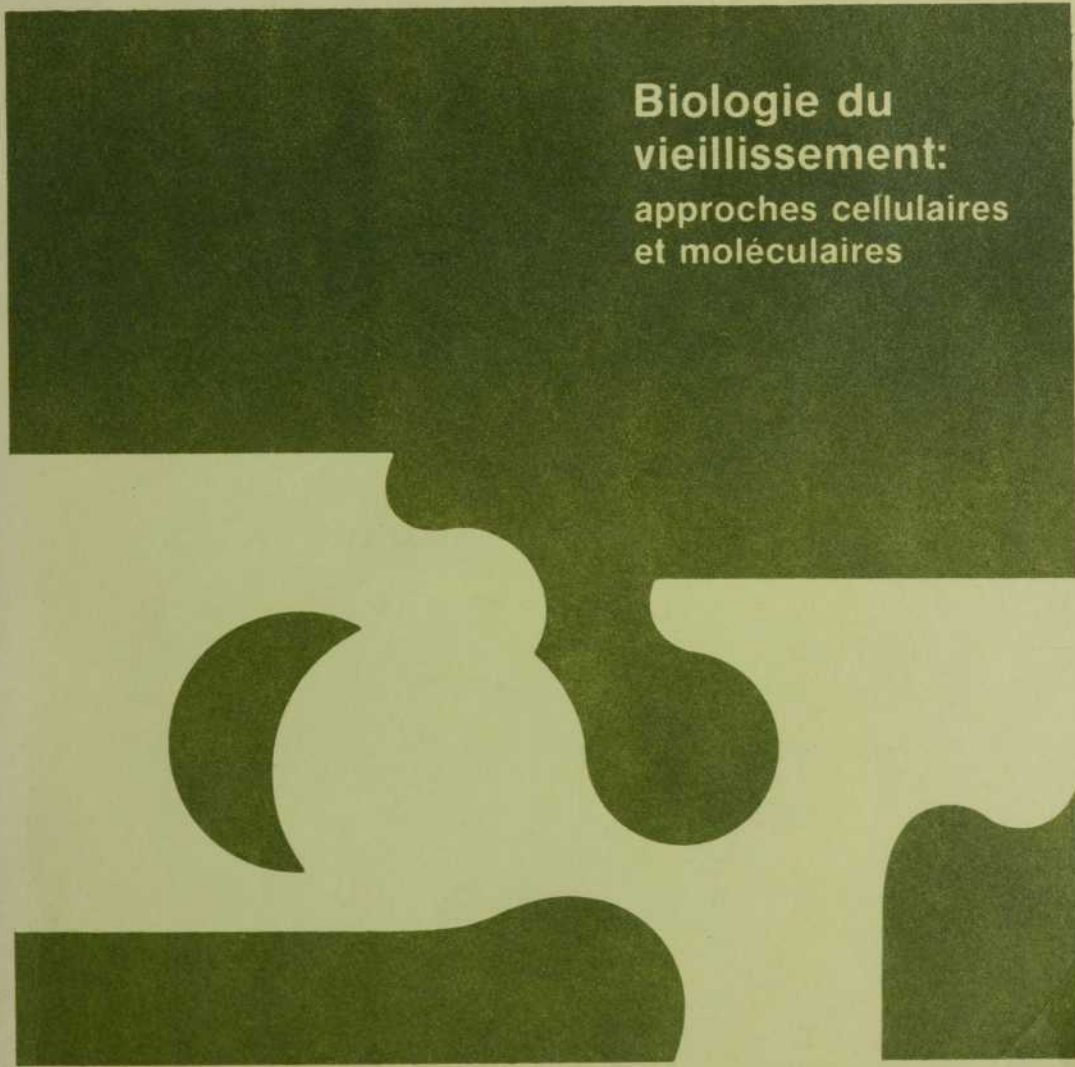


618.97
B6156
1981

7

**Cahiers
de l'ACFAS**

**Biologie du
vieillessement:**
approches cellulaires
et moléculaires

An abstract graphic design featuring a large, dark green, irregular shape that resembles a stylized cell or organism. This shape has several protrusions and indentations. Below it, there are several other dark green shapes: a crescent moon-like shape on the left, a large circular shape in the center, and a smaller, more complex shape on the right. The background is a light cream color.

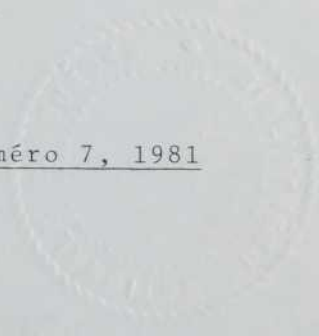


Bibliothèque Nationale du Québec

BIOLOGIE DU VIEILLISSEMENT:
approches cellulaires et moléculaires

Actes du colloque tenu
le 15 mai 1980 à
l'Université Laval dans le
cadre du 48e Congrès de
l'Association canadienne-
française pour l'avancement
des sciences

Les Cahiers de l'ACFAS, numéro 7, 1981



Association canadienne-française
pour l'avancement des sciences
C.P. 6060
Montréal, Québec
H3C 3A7
Tél.: (514) 342-1411

Prix: \$5.00

Dépôt légal:

Bibliothèque nationale du Canada, 2e trimestre 1981

Bibliothèque nationale du Québec, 2e trimestre 1981

RC
952
B54

D8103347

SOMMAIRE

	Page
Introduction par J. Estable-Puig, M.R.V. Murthy et Gilliane Nosal.....	1
"Changements dépendants de l'âge du système immunitaire" par B. Cinader, T. Amagai, T. Matsuzawa et K. Nakano.....	5
"Le vieillissement: reflète-t-il une limitation inhérente de l'organisme dans sa capacité de traitement de l'information?" par M.R.V. Murthy.....	35
"Vieillissement cérébral: un modèle neuronal" par Gilliane Nosal.....	63
"Pathologie du système nerveux en vieillissement" par Rosita et Juan F. Estable-Puig.....	99
"Mécanismes moléculaires du vieillissement cellulaire" par Robert Shmookler Reis et Samuel Goldstein.....	143



INTRODUCTION

L'universalité du vieillissement, son inexorabilité apparente, chez l'être humain du moins, ainsi que sa concrétisation en une séquence d'événements chronologiques ont servi d'arguments au concept du vieillissement en tant que résultante d'une expression génétique, contrôlée au même titre que les phénomènes de différenciation et de développement.

D'autre part, la conception "environnemental" interprète la sénescence comme le résultat d'une somme d'événements complexes et hétérogènes impliquant des composantes endogènes et exogènes. Des facteurs nutritionnels, pathologiques, physiologiques, toxiques, etc., pourraient entraîner la dégénérescence des structures et des fonctions chez le sujet vieillissant.

Finalement, une troisième optique conçoit la vie entière de l'individu comme contrôlée génétiquement mais modulée par diverses variables de l'environnement.

Bien que les données de recherches accumulées jusqu'à maintenant soient impressionnantes, il demeure difficile de discriminer entre les facteurs primaires et secondaires du phénomène de vieillissement.

Les buts à long terme, avoués ou implicites des chercheurs en gérontologie seront, dans une certaine mesure, influencés par leur interprétation des causes et de la signification du vieillissement. Idéalement les recherches devraient pouvoir contribuer au soulagement des troubles morphofonctionnels et des maladies liées à l'avancement en âge. Un projet, plus ambitieux encore, serait de tenter de prolonger la jeunesse et la longévité par divers moyens génétiques et environnementaux.

Du fait de la complexité du phénomène de la sénescence, de la multiplicité des facteurs modifiant sa nature et de l'influence profonde que le vieillissement exerce sur toute activité humaine, toute étude gérontologique significative implique la participation de diverses disciplines et l'utilisation de différentes approches méthodologiques.

Aussi les coordonnateurs de la rédaction de cet ouvrage ont-ils vivement ressenti le besoin d'une collaboration interdisciplinaire et d'un échange d'idées au cours de leur travail. Ils ont donc essayé de les réaliser de diverses manières telles que l'organisation de réunions périodiques et des projets communs dans le cadre de l'Université Laval.

Le colloque "Aspects biomédicaux du vieillissement", organisé sous les auspices de l'ACFAS, représente une tentative d'élargir ces échanges avec des collègues d'universités canadiennes explorant les mécanismes du vieillissement au moyen d'approches complémentaires aux leurs.

La participation du système immunitaire aux phénomènes du vieillissement a été explorée par Cinader et collaborateurs qui ont montré des altérations liées à l'âge de plusieurs paramètres immunologiques.

Le système nerveux exerce un rôle important sinon crucial dans plusieurs aspects du vieillissement, particulièrement en ce qui regarde l'être humain. Les contributions apportées par le groupe de Laval explorent la sénescence dans le système nerveux par des approches morphologique, pathologique et moléculaire chez l'animal et le sujet humain. Le cerveau est constitué d'un réseau extrêmement complexe de millions de cellules individuelles qui possèdent des caractéristiques structurales et fonctionnelles distinctes. De ce fait, les observations sont souvent difficiles à interpréter et l'implication des divers types de cellules ne peut être toujours évaluée valablement.

Par l'utilisation d'un modèle de cellules en culture, il a été possible d'acquérir une compréhension quelque peu meilleure des mécanismes du vieillissement bien que les résultats ainsi obtenus ne peuvent décrire adéquatement le comportement d'une cellule donnée dans une communauté cellulaire interdépendante telle qu'un tissu. Un exemple de la validité d'une telle approche est fournie dans l'article de Reiss et Goldstein qui décrivent les interrelations entre la nature de l'horloge biologique, les structures du DNA et le vieillissement des cellules en culture.

Les travaux présentés dans ce volume ne sont que la partie formelle de ce colloque. Ils ont été suivis de discussions et d'échanges d'idées et de méthodologies qui ne font pas l'objet de publication.

De sincères remerciements s'adressent au professeur Guy Pelletier, du département d'Immunologie au CHUL, qui a bien voulu accepter de présider les exposés et les débats de ce colloque, ainsi qu'aux intervenants dans la discussion générale. Merci également à l'ACFAS et, en particulier, son directeur, M. Serge Hamel, qui ont aidé, matériellement et moralement, à l'organisation de cette rencontre scientifique et à la publication de cet ouvrage.

J. Estable-Puig,
M.R.V. Murthy,
Gilliane Nosal.





CHANGEMENTS DÉPENDANTS DE L'ÂGE

DU SYSTEME IMMUNITAIRE

B. Cinader, T. Amagai, T. Matsuzawa et K. Nakano
Institut d'Immunologie, Université de Toronto

Je vais aborder l'analyse des changements du système immunitaire en fonction de l'âge en introduisant des considérations "programmatisques", c'est-à-dire discuter le problème dans le cadre d'une direction prévue de la médecine scientifique.

Cette direction tend vers un traitement individualisé en fonction des marqueurs identifiés et des produits génétiques de la mosaïque polymorphique liée à la maladie et qui en détermine ou qui en influence l'incidence et l'évolution (1).

Au point où en sont les choses, l'individualité, telle qu'identifiée au niveau moléculaire, n'entre que rarement en ligne de compte dans les décisions cliniques. Ce sont les essais cliniques qui fournissent une base objective dans le choix du traitement optimal. On adoptera un traitement donné que si on peut observer une différence significative entre les résultats obtenus par ce traitement par rapport à l'absence de traitement ou par rapport à d'autres traitements. On reconnaîtra la supériorité d'une

thérapie en fonction de la proportion de guérison ou d'amélioration de l'état des patients qui en résulteront, même si cette proportion atteint rarement 100%. Donc, un traitement choisi sur la base des essais cliniques est toujours inadéquat pour quelques patients non-identifiables à priori. L'échec de tels traitements est dû à l'hétérogénéité soit de la maladie, soit de la réponse individuelle à la maladie ou au traitement.

Donnez une classification précise, la cause des variations dans la progression et l'incidence d'une maladie devraient fondamentalement être attribuables à des différences dans le cadre desquelles se déroulent ces interactions. Ces différences affecteront les tissus et les cellules atteintes, incluant aussi les mécanismes de leur contrôle et de leur régulation, qu'ils soient biochimiques, cellulaires ou immunologiques.

Examinons un cas particulièrement simple où il y a interaction d'un seul gène et d'une seule drogue, et où l'analyse du polymorphisme enzymatique peut servir de guide dans le choix du traitement. Le relaxant musculaire succinylcholine provoque de l'apnée prolongée chez environ un individu sur deux mille et est inactif chez un petit nombre de patients. Ces deux réponses indésirables sont liées à des différences individuelles au niveau moléculaire - le polymorphisme de la cholinestérase - que l'on peut anticiper du phénotype polymorphique du patient (2, 3). Dès lors, on peut utiliser cette drogue en toute

sécurité chez des patients possédant le type enzymatique normal tant qu'il n'y a pas d'anomalies musculaires ou de déséquilibre électrolytique (4). Mais on doit l'éviter chez des patients où une anomalie enzymatique résulte en un catabolisme déficient de cette drogue. On peut donc estimer que son administration aura l'effet souhaité si on la prescrit après l'analyse polymorphique de l'enzyme.

La relation entre les effets fâcheux d'une drogue et le génotype peut être moins directe: quelques formes d'enzymes polymorphiques affectent la stabilité de la membrane, de sorte que ces drogues peuvent endommager les membranes bien qu'il n'y ait pas une réaction entre l'enzyme et la drogue (2).

On a observé les premières corrélations entre l'incidence des maladies et des marqueurs cellulaires lors d'études sur les groupes sanguins A, B, O (5, 6). Ceci fut suivi par une seconde série de corrélations lors de l'étude des produits du locus majeur d'histocompatibilité, HLA (7, 8), indiquant, non seulement que l'incidence mais aussi que la progression de la maladie est liée à la région HLA et que, dans au moins un cas, cette corrélation est suffisamment forte pour rendre utile, au point de vue diagnostique, l'identification du produit HLA. On voit donc que l'identification de différents paramètres peut aider non seulement à l'identification de populations à risques, mais aussi pour le pronostic du succès d'un traitement donné que pour la progression de la maladie. Enfin, ce genre d'information pourra et

devra devenir une composante importante dans la distribution des soins apportés aux malades. Parmi les paramètres qui se réfèrent à notre discussion, ceux qui caractérisent les changements en fonction de l'âge et leur rapidité sont, de toute évidence, d'une énorme importance, tout au moins dans le contexte de plusieurs maladies essentiellement liées au vieillissement, comme les maladies néoplastiques et auto-immunes. Alors que nous abordons l'analyse de ces changements, on peut se demander s'il n'y a qu'une seule horloge principale contrôlant tous les processus, ou s'il y en a plusieurs, chacune avec son contrôle génétique indépendant, qui déterminent les changements dûs au vieillissement et qu'il faut comprendre pour pouvoir analyser et prédire la progression de la maladie. Il est évident que toute allèle ayant un effet drastique mènera à la sénescence et au déclin en outrepassant l'effet des programmes génétiques distincts que nous allons appeler des horloges individuelles. En l'absence d'un tel gène anormal, cependant, les horloges individuelles vont fonctionner chacune à leur propre rythme. Je vais tout d'abord donner quelques exemples de l'allélisme anormal auquel je viens de faire allusion. Nous mettrons ensuite en évidence les horloges individuelles du système immunitaire en examinant les mécanismes d'une de ces horloges individuelles.

On peut illustrer l'allélisme anormal par les maladies du vieillissement précoce, comme la progerie, le syndrome de Werner, le diabète mellitus qui

provoquent une dégénérescence cellulaire (1,9,10). De tels changements se retrouvent aussi dans le xeroderma pigmentosa, dont s'est servi Sir Macfarlane Burnet pour développer son hypothèse, selon laquelle les enzymes polymorphiques de réparation peuvent en comprendre certains qu'une seule mutation suffit à rendre si inefficace qu'il en résulte un accroissement des défauts de synthèse, une sénescence cellulaire accélérée, et une forte incidence d'une variété de tumeurs (33). Néanmoins, d'autres observations semblent indiquer qu'un nombre considérable de programmes génétiques indépendants contrôle normalement la maturation et peut-être le processus de sénescence. Une des indications de l'existence de contrôles indépendants pour différentes lignées cellulaires provient d'études sur les souris tétraparentales (allophéniques; 34, 35). Ces animaux sont obtenus par agrégation de deux blastomères génétiquement différents cultivés pour former un seul embryon. Quand ce "composé" génétique a atteint le stade de morula ou de blastocyte, il est transféré dans l'utérus d'une mère adoptive - chaque animal qui naît provient de deux embryons et donc de quatre parents. La prédominance relative de cellules de génotypes différents peut être étudiée en fonction de l'âge. En général, pour un type cellulaire donné, les cellules d'un certain génotype peuvent prédominer à une certaine période de la vie de l'animal alors qu'un autre génotype sera prépondérant plus tard. Un tel phénomène a été observé pour les spermatogonies et les cellules de la lignée érythrocytaire. Tout se passe comme si

la replication et la longévité de ces types cellulaires distincts étaient différemment programmées au niveau génétique.

En examinant le polymorphisme des changements associés au vieillissement, qui semblent sélectivement localisés à certains systèmes particuliers, nous avons choisi d'étudier les paramètres du système immunitaire. Depuis quelque temps, on sait que, chez l'animal et chez l'humain, la capacité de réagir en produisant des anticorps diminue avec l'âge tandis que la tendance à former des auto-anticorps s'accroît. Des modèles animaux expérimentaux nous ont permis d'identifier au moins trois processus associés au vieillissement et qui seraient impliqués dans des variations de la réponse immunitaire: 1) diminution des cellules T suppressives ou d'amplication de la suppression (11, 12, 13), ii) augmentation des cellules suppressives non-spécifiques (15, 14), et iii) augmentation des anticorps anti-idiotypiques (16, 19). Le premier et le troisième de ces processus, pourraient être étroitement reliés puisque la diminution des cellules T suppressives peut provoquer une formation accrue d'anticorps en réponse aux antigènes, les idiotypiques inclus. Si c'était le cas, on pourrait s'attendre à ce qu'une augmentation des auto-anti-idiotypes entraîne conséquemment une baisse de la capacité de synthétiser des anticorps, ce qui va de pair avec une augmentation de la résistance à l'induction de la tolérance. C'est ce que nous avons étudié chez quatre souches de souris, utilisant la gammaglobuline de lapin sans agrégats immunotoléroènes.

On peut voir (figure 1) que le vieillissement n'influence pas de la même manière le changement dans la réponse à l'induction de la tolérance ou dans le déclin de la capacité de fabriquer des anticorps, contrairement à ce que nous devrions nous attendre si ces deux phénomènes étaient attribuables à un mécanisme central commun.

On peut voir dans la figure 1 que la souche A/J en est une qui ne montre pas de diminution du taux de tolérance inductible par des gamma-globulines de lapin sans agrégat (RGG). On peut se demander si les changements observés chez C57BL/6 et SJL sont exceptionnels ou si l'ampleur de ces changements est exceptionnelle. Pour déterminer si des changements de ce type se produisent chez les souris A/J, nous avons cherché et trouvé, parmi des immunoglobulines hétérologues, un tolérogène ayant une capacité relativement faible d'induction de l'insensibilité; il s'agit de l'IgG3. Nous avons comparé l'induction de la tolérance chez des souris SJL âgées de trois semaines entre deux protéines du myelome humain, IgG1 et IgG3. Avec la première, on peut induire un taux élevé de tolérance; avec l'autre, la réduction de la sensibilité était relativement faible (20). Donc, IgG3 est un tolérogène adéquat pour déterminer s'il y a des changements dans la résistance à la tolérance au cours du vieillissement chez des souches comme A/J, que l'on sait maintenir une aptitude à devenir tolérant au RGG durant les 12 premières semaines de vie. Il est apparent, d'après le tableau 1,

Figure 1

Changements dépendants de l'âge dans l'inductibilité de la tolérance chez les souris SJL/J, A/J, DBA/1J et C57BL/6J. Des souris femelles SJL/J, A/J, DBA/1J et C57BL/6J ont été injectées avec du RGG sans agrégat (-- --) aux jours indiqués en abscisse ou n'ont pas reçu d'injection (—0—). 7 et 57 jours plus tard, on a immunisé toutes ces souris avec 0.5 mg de RGG agrégé à la chaleur. 5 jours après cette dernière injection, on a compté les cellules spléniques formant des plages (F.C.C.). Les lignes verticales indiquent la valeur de l'écart-type.

