubMed: 27789842]
- ⁴⁶ Hickson LaTonya J, Larissa G.P. Langhi Prata, Shane A. Bobart, Tamara K. Evans, Nino Giorgadze, Shahrukh K. Hashmi, Sandra M. Herrmann et al. (2019): Senolytics decrease senescent cells in humans: Preliminary report from a clinical trial of Dasatinib plus Quercetin in individuals with diabetic kidney disease. *EBioMedicine*. 47: 446–456.
- ⁴⁷ Herranz Nicolás, Jesús Gil (2018): Mechanisms and functions of cellular senescence. *J Clin Invest*. 2018;128(4):1238-1246. Repéré à: <https://doi.org/10.1172/JCI95148>.
- ⁴⁸ Moreno-Blas Daniel, Elisa Gorostieta-Salas, Alexander Pommer-Alba, Gabriel Muciño Hernández, Cristian Gerónimo-Olvera, Luis Angel Maciel-Barón, Mina Konigsberg, Lourdes Massieu, Susana Castro-Obregón. (2019): Cortical neurons develop a senescence-like phenotype promoted by dysfunctional autophagy. *Aging*. Vol 11(6).
- ⁴⁹ Song Ping, Junqing An and Ming-Hui Zou (2020): Immune Clearance of Senescent Cells to Combat Ageing and Chronic Diseases. *Cells*. 9, 671; doi:10.3390/cells9030671.
- ⁵⁰ Prata L; Ovsyannikova I.G.; Tchkonina T.; Kirkland J.L. (2018): Senescent cell clearance by the immune system: Emerging therapeutic opportunities. *Semin. Immunol*. 40, 101275.
- ⁵¹ Ovadya Y, Krizhanovsky V (2018): Strategies targeting cellular senescence. *J. Clin. Investig*. 128, 1247–1254.
- ⁵² Martínez-Cué Carmen and Noemí Rueda (2020): Cellular Senescence in Neurodegenerative Diseases. *Front. Cell. Neurosci*. Repéré à <https://doi.org/10.3389/fncel.2020.00016>

-
- ⁵³ Vinatier Claire, Eduardo Domínguez, Jerome Guicheux and Beatriz Caramés (2018): Role of the Inflammation-Autophagy-Senescence Integrative Network in Osteoarthritis. *Front. Physiol.*, Repéré à <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00706>.
- ⁵⁴ Matjusaitis M, Chin G, Sarnoski EA, Stolzing A. (2016): Biomarkers to identify and isolate senescent cells. *Ageing Res Rev.* 29:1–12. Repéré à <https://doi.org/10.1016/j.arr.2016.05.003> PMID:27212009
- ⁵⁵ Alexander Eva, Dominic G. Hildebrand, Anna Kriebs, Kerstin Obermayer, Marianne Manz, Oliver Rothfuss, Klaus Schulze-Osthoff, Frank Essmann (2013): IκBζ is a regulator of the senescence-associated secretory phenotype in DNA damage- and oncogene-induced senescence. *Journal of Cell Science.* 126: 3738-3745. doi: 10.1242/jcs.128835
- ⁵⁶ Hayflick, L.; Moorhead, P.S. (1961): The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.* 25,585–621.
- ⁵⁷ Di Fagagna Fabrizio d'Adda, Philip M Reaper, Lorena Clay-Farrace, Heike Fiegler, Philippa Carr, Thomas Von Zglinicki, Gabriele Saretzki, Nigel P Carter, Stephen P Jackson (2003): A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature.* 13; 426(6963):194-8. doi: 10.1038/nature02118.
- ⁵⁸ Whittmore Kurt, Aksinya Derevyanko, Paula Martinez, Rosa Serrano, Martí Pumarola, Fàtima Bosch, Maria A. Blasco (2019): Telomerase gene therapy ameliorates the effects of neurodegeneration associated to short telomeres in mice. *Aging.* Vol. 11.
- ⁵⁹ Chinta Shankar J., Georgia Woods, Anand Rane, Marco Demaria, Judith Campisi, Julie K. Andersen, (2015): Cellular senescence and the aging brain. *Exp Gerontol.* 68: 3–7. doi: 10.1016/j.exger.2014.09.018.
- ⁶⁰ Sikora E, Arendt T, Bennett M and Narita M. (2011): Impact of cellular senescence signature on ageing research. *Ageing Res Rev.* 10:146-152.
- ⁶¹ Nacarelli Timothy, Pingyu Liu and Rugang Zhang (2017): Epigenetic Basis of Cellular Senescence and Its Implications in Aging. *Gene Expression and Regulation Program. Genes (Basel).*8(12): 343. doi: 10.3390/genes8120343.
- ⁶² Di Micco Raffaella, Marzia Fumagalli, Angelo Cicalese, Sara Piccinin, Patrizia Gasparini, Chiara Luise, Catherine Schurra, Massimiliano Garre', Paolo Giovanni Nuciforo, Aaron Bensimon, Roberta Maestro, Pier Giuseppe Pelicci, Fabrizio d'Adda di Fagagna (2006): Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication. *Nature.* 30;444(7119):638-42. doi: 10.1038/nature05327.
- ⁶³ Bartkova Jirina, Nousin Rezaei, Michalis Liontos, Panagiotis Karakaidos, Dimitris Kletsas, Natalia Issaeva, Leandros-Vassilios F. Vassiliou, Evangelos Kolettas, Katerina Niforou, Vassilis C. Zoumpourlis, Munenori Takaoka, Hiroshi Nakagawa, Frederic Tort, Kasper Fugger, Fredrik Johansson, Maxwell Sehested, Claus L. Andersen, Lars Dyrskjot, Torben Ørntoft, Jiri Lukas, Christos Kittas, Thomas Helleday, Thanos D. Halazonetis, Jiri Bartek & Vassilis G. Gorgoulis (2006): Oncogene-induced senescence is part of the tumorigenesis barrier imposed by DNA damage checkpoints. *Nature.* volume 444, pages 633–637.

