

Mécanismes moléculaires de résistance au stress oxydatif et longévité chez la drosophile

List O., Tanaka M., Umeda Y., Togawa T., Matsuo T., Aigaki T.
Department of Biological Sciences
Tokyo Metropolitan University, 1-1 Minami-osawa, Hachioji-shi
192-0397 Tokyo JAPAN
Tel. : 0426-77-2575 - Fax. : 0426-77-2559
E-mail : list@comp.metro-u.ac.jp

Résumé :

Drosophila melanogaster est un excellent modèle pour l'étude des processus biologiques ayant une implication dans la détermination du vieillissement et de la longévité. Il a été montré que certaines mouches transgéniques surexprimant des gènes codant pour des enzymes antioxydantes, telles la superoxyde dismutase (SOD) ainsi qu'une catalase présentent une augmentation de la durée de vie. Il a aussi été démontré que des mutations affectant la voie insulín/insulín-like growth factor affectent la durée de vie et la sensibilité des individus à différents stress. Un screening a été effectué pour identifier des gènes qui lors de leur surexpression chez l'adulte augmentent leur durée de vie. 13 gènes ont été identifiés, dont 6 semblent être impliqués dans les processus de résistance au stress. Ces résultats nous ont conduit à chercher des gènes conférant une résistance au stress oxydatif lorsqu'ils sont surexprimés. Le laboratoire a récemment développé une méthode pour une mesure efficace de cette résistance chez la drosophile. Le système a permis de « screener » environ 3000 gènes, et d'identifier les gènes candidats qui pourraient être impliqués dans la résistance au stress oxydatif et dans la longévité. Dans ce projet, nous allons confirmer les phénotypes observés lors de la surexpression de ces gènes candidats et caractériser leurs fonctions en détail, et plus spécifiquement celle du gène *grappa* qui a été identifié durant les études préliminaires.

Abstract :

The fruit fly, *Drosophila melanogaster*, is an excellent model system for the study of complex biological processes including the mechanisms of aging and longevity determination. Transgenic flies overexpressing the genes encoding antioxidant enzymes, such as superoxide dismutase (SOD) and catalase harbour an increase of lifespan. It has been also demonstrated that mutations in genes involved in the insulin/insulin-like growth factor (IGF) pathway (*i.e.* IGF receptor) affected life span and sensitivity to various stresses. We have conducted a conditional gene misexpression screen to identify genes, whose overexpression in adult stages extends life span. We identified 13 genes, and 6 of them are suggested to be related to stress resistance or redox balance. These results suggested us to look for genes that confer oxidative resistance when overexpressed. We recently established a method for the efficient measurement of oxidative stress resistance in *Drosophila*, using a commercially available activity monitor. Using the system, we screened about 3,000 genes, and identified candidate genes that might be involved in the oxidative stress resistance and longevity. In this study we will confirm the phenotype of these candidate genes, and characterize the genes' function in detail and more precisely the *grappa* gene that have been identified during the first studies.

Introduction :

Le stress oxydatif a été admis comme une cause majeure du vieillissement (Boulianne 2001; Finkel and Holbrook 2000). La compréhension des mécanismes moléculaires de résistance au stress oxydatif est cruciale dans le développement de stratégies de lutte contre les maladies apparaissant avec l'âge comme la maladie d'Alzheimer.

Drosophila melanogaster est un excellent modèle pour l'étude des processus biologiques ayant une

implication dans la détermination du vieillissement et de la longévité ainsi que pour l'étude du stress oxydatif. En effet, le cycle de vie de la Drosophile étant très court, il est facile de mesurer sa durée et ce sur de multiples générations successives. De plus, il existe différentes techniques moléculaires permettant de manipuler le génome, ce qui permet l'étude des processus moléculaires conduisant à tels ou tels phénotypes. Il existe aussi beaucoup de lignées mutantes de drosophile, cela permet de connaître l'effet d'un gène lorsque celui-ci n'est pas exprimé.

Différentes mutations, caractérisées chez différents organismes modèles, prouvent qu'il existe un lien entre la résistance au stress oxydatif et la longévité. Par exemple, le mutant de drosophile chico, dont le gène en cause est impliqué dans la voie insulín/IGF présente une augmentation de la durée de vie, ainsi qu'une résistance au stress oxydatif (Clancy *et al.*, 2001), ce phénotype se retrouve aussi chez *Caenorhabditis elegans* (Tatar *et al.*, 2003). Sun and Tower (1999) ont montré que, chez la drosophile, la surexpression de gènes codant pour des enzymes antioxydantes (Cu/ZnSOD) augmente la durée de vie.