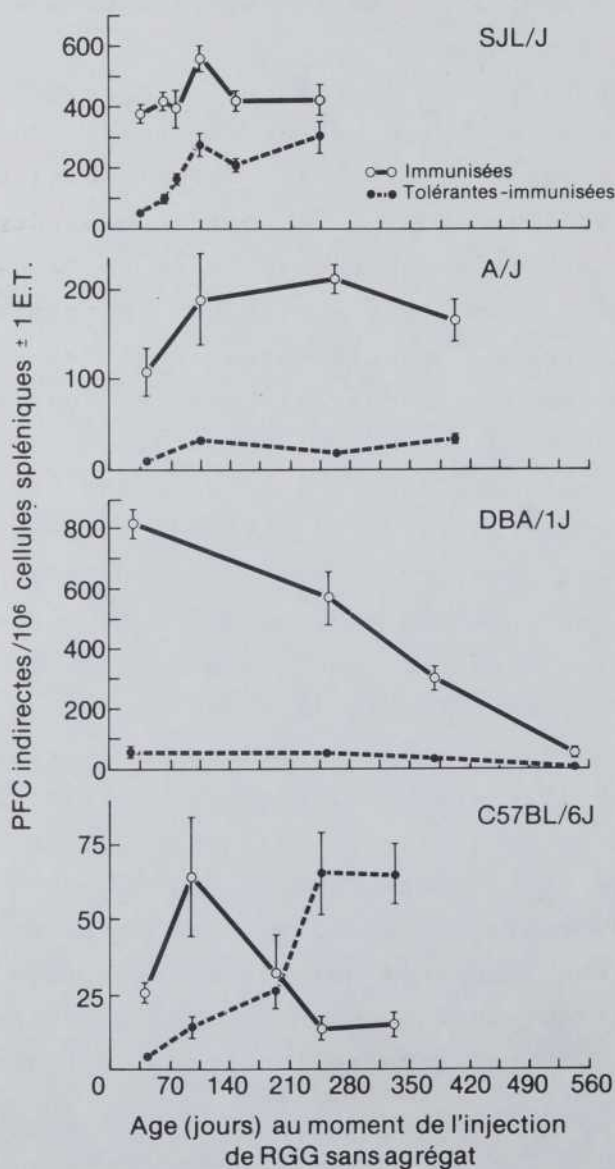


Tableau 1

Résistance à l'induction de la tolérance avec deux protéines de myélome humain, IgG1 et IgG3 (20).

Pour induire la tolérance, nous avons injecté i.p. aux animaux 0.2 mg d'IgG3 sans agrégats/g de poids corporel, à l'âge indiqué dans la deuxième colonne du tableau. Deux semaines plus tard, on a immunisé s.c. ces souris avec 0.25 mg d'IgG3 agrégé à la chaleur dans de l'I.F.A. Une semaine après cette immunisation, elles ont reçu 10 g d'IgG3- ^{125}I . Les animaux normaux ont reçu 10 g d'IgG- ^{125}I au même âge que les animaux tolérants et immunisés.

Injection	Age (en semaines) lors de l'injection d'IgG 3 sans agrégat	Pourcentage d'antigène persistant 48 heures après l'injection d'IgG3 marquées							
		^{125}I -IgG3	A/J	C57BL/6J	DBA/J	SJL/J			
^{125}I -IgG3	-	6	68.8 ± 8.5 (21) ^a	70.4 ± 13.7 (14)	66.5 ± 12.2 (20)	64.7 ± 14.9 (22)			
⑤ IgG3, ⑥ IgG3-IFA, ^{125}I -IgG3	3	6	67.0 ± 11.5 (17)	62.9 ± 10.2 (13)	59.0 ± 9.5 (18)	44.6 ± 20.6 (21)			
			$p^b 0.6 - 0.5$	$0.2 - 0.1$	$0.05 - 0.02$	< 0.001			
			$R^c 0.97 \pm 0.20$	0.89 ± 0.22	0.88 ± 0.21	0.68 ± 0.35			
^{125}I -IgG3	-		60.7 ± 11.8 (18)	51.3 ± 10.4 (15)	62.1 ± 10.2 (24)	41.4 ± 9.0 (17)			
⑤ IgG3, ⑥ IgG3-IFA, ^{125}I -IgG3	28-34	31-37	4.4 ± 5.6 (13)	14.5 ± 14.6 (11)	7.1 ± 8.2 (15)	8.6 ± 13.8 (13)			
			$P < 0.001$	< 0.001	< 0.001	< 0.001			
			$R 0.07 \pm 0.09$	0.28 ± 0.30	0.11 ± 0.13	0.20 ± 0.33			

a) Moyenne E.T., (n) = nombre d'animaux par groupe.

b) Comparaison statistique des pourcentages d'antigène qui persiste chez les souris tolérantes-immunisées et chez celles qui n'ont pas été traitées au préalable.

c) Rapport entre le pourcentage d'antigène qui persiste dans l'organisme des souris tolérantes-immunisées et celui obtenu pour les souris qui n'ont pas été pré-traitées par le tolérogène ni l'antigène.

que les animaux A/J acquièrent une résistance à l'induction de la tolérance avec l'avancement en âge. Donc la dépendance en rapport avec l'âge de la résistance à la tolérance n'est pas restreinte aux souris SJL, NZB (20) et C57BL/6 et cette caractéristique inhabituelle de ces souches, et de quelques autres (21, 22), est le commencement de l'établissement de cette résistance, c'est-à-dire un développement prématuré du processus normal du vieillissement du circuit suppresseur T. Ce processus semble se produire, quoique à un taux plus lent, chez la plupart des souches de souris.

Jusqu'ici nous savons que la résistance à l'induction de la tolérance est dépendante de l'âge et qu'elle est répandue chez des animaux possédant des éléments génétiques différents. Je vais maintenant me pencher sur le mécanisme qui provoque la résistance à l'induction de la tolérance, tel qu'analysé chez les souris SJL (13, 23, 24, 25). Je vais démontrer que nous avons affaire à un changement dans la balance entre les cellules T helper et les cellules suppressives et à une diminution des réservoirs périphériques et centraux de cellules T suppressives ou d'amplification de la suppression.

Nous avons utilisé la reconstitution d'animaux irradiés léthalement pour démontrer que la résistance à l'induction de la tolérance dépend de l'âge des cellules T (13, 23). Nous avons employé une approche similaire pour déterminer jusqu'à quel point l'âge des cellules A et celui des cellules T était décisif

dans la résistance à l'induction de la tolérance. Tout d'abord, je vais décrire ce type d'expérience.

On a fait des expériences de reconstitution avec des cellules thymiques et de la moëlle osseuse. On a donné, par voie intraveineuse, à des souris SJL femelles de 8 semaines, pré-irradiées 3 jours auparavant, 1×10^7 cellules de moëlle osseuse, privées de cellule A et 10^8 cellules thymiques de donneuses âgées de 8 semaines; on leur a injecté en même temps 5×10^7 cellules spléniques irradiées (1300 rad).

Immédiatement après, on a immunisé au RGG 2 groupes de ces souris et on a mesuré la réponse par la formation de plages. Nous avons constaté que le taux de tolérance est indépendant de l'âge des cellules radio-résistantes et dépend de l'âge de la source de cellules thymiques (12; Tableau 2). On peut donc en conclure que la résistance à l'induction de la tolérance est attribuable à une quelconque lésion des cellules T. Cette lésion affecte-t-elle le circuit des cellules T de suppression? La méthode classique pour démontrer la présence de cellules suppressives ou d'amplification de la suppression est de comparer la sensibilité d'animaux irradiés que l'on a reconstitués avec des cellules thymiques normales ou un mélange de cellules thymiques provenant d'animaux normaux et d'animaux irradiés. On détecte la tolérance à l'infection, si les cellules thymiques des donneurs tolérants diminuent la capacité des cellules T normales à coopérer avec les cellules B, au cours de la réponse à l'immunogène. Cependant, il est difficile

Tableau 2

Effet de l'âge des cellules spléniques radio-résistantes
sur l'induction de la tolérance (12).

Age des donneurs de cellule T _H , en semaines	A3, 5 × 10 ⁷	A12,* 5 × 10 ⁷	Nombre de receveurs	Nombre de PFC/rate, moyenne ±E.T., log ₁₀
3	+	-	5	3.14 ± 0.61
	-	+	5	3.16 ± 0.99
12	+	-	4	4.23 ± 0.58
	-	+	7	4.00 ± 0.43

* A3, A12 signifie cellules radio-résistantes des donneurs âgés de
3 ou de 12 semaines.

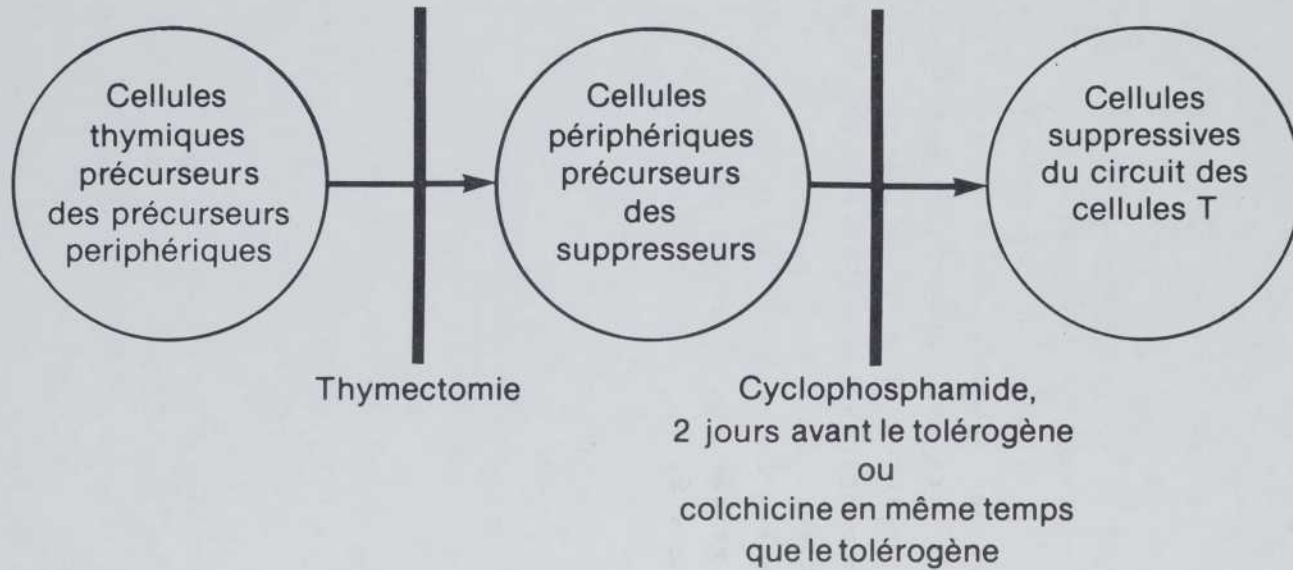
de démontrer la tolérance à l'infection chez les souris SJL. Néanmoins, on peut mettre en évidence, par d'autres moyens, des changements mesurables à l'intérieur de la population des cellules T de suppression qui sont responsables de la résistance à l'induction de la tolérance. Cette démonstration s'appuie sur le fait que la colchicine, administrée 2 jours avant le tolérogène, peut interférer avec l'induction de la tolérance. L'effet de ces drogues est plus grand chez les souris SJL âgées que chez les jeunes. Chez ces dernières, il est plus grand après une thymectomie, qui les prive de leur réservoir de précurseurs en cellules suppressives (25,26).

La thymectomie, 16 à 18 jours avant l'induction de la tolérance, n'affecte ni la réponse des anticorps ni l'inductibilité de la tolérance. La thymectomie, 33 jours avant l'induction, réduit la réponse des anticorps aussi bien que l'inductibilité de la tolérance. La colchicine, injectée avec de la gamma-globuline sans agrégat de lapin, inhibe l'induction de la tolérance, partiellement chez les souris de 35 jours et complètement chez celles de 106 jours. On peut bloquer complètement l'induction de la tolérance avec de la colchicine chez des souris plus jeunes et thymectomisées 17 jours avant l'induction. Une faible dose de cyclophosphamide interfère avec l'induction de la tolérance chez des souris âgées mais pas chez les jeunes. A forte dose, la cyclophosphamide interfère avec l'induction de la tolérance aussi bien chez les souris âgées que chez les jeunes. L'interférence de faibles doses de

cyclophosphamide sur l'induction de la tolérance est plus marquée après thymectomie. Nous avons déjà publié les détails de ces expériences (11, 25), je me contenterai de montrer, dans la figure 2, leurs conclusions.

Jusqu'à présent, nous avons démontré que les souris SJL ont un déficit du circuit T suppresseur, déficit qui augmente à mesure que l'animal vieillit et qui résulte en une perte des précurseurs du thymus et finalement, des précurseurs périphériques. Nous avons déjà montré que des changements de cette nature surviennent aussi chez d'autres souches, mais beaucoup plus lentement. Je vais maintenant aborder les processus de vieillissement chez les souris C57BL/6 et la façon dont ils affectent la résistance à la tolérance, mettant en évidence d'autres horloges qui, bien que comprises de façon incomplète, semblent compliquer la progression des événements, tels que décrits chez les souris SJL. Lorsque se développe la résistance à la tolérance chez la souche C57BL/6, des changements considérables surviennent à l'intérieur de la population des cellules thymiques des souris âgées traitées avec un tolérogène. On peut mettre ceci en évidence par une diminution des capacités des thymocytes des souris injectées avec le tolérogène, lors de la tolérance à l'infection. Néanmoins, on peut démontrer, par reconstitution, que chez des souris C57BL/6 âgées et tolérisées, le niveau de tolérance semble plus fort chez les cellules T que dans l'ensemble de l'organisme. Ce paradoxe devient compréhensible

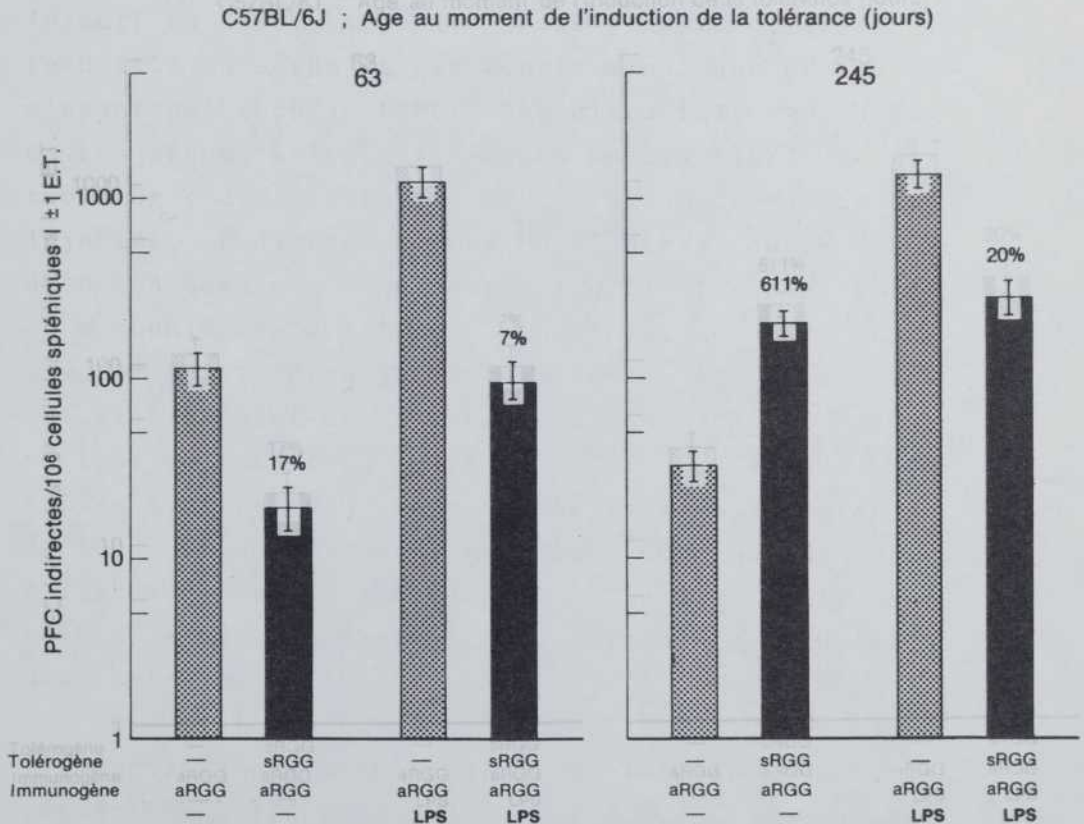
Figure 2



lorsqu'on immunise, avec un mélange de RGG contenant des agrégats et des lipopolysaccharides (LPS), des animaux de 35 semaines pré-traités avec le tolérogène. Dans ce cas, les animaux immunisés mais non-tolérisés, renversent la diminution de la capacité reliée au vieillissement de répondre avec des anticorps en faisant preuve d'une très forte augmentation de leur production d'anticorps. Les souris C57BL/J traitées au tolérogène avant l'immunisation, font preuve d'une augmentation plus faible et semblent être tolérantes (figure 3). Il n'y a pas d'effet similaire de LPS lorsqu'on compare la réponse de souris SJL immunisées à celles des souris immunisées et tolérisées. De toute façon, on peut démontrer qu'un deuxième processus, non observable chez les souris SJL, paraît modifier le premier chez les souris C57BL/6, non seulement en examinant les populations cellulaires au cours d'expériences de reconstitution, mais aussi par l'approche de la tolérance LPS que je viens de décrire. Je vais maintenant discuter une horloge affectant la réponse immunitaire chez les souris SJL, en utilisant encore des souris C57BL/6 pour montrer des différences dans les programmes génétiques de contrôle. Nous l'avons découvert par une approche destinée à approfondir l'exploration des changements dans les mécanismes régulateurs; nous avons examiné la réponse de souris SJL/J aux hématies de moutons (SRBC) en terme de capacité de suppression du thymus et de facteurs sériques de suppression chez des souris injectées avec des SRBC. On a reconstitué des

Figure 3

Inductibilité de la tolérance chez de jeunes et de vieilles souris femelles C57BL/6J. On a injecté ou pas, à des souris femelles de 63 ou 245 jours, 0.2 mg de RGG sans agrégat (RGG)/g poids corporel. 7 ou 17 jours plus tard, on a immunisé toutes ces souris avec 0.5 mg de RGG agrégé à la chaleur (aRGG) avec ou sans lipopolysaccharides (LPS); 5 jours après cette dernière injection, on a compté les cellules formant des plages. La hauteur des colonnes indique le PFC moyen/10⁶ cellules spléniques. Les colonnes en pointillé indiquent la réponse des animaux immunisés; les colonnes noires indiquent celles des animaux tolérisés et immunisés. Les lignes verticales indiquent l'écart-type.



animaux, après irradiation létale, soit avec un mélange de cellules ganglionnaires lymphatiques et de thymus, soit avec des cellules ganglionnaires seules. L'âge des donneurs de cellules ganglionnaires étant constant, on variait celui des donneurs de cellules thymiques. On a ensuite immunisé ces animaux reconstitués avec des globules rouges de mouton (SRBC) et on a mesuré la formation des plages par les cellules provenant de tous les ganglions lymphatiques de l'animal reconstitué. On identifiait une activité suppressive ou amplificatrice des cellules thymiques selon que les animaux sont reconstitués avec des cellules thymiques et des cellules ganglionnaires, soit avec des cellules ganglionnaires seules, répondaient aux hématies de mouton de façon accrue ou diminuée. Les thymocytes de jeunes souris, entre 3½ semaines et 8 semaines, quelque soit la souche, provoquent une réduction significative du nombre de plages dans les ganglions des receveurs reconstitués après irradiation létale. Les cellules thymiques de donneurs SJL/J, âgés de plus de 13 semaines, n'ont pas inhibé mais au contraire ont augmenté la réponse des ganglions lymphatiques des animaux reconstitués (27). Nous avons donc détecté, de deux façons différentes, la perte de capacité suppressive chez les souris SJL: la première basée sur l'induction de la tolérance avec de l'Ig hétérologue, l'autre sur la réponse au SRBC des anticorps formant des plages. Si la cellule suppressive était en fait la cause des changements d'inductibilité de la tolérance,

il devrait être possible de mettre en évidence des changements dans les facteurs sériques. On a rapporté l'existence d'un facteur sérique suppressif, ayant un faible poids moléculaire, et on l'a isolé sur filtre diaflo à partir de sérum d'animaux en réponse primaire; on l'a détecté chez les souris Balb/cJ et AKR/J (28,29). Collaborant avec Paraskevas et ses collègues de Winnipeg, nous avons mené des expériences pour déterminer si la concentration de facteurs de petit poids moléculaire différerait en fonction de l'âge.