-
- ⁶⁴ Calabrese V., Frédérick A.Mallete, Xavier Deschênes-Simard, Sheela Ramanathan, Julien Gagnon, Adrian Moores, Subburaj Ilangumaran, Gerardo Ferbeyre (2009): SOCS1 Links Cytokine Signaling to p53 and Senescence. *Molecular Cell*. Volume 36, Issue 5, Pages 754-767.
- ⁶⁵ Walker Keenan A. (2019): Inflammation and neurodegeneration: chronicity matters. *Aging*. Vol. 11, No. 1.
- ⁶⁶ Franceschi Claudio and Judith Campisi (2014): Chronic Inflammation (Inflammaging) and Its Potential Contribution to Age-Associated Diseases. *Journal of Gerontology A Biol Sci Med Sci*. 69(S1): S4–S9. doi:10.1093/gerona/glu057.
- ⁶⁷ Salminen Antero, Anu Kauppinen, Kai Kaarniranta (2012): Emerging role of NF- κ B signaling in the induction of senescence-associated secretory phenotype (SASP). *Cellular Signalling*. Volume 24 (4): 835-845.
- ⁶⁸ Fielder Edward, Thomas von Zglinicki and Diana Jurk (2017): The DNA Damage Response in Neurons: Die by Apoptosis or Survive in a Senescence-Like State? *Journal of Alzheimer's Disease* 60 S107–S131.
- ⁶⁹ Wissler Erin O. Gerdes, Yi Zhu, B. Melanie Weigand, Utkarsh Tripathi, Terence C. Burns, Tamar Tchkonja, James L. Kirkland (2020): Cellular senescence in aging and age-related diseases: Implications for neurodegenerative diseases. *Int Rev Neurobiol*. 155: 203–234. doi: 10.1016/bs.irn.2020.03.019.
- ⁷⁰ Jurk Diana, Chunfang Wang, Satomi Miwa, Mandy Maddick, Viktor Korolchuk, Avgi Tsolou, Efsthios S Gonos, Christopher Thrasivoulou, M Jill Saffrey, Kerry Cameron, and Thomas von Zglinicki (2012): Postmitotic neurons develop a p21-dependent senescence-like phenotype driven by a DNA damage response. *Aging Cell*. 11(6): 996–1004. doi: 10.1111/j.1474-9726.2012.00870.x
- ⁷¹ Priya Hari, Fraser R. Millar, Nuria Tarrats, Jodie Birch, Andrea Quintanilla, Curtis J. Rink, Irene Fernández-Duran, Morwenna Muir, Andrew J. Finch, Valerie G. Brunton, João F. Passos, Jennifer P. Morton, Luke Boulter, Juan Carlos Acosta (2019): The innate immune sensor Toll-like receptor 2 controls the senescence-associated secretory phenotype. *Sci Adv*. 5(6): eaaw0254. doi: 10.1126/sciadv.aaw0254. Repéré à <http://advances.sciencemag.org/>
- ⁷² Kaltschmidt B, Sparna T, Kaltschmidt C. (1999): Activation of NF- κ B by reactive oxygen intermediates in the nervous system. *Antioxid Redox Signal* 1(2):129–44. doi:10.1089/ars.1999.1.2-129.
- ⁷³ Li X, Long J, He T, Belshaw R, Scott J. (2015): Integrated genomic approaches identify major pathways and upstream regulators in late onset Alzheimer's disease. *Sci Rep* 5:12393. doi:10.1038/srep12393.
- ⁷⁴ Ophir Gal, Ninette Amariglio, Jasmine Jacob-Hirsch, Ran Elkon, Gideon Rechavi, Daniel M Michaelson (2005): Apolipoprotein E4 enhances brain inflammation by modulation of the NF-kappaB signaling cascade. *20(3):709-18*. doi: 10.1016/j.nbd.2005.05.002.
- ⁷⁵ Ophir Gal, Ninette Amariglio, Jasmine Jacob-Hirsch, Ran Elkon, Gideon Rechavi, Daniel M Michaelson (2005): Apolipoprotein E4 enhances brain inflammation by modulation of the NF-kappaB signaling cascade. *20(3):709-18*. doi: 10.1016/j.nbd.2005.05.002.

