

Comment déterminer l'âge d'*E. coli* ?

Lydia Robert

Inserm U1001,
156, rue de Vaugirard,
75015 Paris, France.
robert.lydia@gmail.com

> Chez les organismes multicellulaires, le vieillissement est souvent apparent, facilement détectable et quantifiable. Au contraire, chez les unicellulaires, détecter et quantifier le vieillissement peut s'avérer complexe [1]. En particulier, définir l'âge d'un individu nécessite de pouvoir le distinguer de sa descendance et le suivre au cours du temps et des événements de reproduction successifs. Pour un organisme unicellulaire qui se reproduit par fission binaire, cette distinction n'est pas toujours triviale et la définition même d'une cellule mère et d'une cellule fille ne peut avoir de sens que si les « vieux » et « jeunes » composants de la cellule sont répartis de façon asymétrique lors de la division. Par conséquent, l'étude du vieillissement chez les unicellulaires a longtemps été limitée aux organismes caractérisés par une division visiblement asymétrique et une phase juvénile clairement identifiable, tels que la levure *Saccharomyces cerevisiae* [2], ou plus récemment la bactérie *Caulobacter crescentus* [3]. Cependant, en 2005, Stewart *et al.* ont montré que même la bactérie *Escherichia coli* présente des signes de vieillissement, alors que les deux cellules issues d'une division sont mor-

phologiquement identiques [4]. *E. coli* est une bactérie en forme de bâtonnet. Lorsqu'elle se divise, un septum se forme en son milieu, créant ainsi deux nouveaux pôles membranaires (Figure 1A). Chaque bactérie est donc asymétrique avec un « vieux » pôle (qui était déjà présent chez sa mère) et un « jeune » pôle (nouvellement créé par la division de sa mère). On peut ainsi définir l'âge d'une cellule bactérienne comme étant l'âge de son vieux pôle, c'est-à-dire le nombre de divisions effectuées depuis la création de ce pôle (Figure 1B). En observant des bactéries pendant quelques divisions successives, Stewart *et al.* ont mis en évidence une diminution du taux de croissance avec l'âge.

Découplage entre fertilité et mortalité chez *E. coli*

Dans l'étude de Stewart *et al.*, le système expérimental ne permettait pas d'observer les bactéries sur plus de 6 ou 7 générations. Sur cette courte échelle de temps, la diminution de taux de croissance détectée ne s'élevait qu'à quelques pourcents. Afin d'étudier les effets du vieillissement sur une échelle de temps plus importante, nous avons développé un dispositif microfluidique

permettant de conserver à chaque division la bactérie héritant du vieux pôle et de l'observer par microscopie pendant plusieurs centaines de générations [5]. Contrairement à ce que l'on aurait pu attendre au vu des résultats de Stewart *et al.*, aucune diminution significative du taux de croissance avec l'âge n'a alors été observée (Figure 2A). Cette stabilité semble à première vue incompatible avec un phénomène de vieillissement, qui implique une détérioration progressive de l'état physiologique de la cellule. Une des définitions les plus simples et les plus usuelles du vieillissement est l'augmentation du taux de mortalité avec l'âge. Nous avons donc étudié le taux de mortalité des bactéries et trouvé que celui-ci augmente avec l'âge de façon importante, montrant ainsi qu'*E. coli* est bien sujette au vieillissement (Figure 2B). Ainsi, l'état physiologique de la bactérie se détériore avec l'âge puisque sa probabilité de mourir augmente, mais cette détérioration n'entraîne aucune perte de la vitesse de croissance, c'est-à-dire aucune diminution de la capacité reproductrice. Ce résultat est d'autant plus surprenant que chez les organismes modèles étudiés jusqu'à présent, comme la mouche *Drosophila melanogaster* ou