A des souris SJL/J de différents âges, on a injecté du SRBC. Sept (7) jours plus tard, on a recueilli du sérum de ces souris ainsi que de souris n'ayant pas reçu de SRBC. Des ultra-filtrats UM-10 de ces sérums préparés avec des souris SJL/J de trois âges différents (3, 13 et 26 semaines) ont été injectés, en divers volumes, à d'autres souris SJL de 6 à 8 semaines. Quarante-cinq minutes plus tard, on a soumis ces dernières à une injection i.p. de 5×10^8 SRBC. Cinq jours plus tard, on a compté les cellules formant des plages (PFC) de 19 à 7 S, par un test de formation de plage (30). Les groupes contrôles avaient reçu une quantité égale de filtrat UM-10 de sérum de souris normales, du même âge que celles qu'on avait immunisées. On a exprimé le nombre de PFC des traités, en pourcentage de celui des contrôles.

Les filtrats de sérum recueilli 7 jours après l'immunisation d'animaux de 3 semaines ont réduit la formation de PFC anti-SRBC 19 et 7 S, quelque soit

la dose examinée. A 0.4 ml de filtrat, la réponse 19 S était diminuée de 70%, celle de 7 S de 60%. Les filtrats de souris SJL âgées de 13 ou 26 semaines ne diminuent pas la réponse, quelque soit la dose. En fait, 0.4 ml augmentait les réponses 19 et 7 S (27). En résumé, les facteurs suppressifs étaient produit en quantités moindres ou bien les facteurs activant de la réponse immunitaire étaient produits en plus grande quantité, combattant la suppression par un effet activateur.

Chez les souris C57BL/6, le facteur dialysable diminue aussi la réponse aux hématies de moutons de façon particulièrement forte pour des doses relativement faibles de dialysat injecté (0.2 ml). Cela affecte la réponse 7 S et 19 S. La réponse 7 S est réduite de 75% par ce facteur obtenu aussi bien chez les animaux âgés de 6 que de 41 semaines. La diminution de la réponse 19 S est un peu moins accentuée (60%) mais est la même quelque soit l'âge. Donc, tandis que les facteurs sériques de suppression, générés par immunisation au SRBC, diminuent chez la souris SJL parallèlement à l'induction de la résistance à la tolérance, une corrélation semblable n'existe pas chez les souris C57BL/6 (Paraskevas et Cinader, résultats non publiés).

J'ai présenté une des horloges perceptibles qui contrôlent des changements dans le circuit des cellules suppressives. J'ai donné aussi un bref aperçu des "complications", mettant en évidence d'autres horloges indépendantes qui restent encore à être précisées au

niveau cellulaire. J'aborderait ensuite un système expérimental cadrant relativement bien avec les changements dépendants de l'âge dans l'induction de la tolérance, de telle sorte qu'il semblerait être contrôlé par la même horloge. Ce système est assez intrigant puisqu'il repose sur l'action d'un facteur modulant les réponses à des antigènes de structures différentes, bien qu'il soit produit lors d'une réponse immunitaire spécifique.

Nous allons d'abord décrire les variations intersouches dans un système, sans démonstration de la participation des facteurs. On prend des cellules spléniques chez des animaux sensibilisés avec un haptène conjugué à un "transporteur". On les cultive ensuite en présence du "porteur" de l'haptène, mais pas conjugué avec l'haptène et d'un autre "porteur" non-apparenté et conjugué avec le même haptène. Les cellules des jeunes animaux donneurs ne peuvent répondre à l'haptène par formation indirecte de plages, mais les cellules de donneurs plus âgés ont acquis cette capacité. L'âge d'acquisition de cette capacité varie selon la souche de souris. On peut voir, d'après la figure 4 qu'il y a une corrélation raisonnable entre le moment où se développe cette capacité et celui où se développe la résistance à la tolérance (figure 1), de sorte qu'il est possible qu'un changement commun, relié à l'âge des cellules T, soit à la base de ces deux processus.

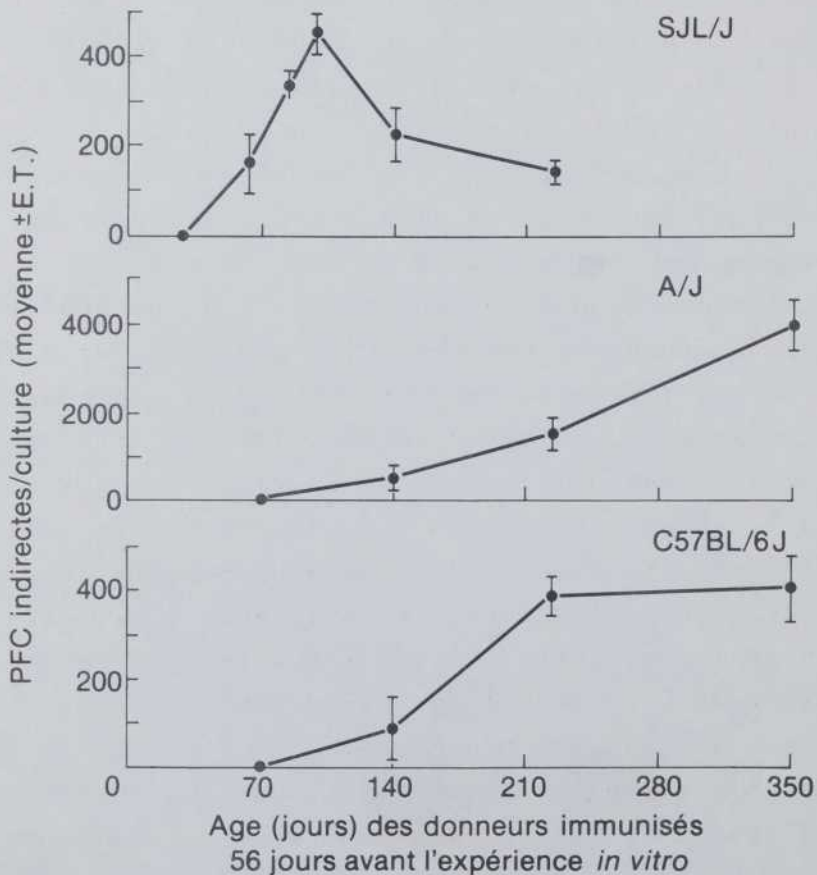
On a mis en évidence la production, dépendante de l'âge, d'un facteur auxiliaire polyclonal chez de

Figure 4

Changements dépendants de l'âge dans l'activité de l'auxiliaire polyclonal

On a immunisé les souris avec 100 μ g de DNP-KLH dans de l'alun, à l'âge indiqué plus haut. Huit semaines plus tard, on a sacrifié les souris, prélevé et cultivé leurs rates individuellement dans le milieu RPMI 1640, supplémenté avec 5% FCS et 5×10^{-5} M de 2ME. On place les cellules dans des puits d'une plaque de culture (Falcon 3008) en quadruplicate et on les cultive en présence de 0.1 μ g de DNP-RGG et de KLH. Quatre jours plus tard, on mesure le PFC indirect anti-DNP.

Réponse *in vitro* au DNP de cellules d'animaux immunisés au DNP-KLH et traités au DNP-RGG et au KLH lors de la culture

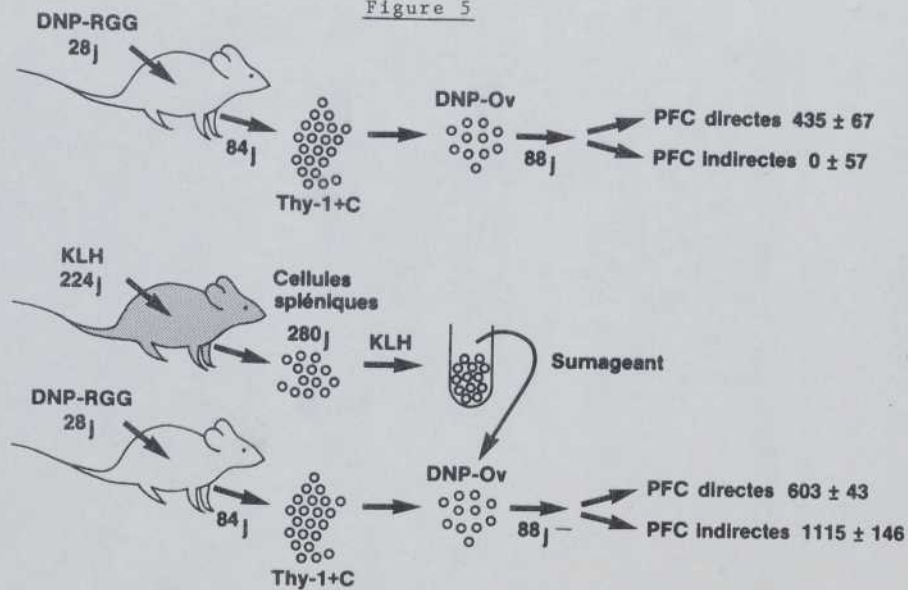


vieux animaux, mais pas chez les jeunes. L'activité auxiliaire polyclonale peut s'interpréter comme un facteur de remplacement de la cellule T. Chez des souris SJL de 32 semaines, traitées au KLH huit semaines plus tôt, on prélève la rate. On en stimule alors les cellules, in vitro, avec du KLH et on ajoute leur surnageant à des cultures de cellules spléniques, traitées à l'anti-Thy 1 et au complément (figure 5). Ces cultures de cellules spléniques étaient dérivées d'animaux traités au DNP-RGG. Elles sont ensuite immunisées in vitro avec du DNP-OVA et peuvent répondre au DNP par formation de plaque indirecte d'anticorps. Le surnageant de souris, traitées à l'âge de 4 semaines, n'ont pas d'effet sur la réponse indirecte au PFC.

Nous n'en sommes qu'au début de l'identification des événements cellulaires contrôlant les changements dynamiques continus du système immunitaire et à une certaine distance de l'identification des systèmes de marqueurs permettant de prédire ces changements (31, 21, 32). Néanmoins nous pouvons entrevoir suffisamment comment se dessine le problème pour que les buts, tels que définis au commencement de notre étude et mentionnés au début de cette publication soient à notre portée, chez la souris et chez l'humain.

Les travaux cités dans cette publication ont été supportés par le Conseil de Recherche Médicale et l'Institut National du Cancer du Canada; la version française du texte est redevable à M. Didier Gauthier et aux docteurs M. Klein, G. Nosal et E. Potworowski.

Figure 5



Références

1. Cinader, B. Individuality in disease and therapy. Editorial. Canadian Medical Association Journal, 113: 11-14, 1975.
2. Kalow, W.: Pharmacogenetics: Heredity and the response to drugs. W.B. Saunders, Philadelphia, London, 1962.
3. Pharmacogenetics: Report of a WHO scientific group. WHO Tech Rep Ser # 524, WHO, Geneva, 1973.
4. International Symposium on Malignant Hyperthermia, edited by Gordon, R.A., Britt, B.A., Kalow, W., C.C. Thomas, Springfield, III. 1973.
5. Mourant, A.E.: Associations between hereditary blood factors and diseases. Bull. WHO 49: 93-101. 1973.
6. Mourant, A.E., Kopéc, A.C. and Domaniewska-Sobczak, K. Blood Groups and Diseases. Oxford University Press, Oxford, 1978.
7. Oh, J.H., MacLean, L.D.: Diseases associated with specific HL-A antigens. Can. Med. Assoc. J., 112: 1315-1318, 1975.
8. Mann, D.L. and Murray, C. HL-A Alloantigens: Disease Association and Biologic Significance. Seminars in Haematology, 16: 293, 1979.
9. Hayflick, L.: Current theories of biological aging. Fed. Proc. 34: 9, 1975.

10. Goldstein, S., Niewiarowski, S., Singal, D.P.: Pathological implications of cell aging in vitro. Fed. Proc. 34: 56-63, 1975.
11. Cinader, B. and Nakano, K. Age Dependent Changes in Tolerance Inducibility. In: Immunology 1978, pp. 17-31. Proc. of Fourth Eur. Immunol. Meeting, Budapest, 12-14 April 1978. Gergely, J., Medgyesi, G.A. and Hollan, S.R., Editors. Akademiai Kiado Publishing House, Budapest.
12. Hosono, M. and Cinader, B. Resistance to tolerance-induction and age-dependent cellular changes in SJL mice. International Archives of Allergy and Appl. Immunology. 54: 289-299, 1977.
13. Fujiwara, M. and Cinader, B. Cellular Aspects of Tolerance. IV. Strain Variations of Tolerance Inducibility. Cellular Immunology, 12: 11-29, 1974.
14. Roder, J.C., Duwe, A.K., Bell, D.A. and Singhal, S.K., Immunological Senescence. I. The role of suppressor cells. Immunology, 35: 837-847, 1978.
15. Callard, R.E., De St. Groth, B.F., Basten, A. and McKenzie, I.F.C., Immune function in aged mice. V. Role of suppressor cells. J. Immunol. 124: 52-58, 1980.
16. Szewczuk, M.R. and Campbell, R.J. Loss of Immune Competence with age might be due to Auto-anti-idiotypic antibody regulation, Nature (in press) 1980.
17. Goidl, E.A., Schrater, A.F., Siskind, G.W. and Thorbecke, G.J. Production of Auto-anti-idiotypic

Antibody during the normal immune response to TNP-Ficoll. II. Hapten-reversible inhibition of anti-TNP plaque forming cell by immune serum as an assay for auto-anti-idiotypic antibody. *Journal of Experimental Medicine*, 150: 154-165, 1979.

18. Schrater, A.F., Goidl, E.A., Thorbecke, G.J. and Siskind, G.W. Production of Auto-anti-idiotypic Antibody during the normal immune response to TNP-Ficoll. I. Occurrence in AKR/J and BALB/C mice of hapten augmentable anti-TNP plaque forming cells and their accelerated appearance in recipients of immune spleen cells. *Journal of Experimental Medicine*, 150: 138-153, 1979.

19. Szewczuk, M.R. Differential distribution of age associated immunoregulation in various lymphatic sites. *Abstract Federation Proceedings*, 39: 1025, 1980.

20. Hosono, M., Cinader, B. and Ellerson, J. Tolerance induction as an index of age-related changes. *Imm. Comm.* 6: 239-257, 1977.

21. Nakano, K. and Cinader, B. A strain survey of age dependent changes in antigen elimination, antibody formation and tolerance. *J. Immunogenetics*, 7: 183-190, 1980.

22. Nakano, K., Cinader, B. and Sabiston, B.H. Age dependent changes in tolerizability with gamma globulin in the Biozzi high and low responder lines of mice. *European J. Immunol.* 9: 1014-1017, 1980.

23. Fujiwara, M. and Cinader, B. Cellular Aspects of Tolerance. V. The In Vivo Co-operative Role of

Accessory and Thymus Derived Cells in Responsiveness and Unresponsiveness of SJL mice. *Cellular Immunology*, 12: 194-204, 1974.

24. Hosono, M. and Cinader, B. Resistance to tolerance-induction and age dependent cellular changes in SJL mice. *Proceedings of the Japanese Society for Immunology*. 7: 265-266, 1977.

25. Nakano, K. and Cinader, B. Accelerated age dependent decline in the T suppressor capacity of SJL mice. *European J. Immunol.*, 10, 309, 1980.

26. Nakano, K. and Cinader, B. Suppressor cells and their precursors in A/J mice; tolerant to heterologous gamma globulin. *Scandinavian J. Immunol.* 11: 291-302, 1980.

27. Cinader, B., Paraskevas, F. and Koh, S. An age dependent decline in suppressor activity of SJL mice. *Cellular Immunol.*, 40: 445-450, 1978.

28. Lee, S.T. and Paraskevas, F. Soluble Factors in Immune Sera of Mice. I. Specific and Non-specific Suppressive Activity. *Clin. Exp. Immunol.*, 24: 177-195, 1976.

29. Lee, S.T. and Paraskevas, F. Soluble Factors in Mouse Immune Sera. III. Origin, Nature and Target of Small Molecular Weight Suppressive Factors isolated from Serum during Primary Response. *Cellular Immunol.*, 32: 171-182, 1977.

30. Cunningham, A.J. and Szenberg, A. Further Improvement in the Plaque Technique for detecting Single

Antibody-forming Cells. Immunology, 14: 599-600, 1968.

31. Fujiwara, M. and Cinader, B. Cellular Aspects of Tolerance. VII. Inheritance of the Resistance to Tolerance Induction. Cellular Immunology, 12: 214-229, 1974.

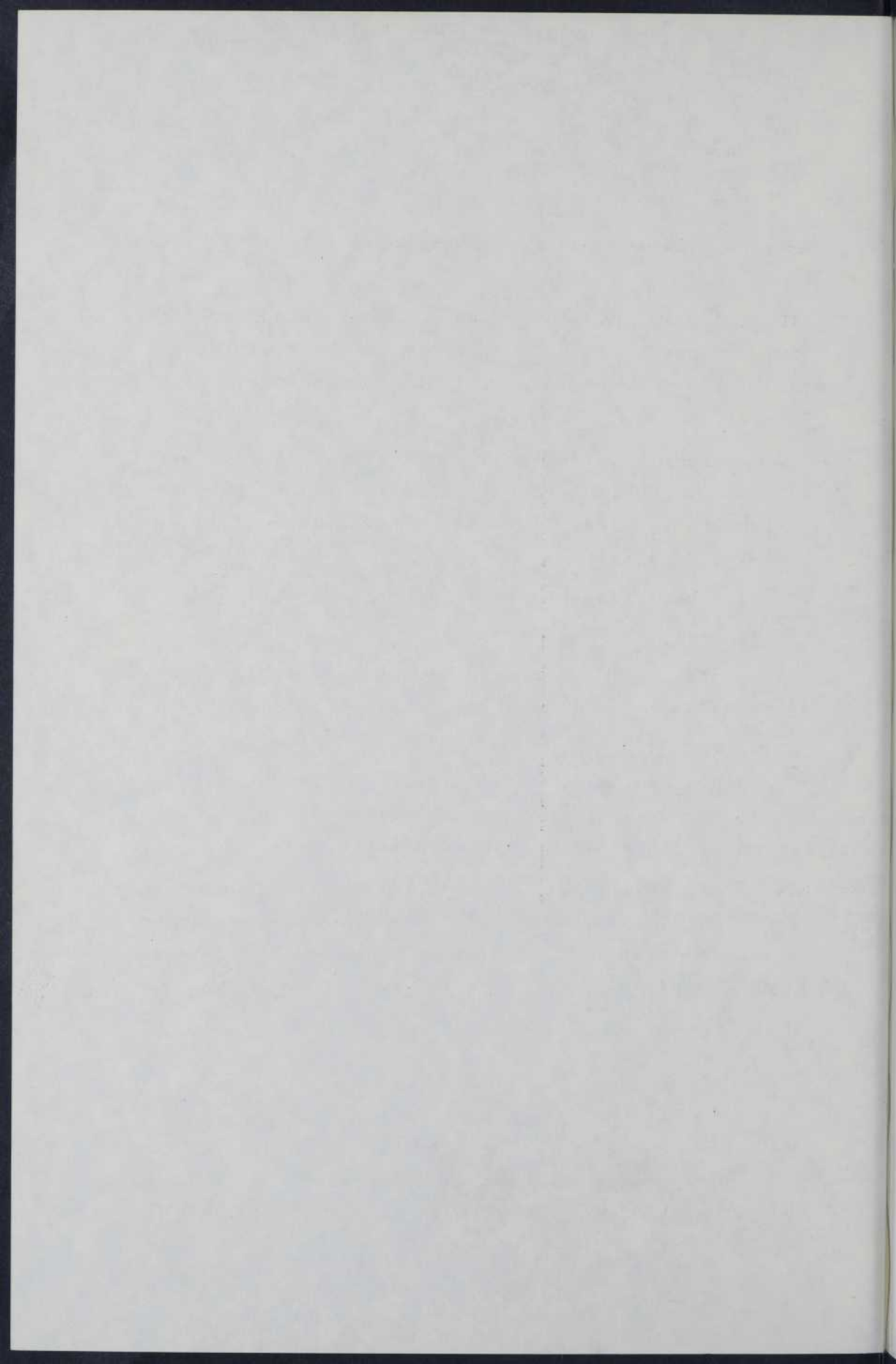
32. Azar, M.M., Ranges, G.E., Yunis, E.J. and Clark, C. Genetic Control of tolerance induction to human y-globulin in mice. Journal of Immunology, 121, 1251-1256, 1978.