L'identification de mutations jouant un rôle dans la résistance au stress oxydatif pourrait faciliter la compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans les défenses contre le stress oxydatif et donc contre le vieillissement. L'équipe du professeur Aigaki a donc développé un système permettant de mesurer la résistance au stress oxydatif de mutants surexprimant ou non un gène candidat (Kaneuchi *et al.*, 2003), ceci grâce à un système moléculaire d'expression conditionnel du gène, le « gene search system » (Toba *et al.*, 1999). Ce système a permis de tester plus de 3000 gènes et d'en identifier certains qui pourraient être impliqués dans le processus de résistance au stress oxydatif. Le but de ce projet est de confirmer ces premières observations et comprendre le fonctionnement de ces gènes.

Le « Gene Search System »

Le « gene search system » est un système génétique permettant de surexprimer un gène sous certaines conditions.

Pour cela, deux lignées de drosophiles sont croisées, la première portant un insert GS (Gene Search) devant le gène d'intérêt, la seconde portant un insert constitué d'un promoteur *hsp70* qui active la transcription d'un facteur de transcription (Gal4) à 30°C. L'insert GS est constitué d'un marqueur, et d'un promoteur UAS qui sera activé par Gal4 dans la descendance du croisement précédent quand celle-ci sera placée à 30°C. Cela activera la transcription du gène suivant le promoteur UAS (figure 1).

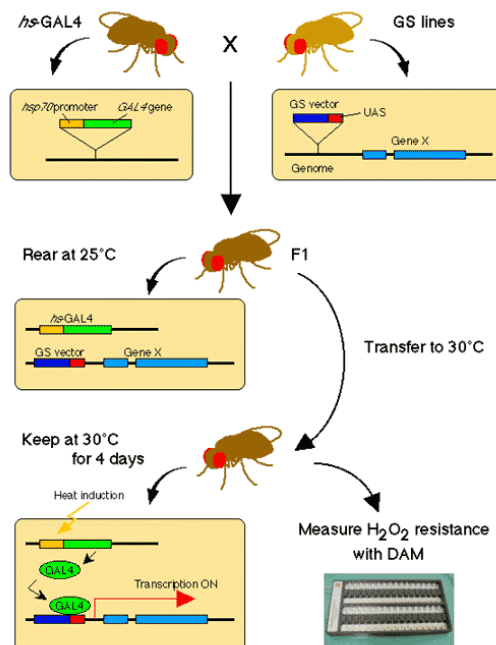


Fig 1.: représentation du « Gene Search System »

Ce système permet de contrôler l'expression d'un gène, et de l'activer uniquement chez l'adulte. Cette particularité permet de ne pas activer le gène si l'expression de celui-ci pendant la phase larvaire est létale.

Chaque lignée GS porte un seul insert qui peut être placé n'importe où dans le génome, ceci permet en croisant différentes lignées GS avec une seule lignée Gal4, de tester autant de gènes que de lignées GS, et donc, de tester beaucoup de gènes en peu de temps.

Les tests de résistance au stress oxydatif

Un premier screening en conditions normales (sans stress) a été effectué (Aigaki *et al.*, 2003) pour des gènes augmentant la longévité. Sur 645 lignées GS testées, 25 présentaient une augmentation de la durée de vie. Parmi ces 25, 13 gènes avaient une fonction connue, dont 6 étaient en relation avec les processus de résistance au stress oxydatif.

Un second screening a donc consisté à chercher des gènes dont la surexpression modifiait la résistance au stress oxydatif.

Pour cela, les adultes F1 sont placés à 30°C pendant deux jours, pour activer la transcription, puis placés individuellement dans des tubes dont le milieu de culture est additionné de H₂O₂. La durée de vie des mouches est mesurée à l'aide d'un moniteur d'activité (DAM : Drosophila activity monitor).

2771 lignées GS ont été testées. Parmi elles, 20 lignées présentent une augmentation de 10 à 30% de la durée de vie par rapport aux lignées contrôles.