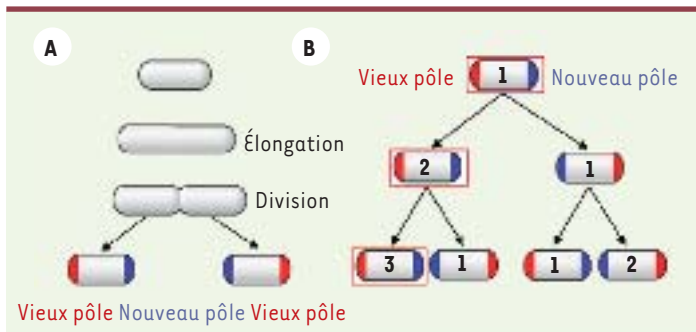


Figure 1. Cycle de vie de la bactérie *Escherichia coli*. **A.** Asymétrie résultant de la division : chaque cellule a un vieux pôle (en rouge) et un nouveau pôle (en bleu) à chaque génération (ex. : le nouveau pôle de la cellule mère devient vieux pôle rouge à la génération suivante). **B.** Suivi du vieillissement (exemple sur 2 générations). L'âge de chaque bactérie (indiqué à l'intérieur de la cellule) est défini comme l'âge de son vieux pôle, c'est-à-dire le nombre de divisions effectuées depuis la création de ce pôle. Pour suivre le vieillissement on suit à chaque division la cellule héritant du vieux pôle (encadrée en rouge).



Figure 2. Évolution de la capacité reproductrice et de la mortalité avec l'âge. **A.** Taux de croissance moyen en fonction de l'âge. **B.** Taux de mortalité en fonction de l'âge (probabilité pour une cellule d'un âge donné de mourir à la génération suivante).

la levure *S. cerevisiae*, le vieillissement s'accompagne d'une perte de fertilité [6, 7]. *E. coli* semble donc être le premier exemple d'organisme présentant un découplage entre mortalité et fertilité lors du vieillissement, la mortalité augmentant sans que la capacité reproductrice ne diminue.

Mécanismes potentiellement impliqués dans le vieillissement d'*E. coli*

L'origine du vieillissement chez *E. coli* n'a pas encore été élucidée et plusieurs mécanismes pourraient être impliqués, reposant par exemple sur des dommages à l'ADN, aux protéines ou à la paroi cellulaire. Si le taux de croissance reste stable, la bactérie subit néanmoins des changements morphologiques avec l'âge. En particulier, la fréquence de filamentation augmente de façon importante après 50 générations [5]. La filamentation est une élongation anormale de la cellule résultant d'une inhibition de la division. Cette inhibition peut être une réponse à différents stress, notamment des stress génotoxiques. La réponse SOS, qui est engendrée par certains dommages à l'ADN, semble être responsable de la filamentation observée chez les vieilles cellules bactériennes. En effet, un mutant *lexA3* incapable d'induire cette réponse ne présente pas d'augmentation de filamentation avec l'âge. Il est donc possible que les cellules âgées meurent des suites de dommages à l'ADN et que leur vieillissement soit dû soit à

l'accumulation à l'intérieur de la cellule d'un agent génotoxique, soit à la diminution de l'efficacité des systèmes de réparation de l'ADN.

Chez *E. coli*, les agrégats protéiques sont localisés préférentiellement au vieux pôle de la cellule [8]. Ainsi, en accord avec les effets connus de l'agrégation protéique sur la dégénérescence cellulaire, ces agrégats pourraient s'accumuler avec l'âge et causer une augmentation de la mortalité. Toutefois, il serait surprenant qu'une telle accumulation puisse engendrer la mort de la bactérie sans avoir d'effets préalables sur sa vitesse de croissance.

Le peptidoglycane de la paroi du vieux pôle n'est pas renouvelé. Il est donc possible qu'en l'absence d'insertion de nouvelles molécules de peptidoglycane, la paroi se détériore avec le temps. Cette détérioration pourrait être à l'origine du vieillissement chez *E. coli*.