33. Sir MacFarlane Burnet, Endurance of Life, Melbourne Univ. Press, 1978.

34. Mintz, B. Gene control of mammalian pigmentary differentiation. I. Clonal origin of melanocytes. Proc. Natl Acad Sci USA 58: 344, 1967.

35. Mintz, B. Hermaphroditism, sex chromosomal mosaicism and germ cell selection in allophenic mice. J. Anim Sci 27 (supp. I): 51, 1968.

36. Mintz, B., Palm, J. Gene control of hematopoiesis. I. Erythrocyte mosaicism and permanent immunological tolerance in allophenic mice. J. Exp. Med. 129: 1013, 1969.



LE VIEILLISSEMENT: REFLÈTE-T-IL UNE LIMITATION
INHÉRENTE DE L'ORGANISME DANS SA CAPACITE DE
TRAITEMENT DE L'INFORMATION?

M.R.V. Murthy, Département de biochimie, Faculté de médecine, Université Laval, Québec.

A. VIEILLISSEMENT, UN PHÉNOMÈNE BIOLOGIQUE

1. Paramètres biologiques moléculaires du développement

Il existe de nombreuses preuves montrant que le développement des eucaryotes se fait par l'intermédiaire de l'expression contrôlée et différentielle des gènes. Du point de vue des mécanismes moléculaires, un tel contrôle peut s'exercer en influençant une ou plusieurs étapes critiques soit avant soit après la transcription du message génétique ou les deux à la fois. La régulation de la transcription peut être déclenchée par une série de changements qualitatifs et quantitatifs des composants de la chromatine et par une interaction ordonnée entre eux. Parmi les événements post-transcriptionnels qui sembleraient pouvoir servir aux fins de la régulation, il faut mentionner des phénomènes tels que la maturation des

transcripts du RNA (ex.: modification, coupure, attachement du poly-A au mRNA, etc.), la sélection des RNA au niveau nucléaire, l'activation ou l'inactivation des RNA par la formation de complexes avec des protéines spécifiques, le contrôle de leur demi-vie par dégradation sélective, la sélection et la modulation de l'efficacité de traduction par l'appareil ribosomique, la libération des chaînes polypeptidiques des ribosomes, la modification et/ou l'association post-traductionnelle des sous-unités polypeptidiques pour former des protéines fonctionnelles, la mise en réserve et la dégradation différentielle des protéines nouvellement synthétisées etc. De plus, les diverses interactions nucléo-cytoplasmiques qui sont activées par les hormones, les mécanismes de rétro-contrôle et les stimuli de l'environnement contribuent tous à la variété et à la complexité des moyens dont dispose le génome pour s'exprimer et pour répondre aux conditions physiologiques de façon précise et ordonnée (pour revue, voir référence 1). On a observé, en effet, qu'une ou plusieurs de ces réactions changent au cours du développement des eucaryotes en général ainsi que dans le système nerveux (pour revue, voir référence 2).

2. Paramètres biologiques moléculaires du vieillissement

On a proposé de nombreuses théories pour expliquer comment le vieillissement se produit et quels sont les facteurs qui déterminent la longévité d'une espèce animale donnée. Un groupe de théories se base

sur l'idée que le vieillissement est une manifestation nécessaire des processus génétiques fondamentaux, commençant avec le zygote et continuant à s'exprimer la vie durant. Selon elles, le vieillissement est le résultat d'une séquence d'événements chronologiquement ordonnés et génétiquement contrôlés, similaires aux phénomènes de différenciation et de développement. Le vieillissement et la mort, même s'ils sont négatifs pour l'organisme individuel, pourraient présument avoir une importance positive dans le contexte plus global de l'espèce, en limitant la longévité à un seuil prédéterminé, assurant ainsi un roulement régulier dans la population et permettant un ajustement continu à l'environnement par les forces évolutives.

Un autre groupe de théories, même si elles reconnaissent le rôle des mécanismes génétiques de contrôle de la longévité des différentes espèces, postulent que les facteurs environnants sont, au moins en partie, responsables de l'initiation et de l'accélération des syndromes de dégénérescence accompagnant le vieillissement. A la base du vieillissement cellulaire et de la mort, on présume qu'il y a une réduction de la spécificité et une désorganisation des macromolécules biologiques dues aux attaques répétées de l'environnement. La variété des agents environnants, des modèles et des sites d'action intracellulaires proposés pour le vieillissement atteste de la complexité du problème et de l'hétérogénéité des facteurs environnants.

Tous les modèles du vieillissement basés sur des considérations de biologie moléculaire impliquent la responsabilité de déviations structurales des composants de l'expression génétique dans le processus de vieillissement; ces déviations sont introduites et elles se propagent dans un ordre inévitable comme partie du programme de développement, ou au hasard comme résultats d'impacts physicochimiques sur l'organisme, ou des deux façons. La sévérité des conséquences pourrait dépendre de plusieurs facteurs y compris la capacité de l'organisme de corriger les défauts avec des moyens tels que la sélection, la réparation, la redondance, ou par la propriété de plasticité comme c'est le cas dans le système nerveux. Les divers facteurs pourraient opérer aux niveaux cellulaire, sous-cellulaire ou moléculaire.

3. Rôle du système nerveux dans le processus de vieillissement

La plupart des spéculations sur le vieillissement sont basées sur les observations faites chez des organismes unicellulaires, des cellules en culture ou des systèmes relativement primitifs tels les nématodes, les insectes, etc., car ils constituent des modèles simples pour l'expérimentation et l'interprétation des résultats. Très récemment, les gérontologues se sont intéressés à des structures hautement spécialisées comme le système nerveux. L'étude de ce tissu, en tant que composant du processus de vieillissement, se justifie pour plusieurs

raisons. Les neurones matures sont des cellules post-mitotiques hautement différenciées et toute perte de leur fonction due à des dommages structuraux, ou au vieillissement ne peut être corrigée par un réapprovisionnement mitotique. Par conséquent, tout défaut ou lésion dans les caractéristiques morphologiques ou biochimiques, dû à l'âge, pourra être plus directement relié à la sénescence. Parmi les cellules post-mitotiques, les neurones sont parmi les cellules fixes à plus longue durée de vie et peuvent ainsi permettre d'établir des corrélations entre la longévité cellulaire et les processus de différenciation. Quoiqu'aucune différence fondamentale n'ait été démontrée dans l'architecture moléculaire des cerveaux de différentes espèces, on a montré l'existence d'une corrélation significative entre la grosseur du cerveau et la durée de la vie au cours de la phylogénie. La dégénérescence progressive de la fonction nerveuse au cours du vieillissement a des corrélations psychologiques et psycho-physiologiques qui, au moins chez l'humain, comptent parmi les conséquences les plus profondes du vieillissement.

Le système nerveux agit comme coordinateur entre les différents tissus de l'organisme et entre l'organisme entier et l'environnement, soit directement par le réseau des fibres nerveuses soit par l'intermédiaire du système endocrinien. Il régularise ainsi, non seulement la réponse immédiate de ces tissus à toute information, mais aussi leur développement continu. Il a été suggéré que le

cerveau pourrait contenir des "pace makers" spécifiques pour le vieillissement; ces derniers agiraient par l'intermédiaire d'une série d'événements neuro-hormonaux dans lesquels seraient impliqués les neurotransmetteurs tels que la sérotonine, la dopamine et la noradrénaline.

Les interactions extrêmement compliquées, mais ordonnées, entre les cellules du système nerveux central, sa diversité fonctionnelle, même chez les animaux primitifs, et le contrôle que le système nerveux exerce sur tous les processus physiologiques sembleraient indiquer que le vieillissement pourrait être précédé de changements étiologiques dans ce tissu.

4. Changements liés à l'âge dans le système nerveux

Le tableau I dresse une liste de certains composants de la transcription et de la traduction du message génétique au niveau desquels on a démontré des changements au cours du vieillissement (pour revue, voir référence 3).

Dans le système nerveux, les changements liés à l'âge affectent certaines propriétés cellulaires et moléculaires, par exemple: perte de cellules nerveuses spécifiques, changements dans les proportions du DNA, du RNA, histones et protéines non-histones dans le noyau, perte d'activité des enzymes de modification des protéines telle que la méthylase des histones dans le noyau, baisse d'activité des gènes et déclin progressif dans la transcription, accroissement des régions à simple hélice dans le DNA et diminution du pouvoir de réparation

du DNA formation de circonvolutions et de structures "cross-linked" dans le DNA, changements dans le dosage des gènes et redondance des gènes pour les RNA ribosomiques et messagers, baisse de capacité pour la synthèse protéique in vivo et in vitro, baisse d'interactions entre le mRNA et les ribosomes et entre les ribosomes et la membrane du réticulum endoplasmique, accumulation de facteurs d'inhibition dans les compartiments de la membrane, baisse dans le pouvoir des sous-unités ribosomiques 40S et 60S d'interagir et de participer à la synthèse protéique et changements qualitatifs et quantitatifs dans les tRNA et les enzymes impliquées dans la modification et la fonction du tRNA.

Des changements liés à l'âge ont également été observés dans la synthèse des protéines spécifiques du cerveau tel la S-100, la 14-3-2 et les glycoprotéines. De plus, on a montré que la lipofuschine, pigment soudanophile composé de lipides et de protéines, s'accumule de façon progressive et caractéristique dans les neurones au cours du vieillissement. La présence d'anticorps spécifiques du cerveau a été démontrée dans le sérum de souris âgées, résultant probablement de changements dans le système immunitaire et dans l'initiation de réactions autoimmunes.

On a également rapporté des changements structuraux et fonctionnels des mitochondries et des régions synaptiques au cours de la croissance post-natale et du vieillissement.

B. QUELQUES RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX RÉCENTS

Un des plus intéressants systèmes à étudier du point de vue des inter-relations structurales et fonctionnelles au cours du développement et du vieillissement, est l'appareil cytoplasmique de traduction comprenant les polysomes libres et les polysomes liés à la membrane. Un trait extrêmement caractéristique de la morphologie des neurones, à l'examen au microscope électronique, est la substance de Nissl qui représente des particules ribonucléo-protéiques granulaires attachées au réticulum endoplasmique. Les rôles des polysomes libres et liés à la membrane dans le fonctionnement du cerveau sont encore inconnus. On a montré que certaines protéines spécifiques du cerveau, telles la S-100 et 14-3-2, sont synthétisées principalement par les polysomes libres. Aucune protéine cérébrale spécifique semble être formée uniquement par les polysomes liés à la membrane. Cependant, le fait qu'il existe un transport continu de matériaux du perikaryon neuronal, sur des distances relativement longues, jusqu'aux régions périphériques par le flux axoplasmique, permet de suggérer que la synthèse et la distribution de certaines protéines pourraient être synchronisées et facilitées par le réseau membranaire auquel sont attachés les ribosomes.

Des travaux antérieurs, effectués dans notre laboratoire, ont montré que dans le cerveau du rat, les caractéristiques métaboliques des polysomes libres et des polysomes liés à la membrane subissent

des changements significatifs comme conséquences de la maturation, du vieillissement et de la déprivation sensorielle (3,4). Ceci suggère que les interactions entre les ribosomes, le mRNA, les autres facteurs de traduction et la membrane du réticulum endoplasmique pourraient être une étape critique dans l'expression génétique dans différentes conditions physiologiques. Dans ce contexte, nous présentons quelques résultats expérimentaux récents montrant les effets de l'âge, sur l'intégrité et l'activité de cette structure sous-cellulaire.

Toutes les expériences de cette étude ont été faites en utilisant les cortex de rats mâles Sprague-Dawley âgés de 3 mois (animaux matures) ou de 2 ans (animaux âgés).

1. Caractéristiques des ribosomes libres et des ribosomes liés à la membrane

Le tableau II montre certaines caractéristiques biochimiques des polysomes libres et des polysomes liés à la membrane isolés de cerveaux de rats matures et âgés. Les polysomes ont été isolés et fractionnés par centrifugation en gradient de densité. La capacité des polysomes pour la synthèse protéique a été déterminée in vitro par incubation dans un milieu réactionnel optimal et en utilisant la L-leucine- ^{14}C comme marqueur. Leur capacité d'initier la synthèse protéique in vitro a été mesurée à l'aide de l'acide aurine tricarboxylique, une substance qui inhibe spécifiquement l'étape d'initiation lorsqu'elle est

ajoutée à faible concentration. On peut voir dans ce tableau que le rendement en polysomes totaux est 30% plus élevé dans le cerveau du rat mature en comparaison avec le tissu de l'animal âgé. Dans le cerveau mature, une proportion plus élevée de ces polysomes est liée à la membrane par rapport à l'animal âgé. Dans les deux groupes de polysomes, libres et liés à la membrane, la proportion de polysomes lourds est supérieure chez l'animal mature, indiquant une susceptibilité à la dégradation du mRNA chez l'animal âgé. Les polysomes du cortex mature possèdent aussi une plus grande capacité de synthèse polypeptidique in vitro et une plus grande efficacité pour l'initiation de novo de la synthèse protéique. Lorsqu'ils sont incubés en présence d'un RNA messenger artificiel, tel le poly-U, les polysomes de l'animal âgé montrent une plus grande réponse, indiquant ainsi qu'ils contiennent une plus grande proportion de ribosomes monomériques inactifs, en comparaison avec les polysomes de l'animal mature. Dans toutes ces expériences la faible réponse des polysomes du tissu âgé est plus marquée chez les polysomes dérivés de la fraction membranaire. Ces résultats permettent de croire que la préparation provenant des cortex cérébraux d'animaux âgés contient un mRNA partiellement dégradé ou facilement susceptible à la dégradation et que l'interaction entre ribosomes, mRNA et la membrane du réticulum endoplasmique est devenue, en quelque sorte, déficiente.

2. Interaction des ribosomes avec la membrane du réticulum endoplasmique

Afin d'examiner le degré d'interaction entre les polysomes et le réticulum endoplasmique, les polysomes liés à la membrane sont isolés par centrifugation différentielle sur gradient de sucrose. Les ribosomes sont séparés de la membrane par un traitement doux avec des agents chélateurs ou par traitement au désoxycholate. Les deux organelles provenant des cortex de rats matures ou de rats âgés, sont ensuite incubés dans les conditions optimales en mélanges homologues ou hétérologues. Les résultats indiqués dans le tableau III montrent que l'interaction entre ribosomes et membranes de l'animal âgé, représente seulement 50% de l'interaction ribosome-membrane de l'animal mature. En substituant les ribosomes matures par des ribosomes âgés, la détérioration est encore très marquée. Une forte détérioration est également observée en remplaçant les membranes matures par des membranes âgées. Ceci montre que les ribosomes ainsi que les membranes du cortex cérébral âgé ont une capacité d'interaction inférieure à celle des préparations provenant de l'animal mature. Les résultats de l'incorporation d'acides aminés montrent également que la présence de la membrane du réticulum endoplasmique homologue augmente la capacité des ribosomes matures pour la synthèse protéique tandis que pour les ribosomes âgés, cette dernière est inhibée par la membrane. Ceci permet de suggérer que la membrane du réticulum

endoplasmique est défectueuse chez l'animal âgé et est, du moins en partie, responsable de la dégradation des ribosomes qui lui sont attachés, probablement par action de ribonucléases libérés à la surface.

3. Présence de RNase endogène dans la membrane du réticulum endoplasmique

Afin de vérifier l'activité nucléolique de la membrane, des polysomes libres et liés à la membrane provenant d'animaux matures ou âgés sont incubés à 37°C pendant 30 min. et l'effet sur la taille des polysomes est déterminé par centrifugation en gradient de sucrose. D'après le tableau IV, on voit que contrairement aux autres préparations, la proportion d'agrégats lourds dans les polysomes liés à la membrane du tissu âgé, est réduite de 50% après incubation tandis que ni les polysomes libres du tissu âgé ni les polysomes libres ou liés du tissu mature ne sont grandement affectés. Ceci suggère que les ribonucléases latentes dans la membrane qui ne sont pas accessibles pour agir sur le mRNA du cortex cérébral mature peuvent être libérées si la membrane perd son intégrité structurale comme dans le cas du vieillissement.

Les études décrites montrent, qu'en plus des autres étapes de l'expression génétique, les composantes du système de la synthèse protéique sont endommagées dans le cortex cérébral de l'animal âgé. Des interactions entre les sous-unités ribosomiques, le mRNA et la membrane du réticulum endoplasmique ne

sont pas aussi efficaces que chez l'animal mature.

C. DISCUSSION

1. Circulation et traitement de l'information biologique

La cytoarchitecture d'un organisme multicellulaire possède une configuration moléculaire extrêmement complexe dont les coordonnées spatiales sont suffisamment stables pour assurer le maintien et la survie de l'organisme mais dont la flexibilité dynamique dans le temps est suffisante pour permettre à l'organisme de se développer et de répondre aux changements des situations externes et internes. Chaque cellule consiste en un grand nombre de sous-unités possédant un degré limité d'autonomie sur les plans structural et biochimique, mais dont la régulation dépend de mécanismes extérieurs lorsqu'entrent en jeu les intérêts de la cellule en entier. La complexité de cette organisation augmente fortement lorsqu'on passe d'un organisme unicellulaire à un organisme multicellulaire. Une telle structure moléculaire complexe ne peut évidemment pas survivre en tant qu'entité dynamique sans l'existence d'un réseau vaste et précis d'information entre toutes les régions d'un organisme et entre l'organisme et son environnement.

On peut affirmer que l'évolution des structures physiologiques est en réalité une évolution de la circulation et du traitement de l'information.

Parallèlement à l'augmentation du nombre et de la diversité des cellules au cours de l'évolution, augmente aussi la diversité des mécanismes nécessaires à la communication interne et externe des signaux. Le système nerveux est un des moyens les plus récents et les plus sophistiqués mis au point par l'évolution pour rassembler, traiter et emmagasiner l'information provenant de l'intérieur et de l'extérieur de l'organisme. Cependant, ce système dernier venu, se surimpose aux autres mécanismes plus fondamentaux qui ont été mis en place depuis le début de l'évolution moléculaire et cellulaire, chacun remplissant certains besoins spécifiques de l'organisme. Ils doivent tous agir de façon synchronisée afin d'effectuer dans le bon ordre les divers processus de différenciation et de développement. Ces mécanismes doivent permettre la circulation de l'information de telle sorte qu'une interaction précise et adéquate puisse avoir lieu: a) entre les molécules biologiques, b) entre les structures sous-cellulaires à l'intérieur de la cellule, c) entre les cellules d'un tissu, d) entre les différents tissus et e) entre l'organisme entier et son environnement.

L'organisme répond continuellement au flot d'informations et essaie de faire face, de s'ajuster et de bénéficier de chaque changement de situation, de deux façons: la première en aménageant les ressources physiologiques et biochimiques déjà disponibles, la seconde en introduisant de nouvelles entités structurales et fonctionnelles. Le premier mécanisme permet

à l'organisme d'assurer son état d'homéostasie envers tout changement tandis qu'avec la seconde il peut développer et établir des mécanismes pour une survie à long terme. Cette dernière méthode est probablement la plus importante du point de vue du vieillissement et de la longévité.