-
- ⁷⁶ Feng-Sheng Shih Vincent, Rachel Tsui, Andrew Caldwell, Alexander Hoffmann (2011): A single NFκB system for both canonical and non-canonical signaling. *Cell Res.* 21(1):86-102. doi: 10.1038/cr.2010.161.
- ⁷⁷ Natarajan K., Sanjaya Singh, Terrence R. Burke, JR.t, Dezider Grunbergert, and Bharat B. Aggarwal (1996): Caffeic acid phenethyl ester is a potent and specific inhibitor of activation of nuclear transcription factor NF-KB. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Immunology.* 93: 9090-9095.
- ⁷⁸ Ting Liu, Lingyun Zhang, Donghyun Joo, and Shao-Cong Sun (2017): NF-κB signaling in inflammation. *Signal Transduction and Targeted Therapy.* 2:7023. doi:10.1038/sigtrans.2017.23.
- ⁷⁹ DiDonato J.A., Hayakawa M., Rothwarf D.M., Zandi E., and Karin M (1997): A cytokine-responsive IκappaB kinase that activates the transcription factor NF-kappaB. *Nature.* 388: 548–554. doi:10.1038/41493.
- ⁸⁰ Finco, T.S., and Baldwin, A.S. (1995): Mechanistic aspects of NF-κB regulation :the emerging role of phosphorylation and proteolysis. *Immunity.* (3): 263–272. doi:10.1016/1074-7613(95)90112-4.
- ⁸¹ Shih Ruey-Horng, Chen-Yu Wang and Chuen-Mao Yang (2015): NF-kappaB signaling pathways in neurological inflammation: A mini review. *Front. Mol. Neurosci.* 8:77. doi:10.3389/fnmol.2015.00077.
- ⁸² Smale, S. T. (2011): Hierarchies of NF-κB target-gene regulation. *Nat. Immunol.* 12, 689-694.
- ⁸³ Lamkanfi M., V. M. Dixit, (2014): Mechanisms and functions of inflammasomes. *Cell.* 157, 1013–1022.
- ⁸⁴ Acosta Juan Carlos, Ana Banito, Torsten Wuestefeld, Athena Georgilis, Peggy Janich, Jennifer P. Morton, Dimitris Athineos, Tae-Won Kang, Felix Lasitschka, Mindaugas Andriulis, Gloria Pascual, Kelly J. Morris, Sadaf Khan, Hong Jin, Gopuraja Dharmalingam, Ambrosius P. Snijders, Thomas Carroll, David Capper, Catrin Pritchard, Gareth J. Inman, Thomas Longerich, Owen J. Sansom, Salvador Aznar Benitah, Lars Zender & Jesús Gil (2013): A complex secretory program orchestrated by the inflammasome controls paracrine senescence. *Nature Cell Biology.* volume 15, pages978–990.
- ⁸⁵ Hsieh Jenny and Fred HGage (2005): Chromatin remodeling in neural development and plasticity. *Current Opinion in Cell Biology,* 17:664–671. Repéré à: <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2005.09.002>
- ⁸⁶ Amit Berson, Raffaella Nativio, Shelley L Berger, and Nancy M Bonini (2018): Epigenetic Regulation in Neurodegenerative Diseases. *Trends Neurosci.* 41(9): 587–598. doi: 10.1016/j.tins.2018.05.005.
- ⁸⁷ The Human Protein Atlas Repéré à <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000168283-BMI1/tissue>.
- ⁸⁸ Chen Haiyun, Hongjie Chen, Jialong Liang, Xin Gu, Jiawen Zhou, Chunfeng Xie, Xianhui Lv, Rong Wang, Qing Li, Zhiyuan Mao, Haijian Sun, Guoping Zuo, Dengshun Miao, and Jianliang Jin (2020): TGF-β1/IL-11/MEK/ERK signaling mediates senescence-associated pulmonary fibrosis in a stress-induced premature senescence model of Bmi-1 deficiency. *Experimental & Molecular Medicine* 52:130–151 Repéré à <https://doi.org/10.1038/s12276-019-0371-7>.
- ⁸⁹ Jagani Zainab, Dmitri Wiederschain, Alice Loo, Dan He, Rebecca Mosher, Paul Fordjour, John Monahan, Michael Morrissey, Yung-Mae Yao, Christoph Lengauer, Markus Warmuth, William R.