E. coli : un nouvel organisme modèle pour l'étude du vieillissement ?

E. coli est un organisme simple, extrêmement bien caractérisé et facile à modifier génétiquement. Par conséquent, l'identification des mécanismes à l'origine du vieillissement paraît plus aisée chez cette bactérie que chez des organismes plus complexes tels que la drosophile ou la souris. L'utilité des découvertes sur *E. coli* pour le développement de stratégies anti-vieillessement chez l'homme reste évidemment à

prouver et il est probable qu'à cette fin, les modèles animaux soient mieux adaptés. Néanmoins, s'il est vrai qu'un être humain ne ressemble guère à une bactérie, les processus biochimiques fondamentaux restent assez universels et il se peut que des mécanismes tels que l'oxydation des macromolécules soient une source universelle de vieillissement [9]. Dans ce cas, l'étude du mécanisme chez *E. coli* pourrait s'avérer informative et plus simple que chez des modèles animaux. Si, au contraire, la biochimie du vieillissement s'avérait être très différente d'un organisme à l'autre, l'étude d'une grande variété d'organismes, de la bactérie à l'homme, pourrait permettre de découvrir les stratégies développées par certaines cellules pour résister aux dommages qui causent le vieillissement chez d'autres.

En plus d'être très bien caractérisée et facilement modifiable génétiquement, *E. coli* a un temps de génération très court, permettant des approches d'évolution expérimentale. L'utilisation d'*E. coli* comme organisme modèle permet ainsi une approche globale du processus étudié, de la découverte des mécanismes à la recherche des contraintes évolutives et pressions de sélection en jeu. Sur la question du vieillissement, *E. coli* a donné lieu à de nombreuses théories évolutives, une telle approche paraît particulièrement riche.

Au sein d'une population, tous les individus ne vieillissent pas au même rythme et ne meurent pas en même temps, et cela même s'ils sont génétiquement identiques. *E. coli* étant un modèle classique pour l'étude des manifestations stochastiques des processus biochimiques, en particulier de l'expression

génétique [10, 11], cette bactérie pourrait s'avérer être un modèle pertinent pour aborder l'origine de la variabilité inter-individuelle dans le processus de vieillissement. ♦

Aging in unicellular organisms

CONFLIT D'INTÉRÊTS

L'auteur déclare n'avoir aucun conflit d'intérêts concernant les données publiées dans cet article.

RÉFÉRENCES

1. Nystrom T. A bacterial kind of aging. *PLoS Genet* 2007 ; 3 : e224.
2. Mortimer RK, Johnston JR. Life span of individual yeast cells. *Nature* 1959 ; 183 : 1751-2.
3. Ackermann M, Stearns SC, Jenal U. Senescence in a bacterium with asymmetric division. *Science* 2003 ; 300 : 1920.
4. Stewart EJ, Madden R, Paul G, Taddei F. Aging and death in an organism that reproduces by morphologically symmetric division. *PLoS Biol* 2005 ; 3 : e45.
5. Wang P, Robert L, Pelletier J, et al. Robust growth of *Escherichia coli*. *Curr Biol* 2010 ; 20 : 1099-103.
6. Egilmez, NK, Jazwinski SM. Evidence for the involvement of a cytoplasmic factor in the aging of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* 1989 ; 171 : 37-42.
7. Robertson FW, Sang JH. The ecological determinants of population growth in a *Drosophila* culture. I. Fecundity of adult flies. *Proc Roy Soc London Ser B Biol Sci* 1944 ; 132 : 258.
8. Lindner AB, Madden R, Demarez A, et al. Asymmetric segregation of protein aggregates is associated with cellular aging and rejuvenation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008 ; 105 : 3076-81.
9. Muller FL, Lustgarten MS, Jang Y, et al. Trends in oxidative aging theories. *Free Radic Biol Med* 2007 ; 43 : 477-503.
10. Elowitz MB, Levine AJ, Siggia ED, Swain PS. Stochastic gene expression in a single cell. *Science* 2002 ; 297 : 1183-6.
11. Kaern M, Elston TC, Blake WJ, Collins JJ. Stochasticity in gene expression: from theories to phenotypes. *Nat Rev Genet* 2005 ; 6 : 451-64.