La création de nouvelles structures nécessite une nouvelle synthèse d'acides nucléiques et de protéines. Ceci soulève la question de savoir comment l'information peut être reçue et mise en circulation dans l'appareil génétique afin que la cellule puisse produire les bonnes molécules dans les bonnes proportions au bon moment pour assembler l'unité fonctionnelle requise. Nous suggérons un modèle pour le transfert de l'information qui permettrait une réponse synchronisée des éléments éloignés dans le réseau chromosomique.

2. Un modèle pour la circulation et le traitement de l'information dans l'appareil génétique

Le modèle est basé sur l'existence de petites molécules transporteurs de l'information, qui pourraient diffuser facilement et transmettre les signaux entre les différents sites de transcription. Cette idée a déjà été suggérée il y a quelques années par Britten & Davidson (5) comme un mécanisme pour la régulation des gènes chez les eucaryotes. Selon ces auteurs, des opérons spéciaux non informationnels possédant un gène "senseur" sensible aux agents inducteurs et un ou plusieurs gènes intégrateurs, pourraient

produire un certain nombre de molécules "activateurs" qui contrôleraient simultanément toute une série de gènes. Selon ce schéma, la molécule "activateur" pourrait être produite par transcription des gènes intégrateurs. Bien qu'il s'agisse d'une hypothèse très attrayante, elle ne peut s'appliquer facilement que pour des systèmes enzymatiques dont la synthèse et la fonction seraient hautement coordonnées pour toutes les conditions physiologiques. Elle ne permet pas une flexibilité suffisante pour la régulation par rétro-contrôle des molécules dont la synthèse est contrôlée par l'unité "senseur-intégrateur".

3. Organisation du modèle

Les parties essentielles de l'organisation de ce modèle sont illustrées dans la Figure I. Il se compose comme suit:

- a) L'information génétique est contenue dans des opérons, chacun comprenant trois parties: la région contrôlée (C), la région "intégrateur" (I) et la région codée arrangées séquentiellement de l'extrémité 5' à l'extrémité 3' de l'opéron.
- b) La région contrôle consiste en un site promoteur (P) à l'extrémité 5' reconnue par la RNA polymérase et un ou plusieurs sites opérateurs (O_1 à O_n) reconnaissables par les molécules "activateurs" provenant d'un autre opéron ou par des dérégresseurs indépendants. Il est possible de concevoir également que les sites opérateurs soient sensibles à des signaux

chimiques ou physico-chimiques provenant de l'extérieur de l'appareil génétique, par exemple, du cytoplasme de la cellule ou des cellules plus éloignées ou encore de l'environnement externe. La région "intégrateur" contient un ou plusieurs sites (I_1 à I_n) qui, après transcription et maturation, donnent naissance aux molécules activateurs. Ces dernières molécules ne possèdent aucun effet sur l'opéron de départ, mais peuvent déclencher la transcription d'un autre opéron ayant des sites opérateurs capables de reconnaître l'une ou plusieurs d'entre elles. La région codée correspond à la séquence de DNA complémentaire à un RNA messager, un RNA de transfert ou un RNA ribosomique.

(c) La longueur des régions contrôle et "intégrateur" est fonction de l'importance de l'opéron à l'intérieur du réseau génétique, c'est-à-dire du nombre d'entrées et de sorties d'informations dont il sera l'intermédiaire pendant la vie de la cellule.

(d) Les sites dans la région "intégrateur" sont disposés de telle sorte qu'il existe un gradient de la direction 5' vers la direction 3' des sites généraux vers les sites uniques. Ainsi, les sites en position 5' de la région "intégrateur" peuvent envoyer les signaux qui circulent généralement dans le génome tandis que les sites en 3' transmettent un signal plus restreint et d'une importance spéciale pour l'opéron lui-même. Ce système permettrait ainsi la synthèse des substances communes et de certaines autres spécifiquement nécessaires pour l'expression finale de l'opéron. Comme exemple, supposons que la

synthèse d'une protéine spéciale requiert plusieurs aminoacyl-tRNA dont certains sont nécessaires également pour d'autres protéines. Selon l'organisation de la région "intégrateur", les sites proximaux de la région contrôle dans l'opéron de la protéine en question, enverraient des signaux aux gènes des tRNA pour les tRNA communs. Les sites en position distale de la région contrôle enverraient des signaux aux gènes des tRNA pour les acides aminés spéciaux. Une telle organisation empêcherait l'accumulation de substances spéciales à l'opéron si, pour une raison ou pour une autre, la transcription est avortée après que la RNA polymérase ait parcouru une courte distance. De même, le gradient dans la région contrôle pourrait exister de la région proximale vers la région distale du promoteur, du signal le plus commun vers le signal le plus particulier pour l'opéron.

4. Aspects fonctionnels du modèle

a) Selon ce modèle (Figure 1), la transcription d'un opéron débute avec la liaison de la RNA polymérase au site promoteur suivie de la transcription de la région contrôle, pourvu que tous les sites "activateurs" soient activés. Si la région "intégrateur" et la région codée ne sont pas interrompues par d'autres contrôles, elles sont transcrites dans cet ordre de sorte que, si besoin est, les molécules "activateurs" synthétisées sur la région "intégrateur" puissent rapidement transmettre

ce signal à d'autres opérons du réseau avant même que l'opéron soit décodé complètement.

(b) Dans le cas d'un opéron ayant un code mRNA, le hnRNA subit des modifications et des coupures pour donner naissance au mRNA et à un certain nombre de fragments d'oligonucléotides dérivés des régions contrôles et intégrateurs. Les fragments provenant de la région contrôle sont probablement dégradés peu après tandis que les oligonucléotides de la région intégrateur sont modifiés soit par des changements structuraux au niveau des nucléosides, soit par attachement à des protéines spécifiques, etc. Les coupures et les modifications seraient sous le contrôle d'enzymes spécifiques.

(c) Les molécules activateurs, ainsi formées, peuvent reconnaître un des opérateurs dans un autre opéron, par exemple, ceux codant pour un tRNA, une ligase ou une ou plusieurs enzymes impliquées dans la maturation des tRNA, induisant de cette façon la synthèse de ces macromolécules.

(d) Les molécules activateurs résultant de cette seconde série de transcription envoient des signaux à d'autres opérons plus éloignés et prennent part au mécanisme de rétrocontrôle à l'intérieur du réseau.

(e) Dès que les molécules activateurs ont induit la transcription de l'opéron visé, elles sont détruites par les nucléases appropriées.

5. Support expérimental pour le modèle

Parmi toutes les informations recueillies récemment sur les divers aspects de la transcription et de la maturation du RNA, plusieurs points permettent d'appuyer le modèle proposé (6,7):

(a) La taille du hnRNA, précurseur du mRNA, est supérieure à la taille du RNA mature.

(b) Chaque molécule de hnRNA ne contient qu'une séquence de mRNA identifiable.

(c) L'existence dans le hnRNA de boucles en épingle à cheveux, de régions à double hélice ou hautement répétitives, permet de penser que ces structures servent de signaux pour la coupure sélective de ces molécules par des nucléases. Ceci implique que les oligonucléotides coupés ne sont pas nécessairement un sous-produit de déchet mais qu'ils peuvent avoir une fonction utile.

(d) Le mécanisme de coupure est très rapide, permettant ainsi aux produits d'être disponibles rapidement n'importe où dans le noyau, si cela est nécessaire. On sait que la transformation du rRNA des procaryotes a lieu avant même que la transcription soit complète et ceci pourrait également s'appliquer à certains mRNA.

(e) Non seulement le mRNA, mais tous les autres RNA, y compris le tRNA et le rRNA, sont synthétisés sous forme de larges molécules "précurseurs" qui sont ensuite coupées et modifiées pour donner naissance au produit final.

6. Commentaires et conclusions

Chez l'animal très évolué, on peut penser que l'appareil génétique est ouvert non seulement aux signaux qui sont programmés à priori et aboutissant aux fonctions hautement synchronisées et ordonnées telles la différenciation et le développement, mais aussi à des signaux non programmés que l'organisme continue à recevoir de l'intérieur et de l'extérieur même après avoir atteint sa pleine maturité. Comme exemples d'une telle capacité que les animaux supérieurs ont acquis au cours de l'évolution, on peut citer les transformations plastiques dans le cerveau pour répondre à l'information sensorielle et la défense immunologique pour répondre aux antigènes chimiques. En dépit de ces possibilités limitées, le système génétique semble être principalement accessible aux signaux programmés internes mais ne semble pas avoir encore développé des moyens satisfaisants pour recevoir des informations non programmées au cours de sa vie post-adulte ni pour les traiter de façon ordonnée et synchronisée. Ceci pourrait être la raison de la perte graduelle de l'intégrité de l'organisme et de la détérioration structurale et fonctionnelle qui caractérisent le vieillissement. A ce propos, il serait intéressant d'étudier les types et les fonctions d'oligonucléotides produits pendant la formation de divers acides nucléiques à partir de leurs précurseurs et d'examiner tous changements quantitatifs et qualitatifs dans ces molécules au cours du vieillissement.

Tableau I

Quelques exemples de facteurs au niveau de la biologie moléculaire
qui sont étudiés intensivement en relation avec le phénomène du
vieillissement du cerveau

Transcription

1. DNA et constituants de la chromatine
2. Interaction DNA-RNA-protéines
3. Activité biologique de la chromatine
4. DNA à une seule chaîne ou avec une structure anormale ou endommagée
5. DNA à réassociation rapide
6. Dosage de gènes

Traduction

7. Synthèse protéique in vivo et in vitro
8. Interactions entre mRNA, ribosomes et la membrane du réticulum endoplasmique
9. Sous-unités ribosomiques et les facteurs d'initiation
10. tRNA isoaccepteurs
11. Changements qualitatifs et quantitatifs des protéines
12. Production de protéines fautives

Tableau II

Caractéristiques des ribosomes libres et liés aux
membranes du cortex cérébral de rat

Ribosomes	Mature (3 mois)		Agé (2 ans)	
	libres (1)	membranaires (m)	libres (1)	membranaires (m)
Rendement total des polysomes (mg/g tissu frais)		1.32		1.01
Rapport polysomique (m/l)		2.4 ± 0.3		3.5 ± 0.5
Rapport polysomique (lourd/léger) ¹	4.2 ± 0.6	4.8 ± 0.5	2.8 ± 0.5	3.1 ± 0.4
Capacité de synthèse protéique <u>in vitro</u> (cpm/mg ribosome/30 min) ²	8560	9875	6210	5326
Capacité d'initiation de la synthèse protéique <u>in vitro</u> (%) ³	73	75	62	48
Rapport (polyphé./protéine) en présence de poly-U ⁴	4.9	4.5	6.3	7.2

1. Polysomes légers : jusqu'à 4 ribosomes; polysomes lourds : 5 ribosomes et plus.

2. Incorporation de leucine-¹⁴C dans les protéines totales.

3. Pourcentage d'inhibition par l'acide aurine tricarboxylique (2×10^{-5} M)

4. Rapport de la leucine-¹⁴C incorporée dans la polyphénylalanine et dans les protéines par les polysomes en présence de poly-U.

Tableau III

Interaction in vitro des ribosomes avec la membrane du réticulum
endoplasmique du cortex cérébral de rat

<u>Membrane</u>	<u>Ribosomes</u>	<u>Attachement des ribosomes</u> <u>à la membrane¹</u> (cpm/mg membrane protéique)	<u>Synthèse protéique</u> <u>in vitro en absence</u> <u>de membrane²</u> (cpm/mg ribosome)	<u>Synthèse protéique</u> <u>in vitro en présence</u> <u>de membrane</u> (cpm/mg ribosomes)
Mature	Mature	1852	7685	9252
Agé	Agé	986	5812	4025
Mature	Agé	1365	-	-
Agé	Mature	1172	-	-

1. Les ribosomes étaient ceux originalement liés à la membrane et ont été préalablement marqués avec ³²P.

2. Un traitement au désoxycholate a été utilisé pour séparer les ribosomes de la membrane. La leucine-¹⁴C était le marqueur pour la biosynthèse protéique.

Tableau IV

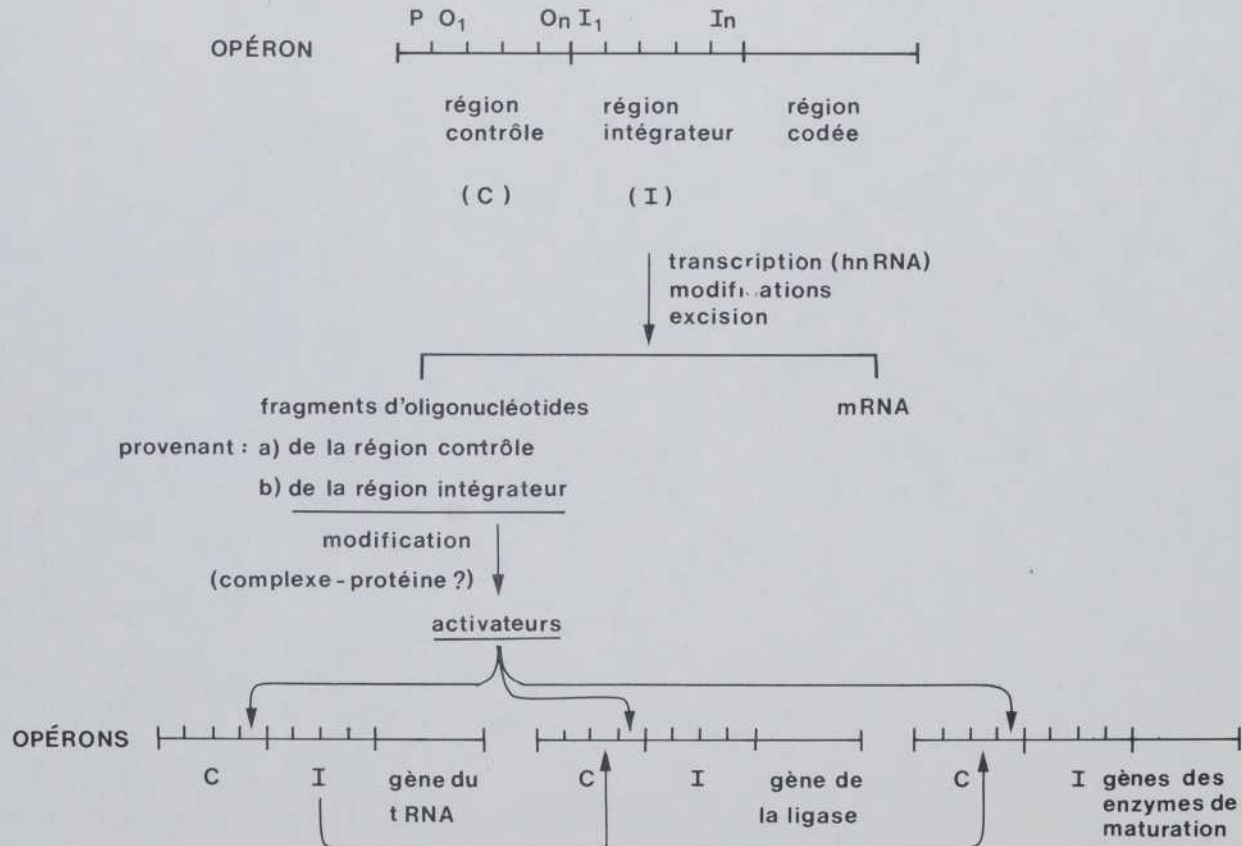
Dégradation des polysomes du cortex cérébral
par la RNase endogène

<u>Polysomes</u>	<u>Mature</u> (Rapport polysomes lourds/légers) ¹	<u>Agé</u> ¹
Ribosomes libres (aucune incubation)	4.3	3.4
Ribosomes libres (30 mins d'incubation)	4.2	2.9
Ribosomes liés à la membrane		
(aucune incubation)	5.1	3.2
(30 mins d'incubation)	4.3	1.5

1. Léger - jusqu'à 4 ribosomes; Lourd - 5 ribosomes et plus.

Figure 1

Schéma d'un modèle proposé pour la transmission de l'information dans l'appareil génétique. I_1 à I_n , gènes intégrateurs; P, gène promoteur; O_1 à O_n , gènes opérateurs.



Remerciements

Ce travail a été rendu possible grâce à des octrois du Conseil de la Recherche Médicale d'Ottawa et de la Commission de la Recherche Scientifique, Ministère de l'Education, Gouvernement du Québec.

Références

1. McLean, N. (1976) Control of gene expression, Academic Press.
2. Roberts, S., Lajtha, A. & Gipsen, W.H. (Eds). (1977) Mechanisms, regulation and special functions of protein biosynthesis in the brain. Elsevier Press.
3. Murthy, M.R.V. (1980) "Molecular and biological aspects of degeneration of the nervous system caused by sensory deprivation and aging" dans Biochemistry of Brain (S. Kumar, Ed.). Pergamon Press. pp. 505-521.
4. Murthy, M.R.V., Roux, H., Bharucha, A.D. & Charbonneau, R. (1977) "Alterations in the structure and functions of free and membrane-bound polysomes and RNA of neuronal and glial enriched fractions of cerebral cortex during light deprivation and exposure to light of different wave lengths" dans Behavioural Neurochemistry (J.M.R. Delgado & F.V. DeFeudis, Eds). Spectrum Press, pp. 192-216.

5. Britten, R.J. & Davidson, E.H. (1969) "Gene regulation for higher cells" *Science* 165, 349-357.
 6. Cohn, W.E. & Volkin, E. (Eds.) (1976) "mRNA: the relation of structure to function". *Prog. Nucleic Acid Res. & Mol. Biol.*, 19, 263-350.
 7. Perry, R.P. (1976) "Processing of RNA". *Ann. Rev. Biochem.*, 45, 605-629.
-

VIEILLISSEMENT CÉRÉBRAL: UN MODÈLE NEURONAL

Gilliane Nosal, Département de pharmacologie,
Faculté de médecine, Université Laval, Québec.

Dans le cadre de ce colloque, notre approche au problème du vieillissement dans le système nerveux consistait en l'exploration ultrastructurale d'un modèle relativement simple, la cellule nerveuse dans le cervelet du rat.

La recherche à long terme que nous poursuivons depuis plusieurs années se propose l'étude du neurone de Purkinje (Pk) tout au long du continuum biologique. Elle englobe donc le dynamisme de la cellule nerveuse depuis sa différenciation et son développement (maturation progressive) jusqu'à sa dégénérescence (sénescence graduelle) et sa mort. L'élément de référence pour l'évaluation des phénomènes évolutifs aussi bien qu'involutifs est représenté par le neurone au stade de la maturité (état de stabilité relative). Cette interprétation intégrative d'un processus évolutionnaire unidirectionnel

DÉVELOPPEMENT —————> MATURITÉ —————> SÉNESCENCE

se baserait sur l'hypothèse d'une programmation génétique de l'individu au niveau de la cellule comme à celui de l'organisme entier. Toutefois sur ce programme génétique viennent se greffer des interférences ou

modulations de l'environnement susceptibles de le modifier (facteurs exogènes et endogènes). Le raisonnement appliqué à l'individu peut se concevoir dans son cerveau et conséquemment à l'unité élémentaire de celui-ci, le neurone.

En corollaire à ce concept intégrateur, la sénescence neuronale peut se concevoir comme résultant de l'évolution précédente de la cellule et représenterait l'aboutissement des événements antérieurs, assumés tout au long du cycle cellulaire.

Un second objectif de cette étude est d'examiner la possibilité que l'involution neuronale représente morphologiquement une image "inversée" de sa maturation. Le but ultime de cette recherche prolongée relève d'une préoccupation d'ordre pharmacologique soit d'établir un modèle de référence tout au long de la vie neuronale, chez le rat non traité, en vue d'évaluer l'interférence possible des xénobiotiques sur le cycle maturation-maturité-vieillessement dans le SNC.