Sellers, and Marion Dorsch (2010): The Polycomb Group Protein Bmi-1 Is Essential for the Growth of Multiple Myeloma Cells. *Cancer res.* 70(13); 5528–38. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-09-4229

⁹⁰ Takahiro Ito, Yee Voan Teo, Shane A. Evans, Nicola Neretti, John M. Sedivy (2018): Regulation of Cellular Senescence by Polycomb Chromatin Modifiers through Distinct DNA Damage-and Histone Methylation-Dependent Pathways. *Cell Reports* 22, 3480–3492.

⁹¹ Chittock Emily C., Sebastian Latwiel, Thomas C.R. Miller and Christoph W. Müller (2017): Molecular architecture of polycomb repressive complexes. *Biochemical Society Transactions.* 45: 193–205. DOI: 10.1042/BST20160173.

⁹² Abdouh Mohamed, Roy Hanna, Jida El Hajjar, Anthony Flamier and Gilbert Bernier (2016): The Polycomb Repressive Complex 1 Protein BMI1 Is Required for Constitutive Heterochromatin Formation and Silencing in Mammalian Somatic Cells. *J Biol Chem.* 291(1): 182–197 Repéré à <https://www.jbc.org/content/291/1/182.full>.

⁹³ Jeusset Lucile M-P and Kirk J McManus (2019): Developing Targeted Therapies That Exploit Aberrant Histone Ubiquitination in Cancer. *Cells.* 8(2): 165. doi: 10.3390/cells8020165.

⁹⁴ Nacerddine K., J. B. Beaudry, V. Ginjala, B. Westerman, F. Mattioli, J. Y. Song, H. van der Poel, O. B. Ponz, C. Pritchard, P. Cornelissen-Steijger, et al. (2012): Akt-mediated phosphorylation of Bmi1 modulates its oncogenic potential, E3 ligase activity, and DNA damage repair activity in mouse prostate cancer. *J. Clin. Invest.* 122: 1920–1932.

⁹⁵ Wang, H., Wang, L., Erdjument-Bromage, H., Vidal, M., Tempst, P., Jones, R.S., and Zhang, Y. (2004): Role of histone H2A ubiquitination in Polycomb silencing. *Nature* 431: 873–878.

⁹⁶ Schuettengruber B., Bourbon, H.M., Di Croce, L., and Cavalli, G. (2017): Genome regulation by polycomb and Trithorax: 70 years and counting. *Cell.* 171: 34–57.