La position des inserts ainsi que les gènes exprimés par ces 20 lignées ont été identifiées par RT-PCR (Reverse Transcription- Polymerase Chain Reaction). Plusieurs sont en cours d'étude dans le laboratoire. La suite de ce projet est de confirmer précisément le phénotype de ces lignées, ainsi que de comprendre le fonctionnement des gènes identifiés et leur implication dans les processus de résistance au stress oxydatif.

Le gène *grappa*

Parmi les 20 lignées identifiées durant le screening, les descendants du croisement hs-Gal4 x GS9956 présentent une augmentation de 11,3% à 13% de longévité. Une analyse moléculaire a montré que l'insert GS de cette lignée était placé devant le gène CG10272. Ce gène, a été identifié par Shanower (2004) comme un gène codant pour une histone H3 K79 méthyltransférase : un homologue du gène DOT1 de la levure. Ce gène, appelé *grappa*, code pour une protéine qui modifie la configuration de la chromatine et joue un rôle dans le « gene silencing » (Shanower *et al.* 2004). C'est-à-dire que *grappa* empêche la transcription d'autres gènes en bloquant l'accès de ces gènes à la machinerie moléculaire.

Ce résultat est très intéressant pour la suite des études, car l'expression d'un autre gène (*dSir2*) dont la protéine joue le même rôle (silencing), augmente la durée de vie de la mouche lorsqu'il est surexprimé (Rogina and Helfand, 2004). De plus *dSir2* semble intervenir dans les processus de restriction calorique (Rogina and Helfand, 2004). L'augmentation de la durée de vie par restriction calorique est souvent associée à une baisse des dommages causés par les radicaux libres à l'ADN (Sinclair, 2005)

Les premiers résultats et le fait que *dSir2* est impliqué dans les processus de restriction calorique nous ont conduit à penser que *grappa* pourrait jouer un rôle dans la résistance au stress oxydatif, et donc dans l'augmentation de la durée de vie. Le projet consiste donc à tester la résistance au stress oxydatif de toutes les lignées de drosophiles portant un insert capable d'activer *grappa*, ainsi que des mutants « perte de fonction » qui n'expriment pas *grappa*.

Nous avons testé, entre autre, la lignée GS9042 qui comporte un insert GS en amont de *grappa* (figure 2A). Les premiers résultats montrent une augmentation significative de la longévité chez les drosophiles surexprimant *grappa* par l'intermédiaire de l'insert GS par rapport aux mouches témoins (figures 2B et 2C)