Les données présentées ci-dessous vont tenter de résumer les événements essentiels qui se sont manifestés au cours du cycle du neurone Pk, (choisi comme cellule nerveuse d'étude) et pourraient nous aider à vérifier la validité des hypothèses de départ. L'approche effectuée intéresse un double plan d'organisation de la cellule nerveuse:

- l'évaluation générale du neurone in toto
- l'examen plus approfondi de certains constituants cellulaires englobés dans le système morpho-fonctionnel nucléo-ribosomique (SNR) décrit antérieurement (Nosal et Radouco-Thomas 1971, Nosal 1979b). Ce système

intraneuronal et ses fluctuations liées à l'âge constituerait un indicateur valable de l'état fonctionnel de la cellule Pk à un moment donné de sa vie. Ces deux explorations ont été effectuées en microscopie électronique à des âges déterminés du continuum du rat. A titre d'illustration, trois stades de la vie neuronale seront représentés:

- le neuroblaste précoce en tant qu'indicateur des phénomènes maturatifs;
- le neurone adulte, référence de maturité pour le développement et la sénescence;
- le neurone en sénescence graduelle avec, comme exemple, celui d'un rat âgé de deux ans.

La figure 1 est une image topographique d'un neuroblaste précoce, extrait d'une préparation cérébelleuse de rat de la première journée après la naissance (12-24 heures de vie). Le début de la différenciation de la cellule Pk est marqué par la transition entre la cellule dite "morphologiquement indifférenciée", présente en quantité importante dans le cervelet foetal du 20-21e jour de gestation et le début des neuroblastes primitifs qui se rencontrent en proportion variable dans les sections néonatales. Donc, la période périnatale du cervelet du rat (3 premiers jours) est marquée par une évolution intense et rapide sur le plan de la structure neuronale.

Comme le montre cette micrographie électronique à faible grossissement, d'une cellule arrondie à gros noyau entouré d'une mince couche de cytoplasme clair (peu d'organites), la cellule Pk devient plus grande et s'allonge. Deux pôles y sont reconnaissables.

Le pôle basal demeure encore peu développé sous forme d'un cône contenant essentiellement des polysomes. Par contre, le pôle apical (où se développera la dendrite) s'est fortement développé et contient de nombreuses mitochondries, quelques éléments vésiculaires, un ou plusieurs complexes golgiens. La substance fondamentale inclut de plus une population concentrée (l'espace est encore restreint) de ribosomes libres et de rares citernes courtes du REG. Le noyau irrégulièrement allongé contient une matière dense aux électrons, due à une répartition homogène des constituants. Le nucléole n'est pas encore entièrement de type mature, avec une masse de chromatine associée importante (Fig. 1). Le contour nucléaire apparaît déprimé et légèrement invaginé dans la région apicale, site de la future calotte nucléaire. L'environnement neuronal comporte de larges espaces extracellulaires.

Au cours des stades ultérieurs du développement, la cellule Pk évolue en neuroblastes intermédiaire et tardif puis en jeune neurone. Ces phénomènes neurogéniques prennent place au cours des trois premières semaines postnatales (période d'allaitement) et se caractérisent par:

1. un développement progressif de la masse cytoplasmique, tout d'abord dans la zone apicale puis dans les régions latéro-basales;
2. le volume nucléaire n'augmente que modérément par rapport au pericaryon; le nucléole s'accroît légèrement et sa texture acquiert rapidement un aspect de type mature;

3. le contraste peu marqué entre les deux compartiments cellulaires (noyau et pericaryon) s'accroît du fait (a) d'une distribution plus hétérogène des composantes nucléaires, en particulier de l'hétérochromatine s'agglutinant en petits amas; (b) d'une densité accrue des organites cytoplasmiques dans l'aire périnucléaire;

4. le développement d'ensemble du neurone paraît suivre deux axes:

- le sens apico-basal

- la direction centrifuge, l'aire périnucléaire étant plus rapidement peuplée d'organites que la zone périphérique, dans les régions latérales du neurone;

5. la dendrite principale et ses ramifications de même que l'axone se développent graduellement à partir du neuroblaste plus mûr.

Le neurone Pk du cervelet adulte, tel que représenté dans la figure 2 chez un rat de 90 jours (maturité sexuelle), démontre sa morphologie pyriforme typique et son axe bipolaire: pôle apical avec l'émergence de la dendrite principale et pôle basal avec le cône axonique (non inclus dans l'image). Le rapport masse du noyau sur volume du cytoplasme est également caractéristique de la cellule Pk mature. Le contraste nucléo-cytoplasmique est bien marqué, du fait de la distribution hétérogène des éléments nucléaires et de la forte densité en organites du pericaryon. La formation d'invaginations de l'enveloppe nucléaire est évidente à tous les stades cellulaires avec une importance variable, présumément reliée à l'état fonctionnel du

neurone (Nosal et coll 1967). Le nucléole présente ses caractéristiques de maturité (acquises depuis le neuroblaste intermédiaire). Une masse d'hétérochromatine lui est associée. En plus des constituants habituels déjà mentionnés du cytoplasme, de petites lipofuchsines ou pigments d'âge sont identifiables en nombre restreint. On remarquera également que l'environnement du neurone est dense par opposition aux larges espaces des préparations jeunes.

Les signes de sénescence neuronale paraissent s'installer graduellement. Les altérations ultrastructurales demeurent peu marquées et inconsistantes en occurrence et en intensité du 6e mois au 15e mois de vie. De plus, elles varient d'un neurone à l'autre dans une même préparation d'âge donné. En effet, comme lors des processus maturatifs, on observe au cours de l'involution neuronale, une asynchronie biologique de cellule à cellule, chacune paraissant progresser ou régresser à son rythme. A partir du 18e mois environ et jusqu'au 31e mois (derniers contrôles disponibles), les manifestations neuronales liées à l'âge deviennent plus marquées et se généralisent à un plus grand nombre de cellules.

A titre d'exemple, dans le cervelet de rat âgé de deux ans (24 mois) illustré dans la figure 3, on note les caractéristiques suivantes:

1. une diminution du contraste entre noyau et cytoplasme qui proviendrait de deux origines:
 - répartition plus diffuse des éléments nucléaires avec une agglutination moins évidente de l'hétérochromatine;

- une apparente réduction de la concentration péricaryonique en organites cytoplasmiques. A l'examen microscopique, cette densité diminuée pourrait être, tout au moins en partie, imputable à une population ribosomique libre moins importante;

2. l'incidence d'aires cytoplasmiques de densité électronique réduite dans lesquelles les éléments neurofibrillaires, deviennent plus évidents. Les aires "claires" sont plus fréquentes dans la région apico-latérale;

3. les pigments d'âge ou lipofuchsines sont nettement plus importants en nombre, volume et complexité. Tel que décrit dans un travail antérieur, ceux-ci s'accumulent en masses suivant une disposition préférentielle bipolaire aux pôles apical et basal avec quelques-unes, moins importantes, dans les régions latérales, plus fréquemment situées vers la périphérie neuronale (Nosal 1979a).

Après avoir considéré les modifications d'ensemble affectant la cellule Pk en fonction de l'âge (neurogenèse-maturité-sénescence), nous allons scruter plus attentivement le système intraneuronal SNR dans ses phénomènes évolutifs et involutifs.

Tout d'abord, à titre de rappel, le système nucléo-ribosomique est essentiellement constitué de:

1) composantes nucléaires

- dont le principal est le nucléole avec son ADN organisateur, ses composantes RNP fibrillaires denses et granulaires et la masse de chromatine associée;

- une entité additionnelle, le "spotted body", décrit

par nous dans le neurone Pk en maturation, qui servirait au transport ou au stockage de certains types d'ARN;

- de nombreuses particules RNP sous forme de "macrogranules" (granules péricromatiniens) et de granules interchromatiniens.

2) composantes cytoplasmiques

représentées par les "rosettes" ribosomiques ou polysomes libres et par les ribosomes attachés aux membranes des citernes du REG. Leur rôle dans la synthèse des protéines neuronales et, par suite, dans l'activité neuronale est bien établi. Leur densité par cellule reflèterait donc morphologiquement l'état d'activité du neurone aux divers stades de la vie cellulaire.

Un schéma dans le neurone mature incluant quelques caractéristiques neuronogéniques a été rapporté antérieurement (Nosal et Radouco-Thomas 1971; Nosal 1979b).

Au niveau de ce système, examinons d'abord, à l'aide d'un neuroblaste du premier jour postnatal (Fig. 4), les phénomènes qui se produisent en début de maturation neuronale. Comme déjà évident dans la figure 1, c'est la zone apicale, représentée dans cette micrographie à plus fort grossissement, qui se développe précocement au début du stade neuroblastique. Cette région dendritique s'est révélée particulièrement intéressante tout au long du cycle neuronal. C'est la raison pour laquelle elle a été retenue pour cette étude. Ainsi, nous avons un élément de comparaison plus valable pour évaluer les modifications liées à l'âge du neurone.

Le noyau encore allongé contient un nucléoplasme relativement dense mais homogène par rapport à la répartition de ses éléments fibrillaires et granulaires. Les IEN, formations habituelles du neurone quel que soit son âge, sont souvent prédominantes au pôle apical, site de la future calotte nucléaire, non décelable à ce stade. La densité de la substance fondamentale du pericaryon ne diffère que peu ou pas de celle du noyau. Les principaux organites cytoplasmiques sont présents. Toutefois, la micrographie montre bien que le système ribosomique est encore peu développé. En dehors des polysomes libres, disséminés et apparemment plus nombreux dans l'aire périnucléaire, seules de rares citernes dispersées du REG sont identifiables. Les flèches pointent sur des éléments neurofibrillaires.

A partir du neuroblaste précoce, l'un des changements majeurs observés dans le SNR est la prolifération accélérée et le développement graduel du système membranaire endocytoplasmique. Les citernes rugueuses paraissent originer, en partie tout au moins, à partir du feuillet cytoplasmique de l'enveloppe nucléaire (Nosal et Radouco-Thomas, 1971). Le REG se développe d'abord dans la zone apicale déjà plus volumineuse puis paraît ensuite s'étendre aux régions latéro-basales. Au cours des stades de neuroblastes intermédiaire et tardif, on peut constater que l'enrichissement en organites, y compris les citernes du REG, semble se produire du centre vers la périphérie. Donc comme déjà évoqué, les processus neuronogéniques dans

ce neurone semblent suivre deux axes: apico-basal et centrifuge. Parallèlement, les ribosomes libres, déjà présents au stade dit "indifférencié", augmentent en nombre. Il en est de même des ribosomes attachés qui s'accroissent en fonction de l'élaboration des membranes du REG.

Par conséquent, le début de l'évolution neuronale est marqué par:

- un développement progressif, directionnel du pericaryon suivant l'axe apico-basal et centro-périphérique;
- dans le SNR en étude, la maturation des constituants nucléaires est déjà bien avancée. Elle précède nettement celle des composantes ribosomiques qui surviendra dans les neuroblastes intermédiaire et tardif.

La figure 5 illustre la région apicale du neurone mature dans un cervelet de rat âgé de 90 jours. Celle-là est très riche en organites divers. On y voit en particulier, l'arrangement neuronal typique du REG en calotte nucléaire (superposition de plusieurs citernes rugueuses, intercalées de nombreux polysomes). La population ribosomique libre apparaît très concentrée entre ces citernes, à l'intérieur des IEN ou inversement disséminée entre d'autres organites. Des mitochondries polymorphes sont en relation topographique étroite avec le REG. Quelques corps denses (db) et lipofuchsines sont observés; les complexes de Golgi sont régulièrement présents. Le contraste entre le noyau et le cytoplasme est bien marqué du fait de:

- la forte densité en organites de l'aire périnucléaire;

- la répartition hétérogène des constituants du noyau. L'hétérochromatine est répartie en masses d'importance variable contre l'enveloppe nucléaire ou dans le nucléoplasme. Le nucléole, non inclus dans l'image, possède depuis longtemps ses caractéristiques ultrastructurales matures.

Par rapport au stade de la maturité, l'initiation et la progression des phénomènes involutifs dans la cellule Pk en sénescence s'expriment par plusieurs modifications identifiables en microscopie électronique dans le neurone in toto (cf. figure 3) et dans le SNR intraneuronal ainsi qu'au niveau d'autres constituants cytoplasmiques.

Dans cette cellule Pk de rat âgé de deux ans (fig. 6), on observe dans la région apicale:

- un contraste plus réduit entre noyau et cytoplasme pour les raisons déjà invoquées;
- l'existence dans le pericaryon d'aires "claires" dans lesquelles on constate une apparente diminution des polysomes libres. Par contre, les éléments neurofibrillaires deviennent plus évidents soit par un meilleur contraste, soit encore par une densité accrue de ces éléments par cellule;
- de plus, on assiste, lors de l'involution neuronale, à une fragmentation et à une dispersion graduelles des citernes du REG. Ainsi, dans cette préparation de cervelet de 24 mois, la calotte nucléaire n'est plus identifiable en tant que telle. Quelques citernes rugueuses de dimensions plus réduites sont disséminées sans organisation en corps de Nissl, usuelle dans la cellule nerveuse. Les mitochondries demeurent cepen-

dant en étroite relation avec ces citernes;

- quant aux pigments d'âge dont l'accumulation progressive dans le neurone sénescant a déjà été notée (cf. figure 3), la micrographie à plus fort grossissement révèle leur polymorphisme ainsi que leur complexité interne.

Au niveau des structures nucléaires du SNR, les phénomènes de régression observés dans le neurone Pk vieillissant, se manifestent par:

- des altérations dans la répartition et la proportion relative des RNP nucléolaires, c'est-à-dire: (a) une tendance au regroupement des éléments fibrillaires denses et des particules granulaires, et (b) un apparent accroissement de la proportion des granules par rapport aux fibrilles;
- une possible réduction de la quantité des "macrogranules" par cellule alors que les granules interchromatiniens deviennent moins bien identifiables dans le suc nucléaire d'aspect plus uniforme.

Lors de l'avancement en âge, chez des rats âgés de 30 mois et plus, on observe, dans la cellule Pk vieillie, un engorgement marqué de la région dendritique par des pigments volumineux, accumulés en amas. Les autres caractéristiques cytoplasmiques demeurent aussi marquées ou, dans certains neurones, s'accroissent. D'autre part, il a été noté la présence d'inclusions "anormales", fréquemment des corps lamellaires très denses aux électrons. Ces altérations cytoplasmiques, observées chez des rats âgés, spécialement ceux en mauvaise santé ou porteurs de tumeurs,

pourraient n'être pas des caractéristiques usuelles de la sénescence neuronale avec lesquelles elles peuvent coexister d'ailleurs.

Sur la base des hypothèses énoncées au début, la première question qui se pose est la suivante: dans quelle mesure les données ultrastructurales obtenues en fonction de l'âge dans le neurone de Purkinje du cervelet du rat peuvent-elles contribuer à confirmer ou à infirmer: (1) le concept d'intégration: développement $\rightarrow$ maturité $\rightarrow$ sénescence? et (2) l'inversion des images entre régression et maturation?

L'examen en microscope électronique a révélé que ce neurone subit des changements liés à l'âge intéressant la cellule in toto ainsi que les constituants du système nucléo-ribosomique en étude, dont le rôle dans la synthèse des ARN et des protéines est bien admis.

Lors de la maturation neuronale (neuronogénèse), la cellule Pk manifeste un accroissement de taille surtout attribuable au développement graduel du pericaryon. Celui-ci paraît se réaliser selon l'axe apico-basal et dans une direction centro-périphérique. Au stade neuroblastique plus avancé, les prolongements neuronaux (dendrites et axone) s'élaborent et se développent. Parallèlement, les espaces extracellulaires se réduisent et le neuropile se constitue. Dans le SNR, la séquence des phénomènes évolutifs observés suggère que la maturation des constituants nucléaires s'opère plus précocement et précède nettement celle des composantes cytoplasmiques du système. En effet, si les polysomes libres sont déjà présents en quantité faible au tout début de la différenciation, cette

population va s'accroître progressivement avec le développement neuronal. Quant à l'élaboration et à la prolifération du REG - incluant les membranes des citernes et les ribosomes attachés - elles s'effectuent plus tardivement et graduellement dans les neuroblastes intermédiaire et tardif (approximativement entre les 5e et 21e jours postnataux dans le cervelet du rat).

Sur le plan morphologique, la neuronogénèse de la Pk pourrait se réaliser suivant une séquence unidirectionnelle de processus continus tendant à amener la cellule nerveuse à un degré supérieur de différenciation et de maturation débouchant sur le jeune neurone (raton au sevrage d'allaitement). Ce dernier possède alors l'essentiel de ses caractéristiques ultrastructurales matures par rapport à ses organites. Globalement, le perfectionnement ultérieur n'impliquera plus que l'augmentation du volume cellulaire, l'acquisition de l'aspect pyriforme définitif ainsi que le parachèvement de l'arborisation dendritique et l'installation des connections axoniques et dendritiques.

Au cours de la sénescence neuronale graduelle, l'exploration ultrastructurale révèle, dans le neurone Pk in toto, une tendance au ratatinement de la masse cellulaire qui se décèle aux stades les plus avancés du vieillissement (animaux âgés de deux ans et plus). Bien que des contrôles n'aient pu être effectués valablement avec les méthodes d'étude utilisées, plusieurs chercheurs ont mis en évidence, par la technique de Golgi et des examens cytomorphométriques, des

altérations dans le branchement dendritique et les connexions synaptiques qui, fonctionnellement, seraient plus impliquées dans l'involution du SNC que la perte neuronale (Scheibel et Scheibel, 1976). Chez l'animal en vieillissement, Mervis a décrit chez le chien âgé dans le cortex cérébral (1978) et cérébelleux (communication personnelle), une perte des épines dendritiques et une arborisation dendritique réduite qui se compareraient aux détériorations histopathologiques de la maladie de Alzheimer et de la démence sénile. Au niveau du système intraneuronal SNR, des données de microscopie électronique encore limitées, indiquent cependant l'installation et l'accentuation de phénomènes involutifs liés à l'avancement en âge. Ainsi, des altérations morphologiques sont observables, particulièrement dans les composantes ribosomiques et membranaires du pericaryon neuronal. Avec la sénescence progressive du neurone Pk, on assiste à une apparente diminution de la population ribosomique libre, celle-ci étant plus marquée dans lesdites "aires claires". De plus, reliée à la fragmentation et à la dispersion graduellement plus marquées des citernes du REG, l'importance numérique et vraisemblablement fonctionnelle des ribosomes attachés régresserait avec l'âge. Bien que plus difficilement identifiable aux grossissements microscopiques employés, l'involution des constituants nucléaires du SNR se traduirait par une certaine désorganisation de la structure nucléolaire. En fait, les ribonucléoprotéines (RNP) fibrillaires et granulaires

qui se trouvent intriquées dans le nucléole mature, ont tendance à se regrouper en zones plus distinctes dans la cellule vieillissante. De plus, la proportion des éléments granulaires pourrait s'accroître relativement à celle des fibrilles.

Par rapport à la maturité nucléolaire, on constate une certaine concordance dans l'image microscopique du nucléole en développement et en sénescence. Ainsi dans les deux cas, le volume nucléolaire apparaît plus petit comparé à celui de la Pk adulte; dans le premier, les dimensions encore restreintes peuvent être attribuées à une croissance non terminée alors que dans le deuxième, il peut être présumé qu'il se produirait un ratatinement dans certaines préparations âgées (réduction des espaces nucléolaires). Inversement cependant, le nucléole vieillissant peut apparaître dilaté avec élargissement de ces espaces dans d'autres spécimens vieux. Concernant la configuration et la texture du nucléole, on constate, lors des stades évolutifs aussi bien qu'involutifs, une tendance plus ou moins marquée à une "ségrégation" des éléments fibrillaires et granulaires. Cependant la prédominance relative d'un type de RNP sur l'autre est inverse: des fibrilles dans l'évolution nucléolaire et des granules lors de l'involution.

D'autre part, bien que des données quantitatives ne soient pas encore disponibles, la population des "macrogranules" varierait en fonction de l'âge. Par rapport au noyau mature, leur quantité par cellule serait moins importante dans le neuroblaste et régesserait dans le neurone sénescant. Cette raréfaction

lors du vieillissement, présumée à l'aide d'une évaluation qualitative seulement, trouve néanmoins un support à partir d'une analyse de la densité numérique des granules périchromatiniens dans le cervelet de rats âgés de 26 à 29 mois. Zs-Nagy et coll. (1977) ont en effet trouvé une réduction supérieure à 50% par rapport aux valeurs adultes. Etant donné que ces granules périchromatiniens ont été impliqués dans le stockage ou le transport de m-ARN du noyau au cytoplasme, il n'apparaît pas surprenant que leur proportion relative à un stade donné du cycle cellulaire puisse être représentative de la quantité de messagers produits et, conséquemment des capacités du neurone à synthétiser des protéines.