⁹⁷ Chuk Ivan SM, Mondal S, Dirks PB, Rutka JT. (2001): The INK4A/ARF locus: role in cell cycle control and apoptosis and implications for glioma growth. *J Neuro oncol.* 51(3): 219-29

⁹⁸ Bennett M R, K Macdonald, S W Chan, J J Boyle, P L Weissberg (1998): Cooperative interactions between RB and p53 regulate cell proliferation, cell senescence, and apoptosis in human vascular smooth muscle cells from atherosclerotic plaques. *Circ Res.* 6;82(6):704-12. doi: 10.1161/01.res.82.6.704.

⁹⁹ Zencak Dusan, Merel Lingbeek, Corinne Kostic, Meriem Tekaya, Ellen Tanger, Dana Hornfeld, Muriel Jaquet, Francis L. Munier, Daniel F. Schorderet, Maarten van Lohuizen, and Yvan Arsenijevic (2005): Bmi1 Loss Produces an Increase in Astroglial Cells and a Decrease in Neural Stem Cell Population and Proliferation. *The Journal of Neuroscience,* 25(24):5774 –5783.

¹⁰⁰ Balakrishnan Ilango, Etienne Danis, Angela Pierce, Krishna Madhavan, Dong Wang, Nathan Dahl, Bridget Sanford, Diane K. Birks, Nate Davidson et al. (2020): Senescence Induced by BMI1 Inhibition Is a Therapeutic Vulnerability in H3K27M-Mutant DIPG. *Cell Reports* 33 108286, Repéré à <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108286>

-
- ¹⁰¹ Cordisco Sonia, Riccardo Maurelli, Sergio Bondanza1, Miria Stefanini, Giovanna Zambruno, Liliana Guerra1 and Elena Dellambra (2010): Bmi-1 Reduction Plays a Key Role in Physiological and Premature Aging of Primary Human Keratinocytes. *Journal of Investigative Dermatology*. 130, 1048–1062. doi:10.1038/jid.2009.355.
- ¹⁰² Liu J. M.D., Hong-yan Gao, and Xiao-feng Wang (2015): The role of the Rho/ROCK signaling pathway in inhibiting axonal regeneration in the central nervous system. *Neural Regen Res*. 10(11): 1892–1896.
- ¹⁰³ Frisca Frisca, Duncan E. Crombie, Mirella Dottori, Yona Goldshmit, and Alice Pébay (2013): Rho /ROCK pathway is essential to the expansion, differentiation, and morphological rearrangements of human neural stem/progenitor cells induced by lysophosphatidic acid. *Journal of Lipid Research*. 2013 May; 54(5): 1192–1206. Repéré à <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3622317>.
- ¹⁰⁴ Bonaguidi MA, Chian-Yu Peng, Tammy McGuire, Gustave Falciglia, Kevin T. Gobeske, Catherine Czeisler, and John A. Kessler, (2008): Noggin Expands Neural Stem Cells in the Adult Hippocampus. *The Journal of Neuroscience*, 28(37): 9194 –9204. Repéré à DOI: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3314-07.2008>
- ¹⁰⁵ Marcelino J, Sciortino CM, Romero MF, Ulatowski LM, Ballock RT, Economides AN, Eimon PM, Harland RM, Warman ML (2001): Human disease-causing NOG missense mutations: effects on noggin secretion, dimer formation, and bone morphogenetic protein binding. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 98 (20): 11353–8. doi:10.1073/pnas.201367598. PMC 58733. PMID 11562478.
- ¹⁰⁶ Lim DA, Tramontin AD, Trevejo JM, Herrera DG, García-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (2000): Noggin antagonizes BMP signaling to create a niche for adult neurogenesis. *Neuron*.; 28:713–726.
- ¹⁰⁷ Bonaguidi MA, McGuire T, Hu M, Kan L, Samanta J, Kessler JA. (2005): LIF and BMP signaling generate separate and discrete types of GFAP-expressing cells. *Development*. 132:5503–5514.
- ¹⁰⁸ Edri R, Yakey Yaffe, Michael J. Ziller, Naresh Mutukula, Rotem Volkman, Eyal David, Jasmine Jacob-Hirsch, Hagar Malcov, Carmit Levy, Gideon Rechavi, Irit Gat-Viks, Alexander, Yechiel Elkabetz (2015): Analysing human neural stem cell ontogeny by consecutive isolation of Notch active neural progenitors. *Nat Commun*. .23;6:6500. doi: 10.1038/ncomms7500
- ¹⁰⁹ Slanzi Anna, Giulia Iannoto, Barbara Rossi, Elena Zenaro, and Gabriela Constantin (2020): *In vitro* Models of Neurodegenerative Diseases. *Front Cell Dev Biol*. 8: 328. doi: 10.3389/fcell.2020.00328.
- ¹¹⁰ Wang L-C, K-H Chu, Y-C Liang, Y-L Lin, and B-L Chiang (2010): Caffeic acid phenethyl ester inhibits nuclear factor- κ B and protein kinase B signalling pathways and induces caspase-3 expression in primary human CD4+ T cells. *Clinical experimental immunology*. 160(2): 223–232. doi: 10.1111/j.1365-2249.2009.04067.x
- ¹¹¹ Wang Xiaofeng, Chang Wang, Xiaowei Zhang, Ruixi Hua, Lu Gan, Mingzhu Huang, Liqin Zhao, Sujie Ni and Weijian Guo (2016): Bmi-1 regulates stem cell-like properties of gastric cancer cells via modulating miRNAs. *Journal of Hematology & Oncology*. 9:90. DOI 10.1186/s13045-016-0323-9.