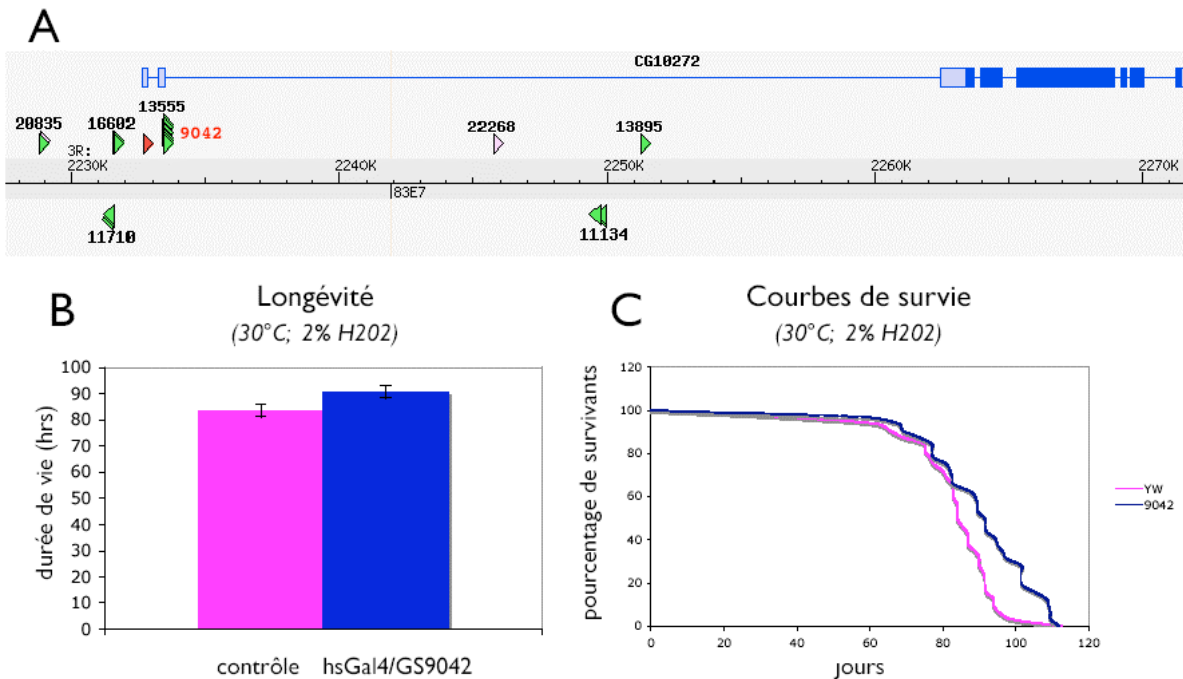


Fig 2. : Le gène *grappa*

A : Représentation schématique de *grappa* montrant la position des inserts GS (triangle)

B : Longévité des mouches contrôles et des mouches portant l'insert GS9042 activé par hsGal4.

C : Courbes de survie des mouches contrôles et des mouches hsGal4/GS9042

La suite des travaux sera de tester avec différentes concentrations de H₂O₂, toutes les lignées GS permettant de surexprimer *grappa*, mais aussi de tester des mutants de *grappa* qui n'expriment pas ce gène et mesurer leur longévité en condition de restriction calorique pour savoir si, comme *dSir2*, *grappa* est impliqué dans l'augmentation de durée de vie par restriction calorique.

D'autres travaux sont envisagés comme par exemple utiliser le « gene search system » pour exprimer *grappa* uniquement dans certains tissus. Cela ne se fera plus en croisant les lignées GS avec des lignées répondant au choc thermique (*hsp70*), mais en les croisant avec des lignées comportant un promoteur qui sera actif dans certains tissus (exemple : activer *grappa* uniquement dans le système nerveux).

Ces tests permettront de mieux comprendre l'implication et le fonctionnement de ce gène dans les processus de résistance au stress oxydatif, et comprendre comment *grappa* peut agir pour augmenter la durée de vie par l'intermédiaire du mécanisme moléculaire qu'est le "gene silencing". Et ainsi comprendre les relations qu'il existe entre le "gene silencing", la restriction calorique et le stress oxydatif.

References

- Aigaki T, Kaneuchi T, Matsuo T, Seong KH, Togawa T (2003) Genetic bases of oxidative stress resistance and life span in *Drosophila*. *J. Clin. Biochem. Nutr.*, 34 :77-83
- Boulianne GL (2001) Neuronal regulation of lifespan: clues from flies and worms. *Mech Ageing Dev* 122: 883–894
- Clancy DJ, Gems D, Harshman LG, Oldham S, Stocker H, Hafen E, Leivers SJ and Partridge L (2001) Extension of life-span by loss of CHICO, a *Drosophila* insulin receptor substrate protein. *Science* 292: 104–106
- Finkel T and Holbrook NJ (2000) Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 408: 239–247
- Kaneuchi T, Togawa T, Matsuo T, Fuyama Y, Aigaki T (2003) Efficient measurement of H₂O₂ resistance in *Drosophila* using an activity monitor. *Biogerontology*. 4(3):157-65.
- Sun J and Tower J (1999) FLP recombinase-mediated induction of Cu/Zn-superoxide dismutase transgene expression can extend the life span of adult *Drosophila melanogaster* flies. *Mol Cell Biol* 19: 216–228

- Rogina B and Helfand S (2004). Sir2 mediates longevity in the fly through a pathway related to calorie restriction. PNAS 101(45) :15998-16003
- Shanower G, Muller M, Blanton J, Honti V, Gyurkovics H, Schedl P (2004). Characterisation of the *grappa* gene, the drosophila Histone H3 Lysine 79 methyltransferase. Genetics, 169 :173-184
- David A. Sinclair (2005), Toward a unified theory of caloric restriction and longevity regulation, Mechanisms of Ageing and Development, 126 (9) : 987-1002.
- Tatar, M., Bartke, A. & Antebi, A. (2003) The endocrine regulation of aging by insulin-like signals. *Science* 299, 1346–1351
- Toba G, Ohsako T, Miyata N, Ohtsuka T, Seong KH, Aigaki T (1999) The gene search system. A method for efficient detection and rapid molecular identification of genes *in Drosophila melanogaster*. Genetics 151: 725–737

Remerciements

Ce travail est supporté par le ministère des affaires étrangères Français et bénéficie d'une bourse Lavoisier.