NOUVELLE

La reprogrammation vers la pluripotence peut-elle effacer la mémoire d'une vie antérieure ?

Laure Lapasset, Olivier Milhavel, Jean-Marc Lemaître

L. Lapasset, J.M. Lemaître :
Équipe Avenir Inserm,
« Plasticité du génome et vieillissement »,
Institut de génomique fonctionnelle,
141, rue de la Cardonille,
34094 Montpellier, France.
O. Milhavel : Équipe pathologies
neurologiques et cellules souches,
Institut de génétique humaine,
141, rue de la Cardonille,
34396 Montpellier, France.
Jean-Marc.Lemaître@igf.cnrs.fr

► En août 2006, l'équipe de S. Yamanaka publiait dans la revue *Cell* la possibilité de reprogrammer *in vitro* un fibroblaste murin pour lui conférer les propriétés d'une cellule souche embryonnaire pluripotente (ES) par la simple surexpression de 4 gènes (*Oct3/4*, *Sox2*, *Klf4* et *c-Myc*) [1, 11]. Cet exploit fut renouvelé un an plus tard en produisant des iPS (*induced pluripotent stem cells*) à partir de cellules humaines, ouvrant une nouvelle voie à la médecine régénératrice avec un espoir thérapeutique considérable [12]. En effet, dérivées du patient, ces cellules écartent tout risque de rejet de greffe. Une période de doutes mêlée de scepticisme succéda à cette phase d'euphorie, pendant laquelle les iPS furent présentées comme de pâles copies des cellules ES avec des capacités de différenciation différentes [2-5]. L'idée que les iPS pouvaient avoir conservé des traces épigénétiques de leur vie antérieure avait germé dans les esprits.

Trois études majeures publiées cet été dans les revues *Nature*, *Nature Biotechnology* et *Cell Stem Cell* ont tenté d'y apporter une réponse convaincante. Le groupe de K. Hochedlinger [6] a comparé des iPS issues de trois types cellulaires distincts, dérivés des trois feuillettes embryonnaires, prélevés sur des souris chimères obtenues par injection d'iPS dans un blastocyste. Après avoir révélé que ces iPS « secondaires » (donc génétiquement identiques aux iPS primaires contribuant aux chimères) n'avaient pas totalement éteint certains gènes caractéristiques de leur type cellulaire d'origine, les auteurs démontrent clairement que les transcriptomes des iPS produites à partir de différents tissus des chimères se regroupent systématiquement selon leur tissu d'origine et non pas en fonction de la chimère d'origine [6]. Ils démontrent également que ces iPS se différencient de manière préférentielle dans la voie de leur feuillet d'origine [7], ce qui suggère

la présence d'une mémoire épigénétique qui n'aurait pas été totalement effacée par la reprogrammation. L'équipe de G.Q. Daley [7] recherche ces traces de leur passé dans le niveau de méthylation de l'ADN qui régule, en accord avec les marques spécifiques d'histone, l'activité transcriptionnelle d'une majorité de promoteurs. Les auteurs comparent des iPS produites à partir de souris de même fond génétique et les cellules ES dérivées d'embryons obtenus par transfert nucléaire ou par fécondation naturelle et prélevés *in utero*, et arrivent à la même conclusion : les iPS se redifférencient préférentiellement vers leur tissu d'origine. Ils notent alors que la différenciation des iPS est, d'une façon générale, moins efficace que celle des ES, et effectuent alors une cartographie à grande échelle des régions différentiellement méthylées (DMR) établissant pour la première fois le lien entre un défaut de méthylation/déméthylation, le tissu