-
- ¹¹² De-Qianga Ma, Zhang, Yin-Huaa, Ding De-Pinga | Li, Juanb Chen, Lin-Lia Tian, You-Youa Ao, Kang-Jiana (2018): Effect of Bmi-1-mediated NF-κB signaling pathway on the stem-like properties of CD133+ human liver cancer cells. *cancer biomarkers*. 22(3):575-585. doi: 10.3233/CBM-181329.
- ¹¹³ Barton GM, Kagan JC (2009): A cell biological view of Toll-like receptor function: regulation through compartmentalization. *Nat. Rev. Immunol.* 9(8): 535–42.
- ¹¹⁴ Bazán E., F.J.M. Alonso, C. Redondo, M.A. López-Toledano, J.M. Alfaro, D. Reimers, A.S. Herranz, C.L. Paíno, A.B. Serrano, N. Cobacho, E. Caso and M-V.T. Lobo (2004): In vitro and in vivo characterization of neural stem cells. *Histology and Histopathology*. 19: 1261-1275.
- ¹¹⁵ Lesuisse Christian, Lee J Martin (2002): Long-term culture of mouse cortical neurons as a model for neuronal development, aging, and death. *Journal of neurobiology*. 51(1):9-23. doi: 10.1002/neu.10037.
- ¹¹⁶ Yi-Qun Geng, Ji-Tian Guan, Xiao-HuXu, Yu-CaiFu (2010): Senescence-associated beta-galactosidase activity expression in aging hippocampal neurons. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Volume 396, Issue 4, Pages 866-869.
- ¹¹⁷ Bowman T, Garcia R, Turkson J & Jove R (2000): STATs in oncogenesis. *Oncogene* 19 2474–2488. doi: 10.1038/sj.onc.1203527.
- ¹¹⁸ Kojima Hirotada, Hiroyuki Kunimoto, Toshiaki Inoue & Koichi Nakajima (2012): The STAT3-IGFBP5 axis is critical for IL-6/gp130-induced premature senescence in human fibroblasts. *Cell cycle*. 11:4, 730-739, DOI: 10.4161/cc.11.4.19172. Repéré à <https://doi.org/10.4161/cc.11.4.19172>.
- ¹¹⁹Waters David W., Kaj E. C. Blokland, Prabuddha S. Pathinayake, Lan Wei 1, Michael Schuliga, Jade Jaffar, Glen P. Westall, Philip M. Hansbro, Cecilia M. Prele, Steven E. Mutsaers, Nathan W. Bartlett, et al. (2019): STAT3 Regulates the Onset of Oxidant-induced Senescence in Lung Fibroblasts. Repéré à <https://doi.org/10.1165/rcmb.2018-0328OC>
- ¹²⁰ Lee H., A. Herrmann, J. H. Deng, M. Kujawski, G. Niu, Z. Li, S. Forman, R. Jove, D. M. Pardoll, and H. Yu. (2009): Persistently activated Stat3 maintains constitutive NF-kappaB activity in tumors. *Cancer Cell*. 15: 283–293.
- ¹²¹ Deng Q., R. Liao, B.L. Wu, P. (2004): High intensity ras signaling induces premature senescence by activating p38 pathway in primary human fibroblasts. *Sun, J. Biol. Chem.* 279:1050–1059.
- ¹²² Vermeulen L., W. Vanden Berghe, I.M.E. Beck, K. De Bosscher, G. Haegeman, (2003): Transcriptional activation of the NF-κB p65 subunit by mitogen- and stress-activated protein kinase-1 (MSK1) *Trends Biochem. Sci.* 22(17,17): 1313-1324 doi:10.1093/emboj/cdg139
- ¹²³ Alkema Mark J., Nathalie M. T. van der Lugt, René C. Bobeldijk, Anton Berns & Maarten van Lohuizen (1995): Transformation of axial skeleton due to overexpression of bmi-1 in transgenic mice. *Nature*. Volume 374, pages724–727.
- ¹²⁴ Lessard J.& Guy Sauvageau (2003): Bmi-1 determines the proliferative capacity of normal and leukaemic stem cells. *Nature*. volume 423, pages255–260.