En ce qui concerne le neurone Pk mature du cervelet du rat, ses caractéristiques ultrastructurales sont bien identifiées (Herndorn, 1963; Peters et coll., 1970; Palay et Chan Palay, 1974). Des corrélations morpho-fonctionnelles ont été tentées (Nosal et Radouco-Thomas, 1971; Nosal et coll. 1975b; Nosal, 1979a). Du fait de son état de stabilité relative pendant la maturité neuronale, la cellule Pk adulte peut servir d'élément de référence pour l'évaluation des modifications liées à l'âge tout au long du cycle cellulaire.

Les informations ultrastructurales, recueillies dans le neurone de Purkinje du rat en fonction de l'âge, indiquent qu'il existerait plusieurs similitudes d'images lors de la maturation et lors de la sénescence du SNR en comparaison avec l'état mature de la cellule nerveuse. L'hypothèse d'un processus

évolutionnaire unidirectionnel se reliait à la possibilité déjà évoquée d'une inversion des événements morphologiques: sénescence versus maturation. Cette interprétation semble appuyée par plusieurs constatations dans le système morpho-fonctionnel intraneuronal, détaillé dans des travaux antérieurs (Nosal et Radouco-Thomas, 1971; Nosal, 1979b). Morphologiquement, la mise en place graduelle des composantes nucléaires et cytoplasmiques du SNR lors du développement est progressivement remplacée, après l'état adulte et le début de la sénescence, par une apparente régression des supports morphologiques de ce système.

Considérée sous l'angle morpho-fonctionnel, d'ailleurs indissociable, l'éventualité d'une inversion des processus peut être discutée. En effet, quelles pourront être les conséquences fonctionnelles des changements ultrastructuraux subis par le SNR en fonction de l'âge du neurone? La différenciation et le développement morphologique des structures nucléaires et cytoplasmiques du SNR correspondent fonctionnellement à l'initiation et au perfectionnement graduel des activités neuronales reliées à ce système. Ainsi, des corrélations morpho-fonctionnelles (au moyen d'études ultrastructurales, d'analyses biochimiques et RAG, d'examen cytochimiques) ont été proposées lors de l'évolution neuroblastique. Au début de ce stade, l'existence prédominante et quasi-unique des rosettes ribosomiques correspondrait à une phase d'activité cellulaire spécialisée: celle de la synthèse protéique spécifique pour la médiation de

l'information dont le but est l'édification du pericaryon en développement (Eschner et Glees 1963; Nosal et Radouco-Thomas 1971). Aux stades neuroblastiques ultérieurs (intermédiaire et tardif), marqués par la prolifération extensive du REG et par l'accroissement concomittant des ribosomes attachés aux citernes, l'activité de protéosynthèse s'oriente vers la production de larges complexes protéiques nécessaires au fonctionnement neuronal et, avec le développement des axones et des dendrites, aux relations de communications intracérébrales, ou intracérébelleuses dans ce cas. Ceci implique également une maturation antérieure des supports nucléaires concernés dans la production des ARN messagers, ribosomiques et de transfert, ainsi que la facilitation des échanges nucléo-cytoplasmiques via l'enveloppe nucléaire (EN) et ses pores. Ces processus évolutifs, manifestés morphologiquement et fonctionnellement, se développeraient jusqu'au stade de la maturité neuronale où ils deviendraient relativement stabilisés. Les variations morpho-fonctionnelles décelables dans la cellule adulte, demeurent nettement plus faibles (p. ex. la formation plus ou moins intense d'invaginations de l'EN) et probablement liées à un état d'activité du neurone à un moment donné (Nosal et coll. 1967). Ultérieurement, on assistera présumément à une inversion des phénomènes à mesure que la cellule prendra de l'âge. L'image ultrastructurale assez comparable sous certains aspects à celle du neuroblaste, obtenue dans les structures du SNR vieillissant (nucléole, macrogranules, système

ribosomique) reflèterait en fait des réalités fonctionnelles bien différentes. Ainsi, les phénomènes involutifs manifestés dans le SNR vieillissant, entre autres les altérations de structure et de composition du nucléole, la diminution du nombre des macrogranules, l'apparente réduction des ribosomes libres (surtout remarquable dans les aires "claires") et la désorganisation structurale du REG, sont supposées traduire morphologiquement le ralentissement dans la production de diverses classes d'ARN par le noyau et la détérioration consécutive et graduelle de la machinerie cytoplasmique pour la synthèse protéique (Bondareff, 1962; Mackinnon, Simpson et MacLennan, 1969; Timiras et Vernadakis, 1972). Une confirmation a également été apportée par l'analyse biochimique montrant un contenu global en protéines diminué dans le cerveau du rat et de la souris avec l'âge (Mokrasch et Manner 1963; Oeriu 1964; Adams et Lim, 1966; Orrego et Lipman, 1967). Bien que l'on ignore encore quel type de protéines est spécifiquement impliqué, la production réduite de protéines est associée à une concentration moindre d'enzymes cérébrales dont l'issue finale pourrait bien être un ralentissement de l'activité du SNC dans l'âge avancé (Adelman, 1971).

Lors de la sénescence neuronale, en dehors des phénomènes possiblement "inversés" par rapport à la maturation dans le SNR, d'autres facteurs pourraient contribuer à la régression morpho-fonctionnelle de la cellule nerveuse. Le mieux identifié de ceux-ci est certainement l'accumulation de produits inertes

ou de déchets que le neurone vieillissant n'est plus capable d'éliminer. Ceci se reflète morphologiquement par l'invasion graduelle et sélective du pericaryon par des lipofuchsines ou pigments d'âge (Brizzee et Johnson, 1970; Brunk et Ericsson 1972; Timiras, 1972; Brizzee et coll. 1976). Bien que répandu à d'autres souches cellulaires, ce phénomène est peut-être plus marqué dans une cellule hautement différenciée et irremplaçable comme le neurone. Hormis des cas particuliers, tel celui de la progeria, les pigments d'âge sont rares sinon inexistants dans le neurone en développement. La congestion massive du pericaryon dans les cellules du tissu nerveux et aussi du muscle cardiaque d'ailleurs, résulterait de leurs activités fonctionnelles intenses tout au long de la vie, alors que leur capacité de les éliminer deviendrait graduellement inadéquate et déficiente avec l'âge. L'accumulation plus sélective, observée dans le neurone Pk aux pôles dendritique (apical) et axonique appuierait le postulat selon lequel la surcharge en pigments conduirait à une altération fonctionnelle de la cellule, déjà imputable à une accentuation liée à l'âge des détériorations morpho-fonctionnelles du SNR.

Ces déductions sur les capacités réduites du neurone en sénescence sont opposées aux conclusions dérivant de l'étude neuronogénique dans laquelle les évidences ultrastructurales et biochimiques indiquaient des activités intenses du SNR de la cellule nerveuse en maturation (cf aspects moléculaires du développement du SNR dans Radouco-Thomas, Nosal, Radouco-

Thomas, 1971).

L'étude des phénomènes évolutifs et involutifs dans la cellule nerveuse constitue per se un intérêt certain par son approche morpho-fonctionnelle à des processus fondamentaux prenant place dans le SNC tout au long du continuum biologique. Cependant, le but ultime de cette recherche prolongée sur tout le cycle cellulaire dans le neurone Pk du cervelet (en tant qu'exemple d'unité élémentaire du SNC) relève d'une préoccupation d'ordre pharmacologique. Effectivement, il s'agissait de tenter d'établir un modèle de référence, chez le sujet non traité, couvrant tous les stades de la vie neuronale, autrement dit d'un modèle évolutionnaire allant de la différenciation à la dégénérescence cellulaires. Cet élément de référence doit servir pour l'évaluation de l'interférence possible des Xénobiotiques sur le cycle développement-maturité-vieillesse dans le SNC. Le choix de la cellule Pk chez le rat, mammifère non précoce, s'explique entre autres par: (1) sa morphologie typique et son identification précoce; (2) sa maturation presque entièrement postnatale et (3) en tant qu'exemple type d'une cellule postmitotique, hautement différenciée. Ces trois arguments sont d'ordre surtout morphologique mais peuvent être complétés par le rôle fonctionnel important exercé par ce macroneurone dans les fonctions cérébelleuses, et dans certaines activités comportementales sous contrôle du cervelet.

L'utilité d'un tel modèle évolutionnaire au niveau intraneuronal s'est déjà révélée lors de recher-

ches antérieures avec différentes drogues en usage abusif. Au cours du développement néonatal et post-natal du raton et du souris, le traitement avec des hallucinogènes, LSD₂₅ et Δ_1 -THC, a entraîné des altérations identifiées des structures du SNR (Nosal et coll., 1975a). Plus récemment, l'exposition in utero et via le lait, à la morphine maternelle, s'est avérée interférer avec la maturation de ce système chez la progéniture de rat. Cette influence se traduisait par une différenciation moindre du nucléole dans le neuroblaste néonatal ainsi que par un développement retardé ou altéré de la composante ribosomique du SNR, visualisé au stade du jeune neurone (Nosal, 1979b,c).

L'aspect d'involution neuronale avec l'avancement en âge (cf. Résultats et Nosal, 1979a) devrait également être utile pour le contrôle d'une hypothèse que nous avons formulée concernant l'éventualité que, dans la descendance de rats, l'interférence du narcotique avec la maturation cérébrale puisse se répercuter à long terme par un vieillissement précoce ou accéléré du SNC. Cette présomption avait été déjà avancée en ce qui concerne les usagers d'alcool, tout particulièrement les plus jeunes alcooliques. Il n'est pas exclu qu'un tel phénomène se produise avec les narcotiques et d'une manière plus accentuée chez des sujets encore moins développés, c'est-à-dire chez les petits de mères narcotisées.

En conclusion, les données ultrastructurales recueillies dans le neurone, spécifiquement dans la cellule de Purkinje du rat, au cours de son cycle

vital, suggèrent la possibilité - à explorer plus extensivement - de processus évolutifs continus et unidirectionnels débutant par la différenciation, se perfectionnant au cours de la maturation, s'équilibrant dans la maturité pour finalement aboutir à une lente dégénérescence irréversible et à la mort neuronale. Des informations encore fragmentaires et limitées, obtenues avec des produits en abus courant (hallucinogènes, narcotiques et alcool) ouvrent des perspectives quant aux répercussions possibles, sur tout le cycle neuronal, d'une interférence néfaste à un stade particulièrement vulnérable de l'évolution, celui de la maturation de la cellule nerveuse.

Références

- Adams, D.H. et Lim, L.: Amino acid incorporation by preparations from the developing rat brain. *Biochem. J.*, 99: 261-265, 1966.
- Adelman, R.C.: Age-dependent effects in enzyme induction- a biochemical expression of aging. *Exp. Gerontol.*, 6: 75-88, 1971
- Bondareff, W.: Distribution of Nissl substance in neurons of rat spinal ganglia as a function of age and fatigue. IN: *Biological Aspects of Aging*, W.W. Shock (ed) Columbia University Press, New York, 1962.

Brizzee, K.R. et Johnson, F.A.: Depth distribution of lipofucsin pigments in cerebral cortex of albino rats. *Acta Neuropathol.*, 16: 205-219, 1970.

Brizzee, K.R., Harkin, J.E., Ord, J.M. et Kaach, B.: Accumulation and distribution of lipofucsin, amyloid and senile plaques in the aging NS. *IN Aging*. 1: 39-78, 1976.

Brunk, V. et Ericsson, J.L.: Electron microscopic studies on rat brain neurons; localization of acid phosphatase and mode of formation of lipofucsin bodies. *J. Ultrastruct. Res.*, 38: 1-15, 1972.

Eschner, J. et Glees, P.: Free and membrane-bound ribosomes in maturing neurons of the chick and their possible functional significance. *Experientia*, 19: 301, 1963.

Herndorn, R.M.: The fine structure of the Purkinje cell. *J. Cell Biol.*, 18: 167, 1963.

Mackinnon, P.C.B., Simpson, R.A. et MacLennan, C.: In vivo and in vitro techniques used in the study of RNA synthesis in the brains of rats and mice at various ages from birth to senility. *J. Anat.*, 104: 351-360, 1969.

Mervis, R.: Structural alterations in neurons of aged canine neocortex: A Golgi study. *Exp. Neurol.*, 2: 419-432, 1978.

Mokrasch, L.C. et Manner, P.: Incorporation of ^{14}C -amino acids and ^{14}C -palmitate into proteolipids of rat brains in vitro. *J. Neurochem.*, 10: 541-547, 1963.

Zs-Nagy, V., Bertoni-Freddari, C., Zs-Nagy, I., Pieri, C. et Giuli, C.: Alterations in the numerical density of perichromatin granules in different tissues during aging and cell differentiation. *Gerontology*, 23: 267-276, 1977.

Nosal, G., Chouinard, L.A. et Radouco-Thomas, C.: Invaginations de la membrane nucléaire dans la cellule de Purkinje chez le rat adulte. *Can. J. Zool.*, 45: 17-25, 1967.

Nosal, G. et Radouco-Thomas, C.: Ultrastructural study on the differentiation and development of the nerve cell; the nucleus-ribosome system. IN: *Advances in Cytopharmacol.*, Vol. 1, F. Clementi and B. Ceccarelli (Eds). Raven Press, New York, pp. 433-456, 1971.

Nosal, G., Lapointe, G. et Lin, K.N.: Altérations neuronales induites par le LSD-25 et le delta-1-THC chez les petits rongeurs en développement néonatal et postnatal. *Vie Méd. Can. Franç.*, 4: 109-129, 1975a.

Nosal, G., Lin, K.N. et Lapointe, G.: Maturation néo- et postnatale dans le cortex cérébelleux de la souris. Etude ultrastructurale. *Acta Neurol. Latinoamer.*, 21: 1-16, 1975b.

Nosal, G.: Neuronal involution during ageing. Ultrastructural study in the rat cerebellum. *Mechan. Ageing Develop.*, 10: 295-314, 1979a.

Nosal, G.: Influence exercée sur la progéniture de rat par l'exposition à la morphine maternelle.

Partie I. Exposition foetale et neuronogénèse dans le cervelet néonatal. *Acta Neurol. Latinoamer.*, 25: 27-46, 1979b.

Nosal, G.: Influence exercée sur la progéniture de rat par l'exposition à la morphine maternelle.

Partie II. Exposition pré- et postnatale et maturation cérébelleuse chez le raton. *Acta Neurol. Latinoamer.*, 25: 151-166, 1979c.

Oeriu, S.: Proteins in development and senescence. IN: *Adv. Gerontol. Res.*, Vol. 1, B.L. Strehler (Ed), Academic Press, New York, 1964.

Orrego, F. et Lipman, F.: Protein synthesis in brain slices: effects of electrical stimulation and acidic amino acids. *J. Biol. Chem.*, 242: 665-672, 1967.

Palay, S.L. et Chan-Palay, V.: *Cerebellar Cortex-Cytology and organization*, Springer Verlag, New York, 1974.

Peters, A., Palay, S.L. et Webster, H. de F.: *The fine structure of the nervous system*. Hoeber, New York, 1970.

Radouco-Thomas, C., Nosal, G. and Radouco-Thomas, S.: The Nuclear-Ribosomal System during neuronal differentiation and development. IN: *Chemistry and Brain Development* - R. Paoletti et A.N. Davison (Eds) Plenum Press, New York, 291-308, 1971.

Scheibel, M.E. et Scheibel, A.B.: Structural changes in the aging brain. IN: *Aging*, 1: 11-37, 1976.

Timiras, P.S.: Degenerative changes in cells and cell death. IN: Developmental Physiology and Aging, P.S. Timiras (Ed), The Macmillan Company, New York, pp. 429-449, 1972.

Timiras, P.S. et Vernadakis, A.: Structural, biochemical and functional aging of the nervous system. IN: Developmental Physiology and Aging, P.S. Timiras (Ed), The Macmillan Company, New York, pp. 502-526, 1972.

Remerciements

Cette recherche prolongée a été rendue possible grâce à une subvention de l'Usage non médical des drogues (NMUD, no 1212-4-139) du ministère de la Santé et du Bien-Etre social du Canada.

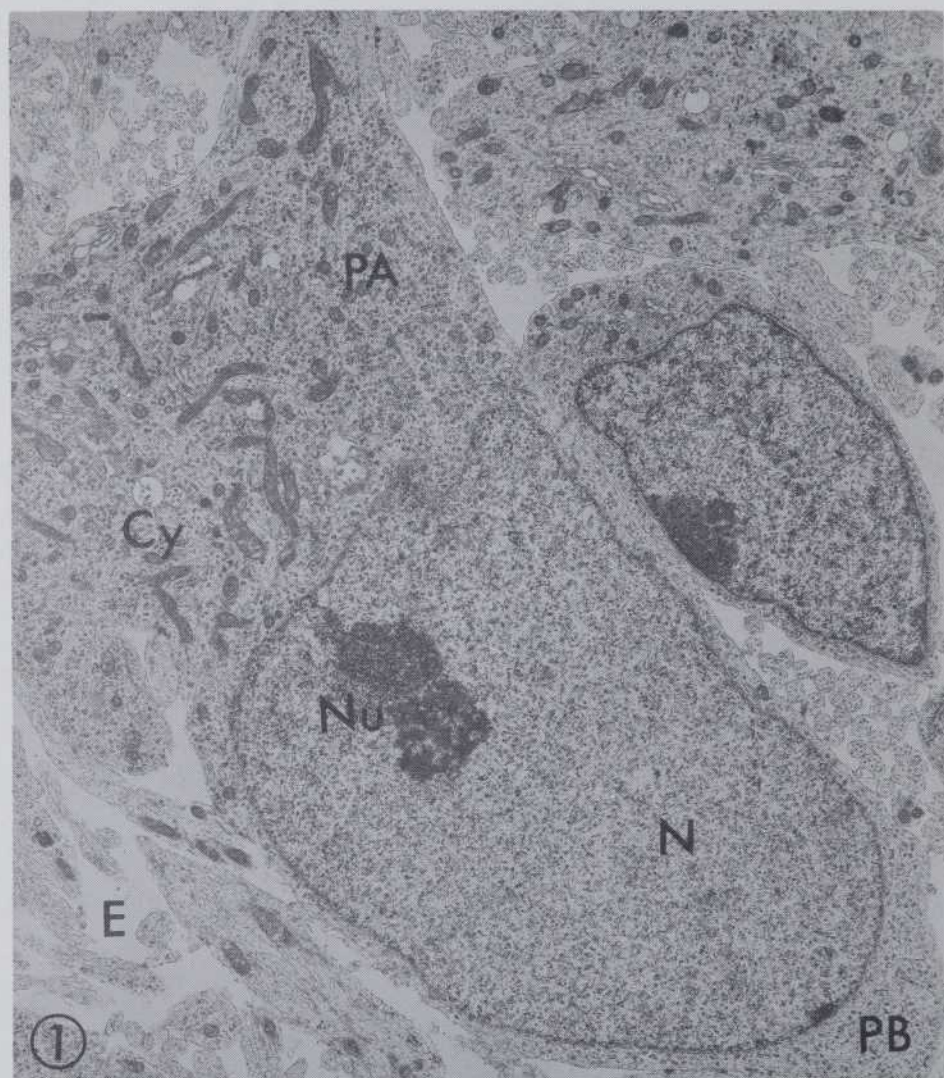
Légendes des Figures

Figures 1-3: Vue topographique du neurone de Purkinje dans le cervelet du rat: (1) neuroblaste précoce du premier jour post-natal (2) neurone mature d'un spécimen de 90 jours (3) neurone en sénescence de 2 ans.
(X 3.600 X 2.5)

Figures 4-6: Région apicale du neurone de Purkinje (détails) (4) neuroblaste précoce; (5) neurone mature; (6) neurone en sénescence. (X 8.094 X 2).