¹²⁵ Molofsky A.V, Ricardo Pardal, Toshihide Iwashita, In-Kyung Park, Michael F. Clarke & Sean J. Morrison (2003): Bmi-1 dependence distinguishes neural stem cell self-renewal from progenitor proliferation. *Nature*. volume 425, pages962–967.

¹²⁶ Park In-kyung, Dalong Qian, Mark Kiel, Michael W Becker, Michael Pihalja, Irving L Weissman, Sean J Morrison, Michael F Clarke (2003): Bmi-1 is required for maintenance of adult self-renewing haematopoietic stem cells. *Nature*. 15;423(6937):302-5. doi: 10.1038/nature01587.

¹²⁷ Park In-Kyung, Sean J. Morrison and Michael F. Clarke (2004): Bmi1, stem cells, and senescence regulation. *J Clin Invest*. 113(2):175-179. Repéré à : <https://doi.org/10.1172/JCI20800>.

¹²⁸ Yin Tao, Zhengle Zhang, Bin Cao, Qingke Duan, Pengfei Shi, Hengqiang Zhao, Soriba Naby Camara, Qiang Shen, Chunyou Wang (2016): Bmi1 inhibition enhances the sensitivity of pancreatic cancer cells to gemcitabine. *Oncotarget*, Vol. 7, No. 24. Repéré à : <http://www.impactjournals.com>

¹²⁹ Ke Bingxin, Kejun Ye and Shaobing Cheng (2020): ALKBH2 inhibition alleviates malignancy in colorectal cancer by regulating BMI1 mediated activation of NF-κB pathway. *World Journal of Surgical Oncology*. 18:328.

¹³⁰ Biehs Brian, Jimmy Kuang-Hsien Hu, Nicolas B. Strauli, Eugenio Sangiorgi, Heekyung Jung, Ralf-Peter Heber, Sunita Ho, Alice F. Goodwin, Jeremy S. Dasen, Mario R. Capecchi & Ophir D. Klein (2013): BMI1 represses Ink4a/Arf and Hox genes to regulate stem cells in the rodent incisor. *Nature Cell Biology*. volume 15, 846–852.

¹³¹ Voncken Jan Willem, Hanneke Niessen, Bernd Neufeld, Ulrike Rennefahrt, Vivian Dahlmans, Nard Kubben, Barbara Holzer, Stephan Ludwig, and Ulf R. (2005): MAPKAP Kinase 3pK Phosphorylates and Regulates Chromatin Association of the Polycomb Group Protein Bmi1. *The journal of biological chemistry*. 280 (7): 5178–5187.

¹³² Okuyama Yuko, Yuki Tanaka, Jing-Jing Jiang, Daisuke Kamimura, Akihiro Nakamura, Mitsutoshi Ota, Takuto Ohki, Daisuke Higo, Hideki Ogura, Naoto Ishii, Toru Atsumi, and Masaaki Murakami (2018): Bmi1 Regulates IκBα Degradation via Association with the SCF Complex; 201(8):2264-2272. doi:10.4049/jimmunol.1701223.

¹³³ Heinrich PC, Behrmann I, Muller-Newen G, Schaper F & Graeve L (1998): Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *Biochemical Journal* 334 (Pt 2) 297–314.

¹³⁴ Liu Jie, Liu Cao, Jichun Chen, Shiwei Song, In Hye Lee, Celia Quijano, Hongjun Liu, Keyvan Keyvanfar, Haoqian Chen, Long-Yue Cao, Bong-Hyun Ahn, Neil G. Kumar, Ilsa I. Rovira, Xiao-Ling Xu, Maarten van Lohuizen, Noboru Motoyama, Chu-Xia Deng & Toren Finkel, (2009): Bmi1 regulates mitochondrial function and the DNA damage response pathway. *Nature* volume 459, pages387–392.

¹³⁵ Ginjala V., Karim Nacerddine, Atul Kulkarni, Jay Oza, Sarah J. Hill, Ming Yao, Elisabetta Citterio, Maarten van Lohuizen, and Shridar Ganesan (2011): BMI1 Is Recruited to DNA Breaks and Contributes to DNA Damage-Induced H2A Ubiquitination and Repair. *Mol Cell Biol*. 31(10): 1972–1982. doi: 10.1128/MCB.00981-10

¹³⁶ Kaur S., Thierry Oddos, Samantha Tucker-Samaras and Michael D. Southall (2013): Regulation of DNA Repair Process by the Pro-Inflammatory NF-κB Pathway. *New Research Directions in DNA*

Repair, Clark Chen, IntechOpen, DOI: 10.5772/54341. Repéré à : <https://www.intechopen.com/books/new-research-directions-in-dna-repair/regulation-of-dna-repair-process-by-the-pro-inflammatory-nf-b-pathway>

¹³⁷ Wei Wang, Arul M. Mani and Zhao-Hui Wu (2017): DNA damage-induced nuclear factor-kappa B activation and its roles in cancer progression. *J Cancer Metastasis Treat*; 3: 45–59. doi:10.20517/2394-4722.2017.03.

¹³⁸ Wang, J., et al., (2009): RelA/p65 functions to maintain cellular senescence by regulating genomic stability and DNA repair. *EMBO Rep*, 2009. 10(11): p. 1272-8.

¹³⁹ Stark LA, Dunlop MG. (2005): Nucleolar sequestration of RelA (p65) regulates NF-kappaB-driven transcription and apoptosis. *Mol Cell Biol*; 25: 5985–6004.

¹⁴⁰ Thoms HC, Dunlop MG, Stark LA. (2007): CDK4 inhibitors and apoptosis: a novel mechanism requiring nucleolar targeting of RelA. *Cell Cycle*; 6: 1293–1297.

¹⁴¹ N Khandelwal, J Simpson, G Taylor, S Rafique, A Whitehouse, J Hiscox & L A Stark (2011): Nucleolar NF-κB/RelA mediates apoptosis by causing cytoplasmic relocalization of nucleophosmin. *Cell Death & Differentiation*. 18, pages1889–1903.

¹⁴² Jian-Ping Zhang, Xiao-Lan Li, Amanda Neises, Wanqiu Chen, Lin-Ping Hu, Guang-Zhen Ji, Jun-Yao Yu, Jing Xu, Wei-Ping Yuan, Tao Cheng & Xiao-Bing Zhang (2016): Different Effects of sgRNA Length on CRISPR-mediated Gene Knockout Efficiency. *Scientific Reports*. 6:28566. DOI: 10.1038/srep28566.

¹⁴³ Haapaniemi Emma, Sandeep Botla, Jenna Persson, Bernhard Schmierer and Jussi Taipale (2018): CRISPR–Cas9 genome editing induces a p53-mediated DNA damage response. *Nature Medicine*. VOL 24. 927–930. Repéré à www.nature.com/naturemedicine.

¹⁴⁴ Nutt D. (2017) : MRI scans reveal brain shrinkage in Alzheimer's disease patients (Fig 2) dans *Brain imaging for psychiatrists, Part 2: Structural (static) measures*. Lundbeck institute campus. Repéré à <https://institute.progress.im/en/content/brain-imaging-psychiatrists-part-2-structural-static-measures>.