Abréviations utilisées

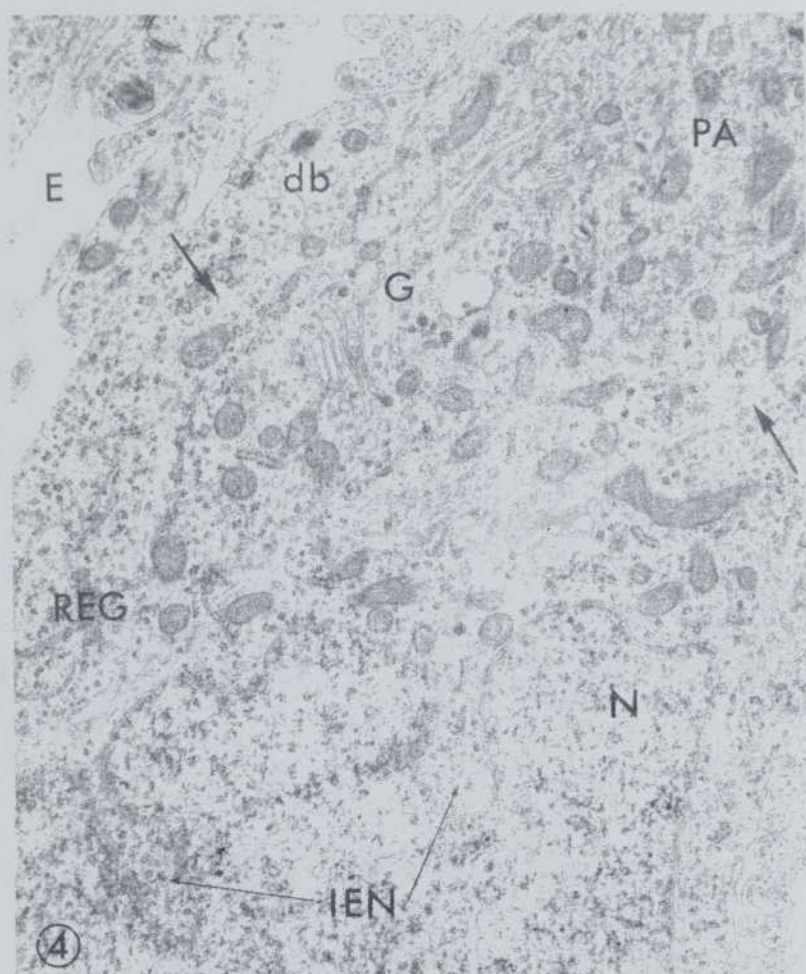
CN : calotte nucléaire
Cy : cytoplasme
De : dendrite
E : espaces extracellulaires
G : Golgi
IEN : invaginations de l'enveloppe nucléaire
Lp : lipofuchsines
N : noyau
Nu : nucléole
PA : pôle apical
PB : pôle basal
REG : réticulum endoplasmique granulaire
db : corps dense

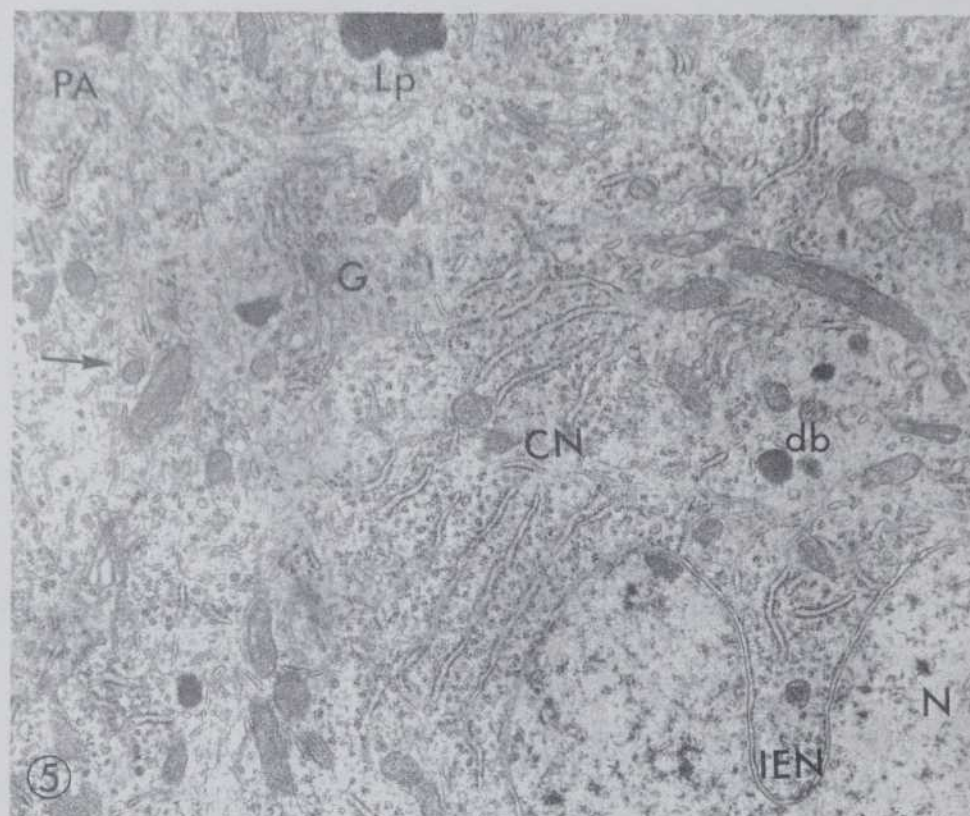


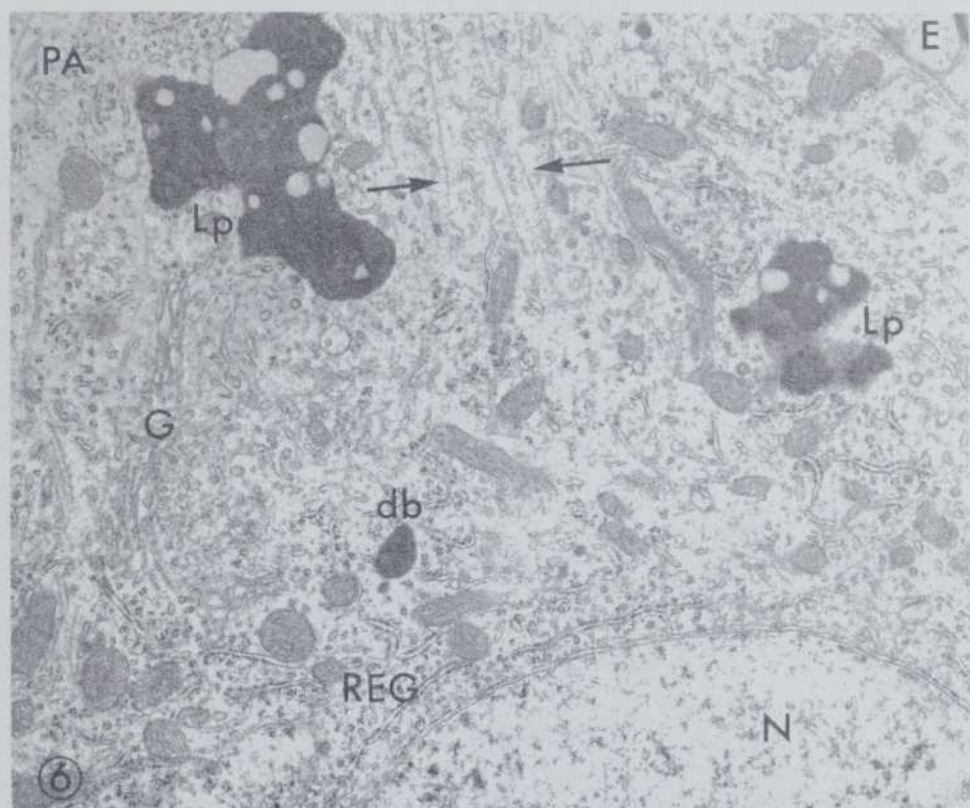


②











PATHOLOGIE DU SYSTEME NERVEUX

EN VIEILLISSEMENT

Rosita et Juan F. Estable-Puig, Département de pathologie, Faculté de médecine, Université Laval

..... no deben preocuparnos las arrugas del rostro..., sino las del cerebro, estas no las refleja el espejo, pero las perciben nuestros amigos, discipulos y lectores.....

(..... ne nous inquiétons pas des rides du visage... mais de celles du cerveau, qui, bien qu'elles ne se reflètent pas dans le miroir, sont bien perçues par nos amis, élèves, lecteurs...): Santiago Ramon y Cajal, dans son livre: "El mundo a los ochenta anos" (Vision du monde à quatre-vingts ans) (1), cité par L. Benitez-Bribiesca (2).

Introduction

L'étude des altérations du cerveau en fonction de l'âge et en particulier l'étude du vieillissement pathologique a récemment acquis une grande importance, et la recherche neuropathologique sur ce sujet connaît, par conséquent, un nouvel essor. Le temps qui s'écoule affecte inévitablement tous les organes; cependant, le cerveau semble être particulièrement vulnérable et les

conséquences de sa détérioration sont si dévastatrices que nous sommes- aujourd'hui plus que jamais- de l'avis du plus grand neuroanatomiste de tous les temps qui, à un âge très avancé mais très lucide, préconisait il y a plus de cinquante ans de donner à l'étude du cerveau une attention prioritaire en gériatrie.

Quoique l'étude morphologique et topographique des altérations du tissu nerveux au cours du vieillissement ait été l'objet de recherches extensives, autant macroscopiques que microscopiques, depuis plus d'un siècle- et que ces données constituent un chapitre classique de la neuropathologie- le souci d'approfondir ces connaissances par une exploration intégrée appartient de fait à notre époque, et nous ne pouvons plus ignorer les sérieux problèmes socio-économiques découlant de nos populations âgées.

Il y a nombre de raisons qui soulignent l'importance du système nerveux en gériatrie. Signalons parmi bien d'autres les suivantes: Premièrement, les connaissances très extensives sur le plan morphologique qui démontrent l'existence de lésions cellulaires dont l'association avec le vieillissement est indiscutable, quoique la pathogénie et la signification fonctionnelle soient encore mal comprises. Deuxièmement, quelques-unes de ces lésions cellulaires gardent un rapport étroit- qui a été dans certains cas quantifié- avec des altérations séniles déficitaires des fonctions nerveuses supérieures et du comportement. Elles constituent le substratum pathologique des maladies mentales spécifiquement associées au vieillissement neurologique tel les démences de type Alzheimer.

Dans cette optique, prévenir ou inverser cette condition pathologique constitue un des principaux buts de la recherche neurogérontologique. Troisièmement, sur le plan de la pathologie cellulaire, bien des altérations que subissent les cellules nerveuses tout au long de leur vie et particulièrement au cours du vieillissement sont cumulatives. En effet, les neurones perdent, au cours de leur différenciation très spécialisée, leur capacité de division et elles reflètent donc dans leurs altérations, mieux que n'importe quel autre système cellulaire, l'effet du vieillissement sur l'organisme tout entier. Finalement, il semble y avoir des liens de causalité entre le rôle régulateur central du système nerveux dans le fonctionnement de l'organisme comme un tout et la nature globale des altérations du vieillissement.

Bien que l'intérêt que le médecin général porte à la gérontologie soit relativement récent- vu le vieillissement actuel des populations- ce n'est pas le cas des neuropathologistes. Leurs intérêts pour le vieillissement cérébral sont multiples, de longue date et ils se sont constamment élargis tirant avantage de l'introduction de nouveaux outils et de nouvelles méthodes de recherche. D'abord citons l'intérêt pour le processus biologique lui-même. De plus, l'étude des changements séniles du cerveau animal est indispensable aux neuropathologistes pour éviter de confondre les changements spontanés du vieillissement avec ceux produits par des lésions expérimentales chroniques de longue durée. En d'autres mots, l'étude des animaux témoin dans des

expériences chroniques devrait se faire à partir d'une solide connaissance du vieillissement. Récemment (3) il a été de nouveau souligné qu'il est nécessaire d'approfondir la caractérisation soigneuse des lésions observées spontanément dans les animaux âgés tout particulièrement dans les rongeurs qui sont très utilisés dans la recherche sur le vieillissement.

TABEAU I

DIFFÉRENTS TYPES DU VIEILLISSEMENT

- VIEILLISSEMENT PRECOCE
- VIEILLISSEMENT RETARDE
- VIEILLISSEMENT "NORMAL"
- VIEILLISSEMENT DEMENTIEL

Nous pouvons analyser le vieillissement du cerveau à partir de différents points de vue. Le Tableau I présente les différents types de vieillissement d'après le tempo et l'importance des altérations. D'une part il y a des exemples extrêmes de vieillissement précoce, notamment les cas de la progérie (4) et celui du syndrome de Werner (5) qui peuvent servir comme modèles de certains aspects du vieillissement (6,7). Une des caractéristiques de ces patients est l'accumulation de lipofuscine en fonction de l'âge dans nombre de tissus, dont le coeur et le cerveau. Mais il n'y a pas d'évidence d'altérations neurologiques. D'autre part, citons les personnes âgées qui conservent malgré tout leur capacité intellectuelle jusqu'à la fin de leur vie. On pourrait appeler ce

processus vieillissement "normal". En effet, s'il est difficile de définir avec précision quand le vieillissement commence, il est encore plus difficile de prévoir quelle sera son évolution. Il faut aussi signaler le vieillissement démentiel dont la maladie d'Alzheimer est le prototype et dans lequel il y a un processus prédominant de détérioration progressive de la fonction cognitive, qui s'accompagne de perte de mémoire et d'altérations secondaires de la personnalité et du comportement. A l'autre extrême se situe le vieillissement retardé qui inclut les centenaires (8,9,10) qui ont récemment été l'objet d'études systématiques. Mentionnons cependant l'absence, à notre connaissance, de données morphologiques sur les cerveaux de ces personnes. Dans notre analyse nous laisserons de côté les cas extrêmes et nous nous limiterons à la discussion des altérations du vieillissement dit normal et du vieillissement démentiel.

Le but de cet article est donc de présenter les lésions élémentaires classiques du vieillissement du système nerveux en soulignant les précisions, qualifications et limitations introduites récemment dans l'évaluation de ces lésions. Les données qui appuient cette discussion proviennent de l'étude de matériel humain, d'animaux âgés et de différents modèles expérimentaux. Bien entendu, ces modèles sont non pas des modèles de vieillissement expérimental mais plutôt des modèles qui reproduisent de façon expérimentale quelques-unes des lésions trouvées dans le

cerveau en vieillissement. Nous discuterons aussi des lésions autres que celles classiquement décrites, que nous avons trouvées dans une étude faite chez des rats âgés fixés par perfusion intracardiaque de façon à éliminer des artefacts de préparation. Finalement nous discuterons de l'extrapolation de notre étude à la pathologie du vieillissement humain, en attirant votre attention de façon particulière sur une lésion cellulaire dont l'importance dans le vieillissement s'est récemment accrue considérablement et qui, dans sa forme élémentaire est représentée par la vacuolisation intracellulaire et, dans sa forme la plus extrême, devient une des formes du status spongiosus.

Matériel et méthodes

L'étude des lésions humaines a été faite à partir de tissu provenant de personnes âgées de 86, 96, 102 et 105 ans, fixés préalablement pendant plusieurs mois au formaldéhyde. Des échantillons ont été post-fixés au fixateur de Dalton et traités pour l'étude en microscopie électronique. Quelques échantillons provenant du cerveau âgé humain et animal, fixés sans post-osmication ont été préservés pour réaliser une étude histologique conventionnelle, soit par l'enrobage à la paraffine soit par coupes à congélation. Dans ces derniers, le procédé de Kelemen (11) a été utilisé pour mettre en évidence des plaques séniles. En plus, la réaction avec la thioflavine-S et la détection d'auto-fluorescence a aussi été évaluée

dans des échantillons à congélation.

Les lésions "spontanées" des animaux ont été étudiées chez des rats Sprague Dawley âgés de plus de 600 jours. Leurs cerveaux ont été fixés par perfusion intracardiaque de formaldéhyde à 4% et de glutaraldéhyde à 2,5% à pH 7,3, dans du tampon de phosphate. Des échantillons des cortex cérébral et cérébelleux et du bulbe olfactif ont été post-fixés au fixateur de Dalton et inclus dans l'Epon. Les coupes semi-fines ont été colorées par la PPDA (12) ou le bleu de toluidine (13). Les coupes ultra-fines ont été contrastées par l'acétate d'uranyle puis par le plomb selon Venable et Goggeshall (14).

Les modèles expérimentaux utilisés sont: des moelles épinières de chats préalablement traitées par l'application locale d'hydroxide d'aluminium; des cerveaux de rat soumis à de hautes doses de radiation ionisante (rayons X, gamma, protons, et particules alpha); des bulbes olfactifs atrophiés par déafférentation; des cerveaux avec des lésions cryogéniques focales. Pour de plus amples renseignements sur les différents modèles voir: aluminium (15); radiation (16 à 19); lésions cryogéniques (20). Quelques échantillons séchés en utilisant la méthode au point critique (21) ont été recouverts d'une couche d'or palladium pour observation en microscopie électronique à balayage.

TABLEAU II

DONNÉES DE LA NEUROPATHOLOGIE CLASSIQUE

MACROSCOPIE

Epaississement des
méninges

Atrophie:

Diminution du poids
cérébralDilatation ventri-
culaireDilatation des
sillonsContraction des
circonvolutionsAugmentation de
l'espace péricérébral

MICROSCOPIE

Granulations de Meyer

Perte neuronale

Plaques séniles

Dégénérescence neuro-
fibrillaireDégénérescence granulo-
vacuolairePrésence accrue de
lipofuchsine

Altérations amy lacées

Gliose

Altérations vasculaires

Marqueurs morphologiques

Un premier aperçu des lésions du tissu nerveux âgé - les "rides" du cerveau au dire de Ramon y Cajal - est présenté dans le tableau II qui comprend une liste des principales altérations que l'on peut observer dans le vieillissement du cerveau à l'oeil nu ou avec le microscope optique. Déjà, la neuropathologie classique distinguait l'atrophie cérébrale comme un des signes les plus certains de sénescence. Cette atrophie qui prédomine au niveau des hémisphères cérébraux se traduit par: diminution du poids, dilatation ventriculaire et élargissement des sillons et de l'espace

pericérébral. Il y a aussi des altérations macroscopiques des méninges. Au microscope optique, on trouve les granulations de Meyer, une perte neuronale, et une perte des épines dendritiques, la présence de plaques séniles ou neuritiques, de la dégénérescence neurofibrillaire, de la dégénérescence granulovacuolaire, la présence accrue de lipofuchsine, des altérations amyloïdes, de la gliose et des altérations vasculaires. Nous essaierons de suivre ce tableau, en faisant surtout la description ultrastructurale des différentes altérations. Soulignons déjà la difficulté posée par le fait que plusieurs de ces altérations se trouvent à être une conséquence normale du processus d'involution et qu'il est très difficile de faire le diagnostic différentiel entre, par exemple, atrophie d'involution ou atrophie par un processus morbide, dont notamment le vieillissement pathologique. Quelques-unes des altérations citées ici se trouvent de façon plutôt constante dans l'examen des cerveaux âgés de mammifères tandis que d'autres sont plus caractéristiques des démences du type Alzheimer (maladie d'Alzheimer et démence sénile) et sont relativement peu fréquentes dans le processus d'involution biologique ou vieillissement "normal".

Méninges

Des cellules arachnoïdiennes existent à tous les niveaux de la leptoméninge bien qu'elles soient plus abondantes dans la couche externe de la pia-rachnoïde. Ces cellules peuvent se proliférer et

se regrouper en îlots ou amas dans les parties non invaginées de l'arachnoïde, ce qui est très fréquent chez les sujets âgés, tant hommes comme animaux. L'épaississement des méninges est provoqué par la fibrose et par une prolifération arachnoïdienne. Au microscope optique, les proliférations observées chez des personnes âgées et chez des rats âgés ne présentent pas des limites cellulaires définies et on pourrait parler d'un groupement syncytial. En microscopie électronique on peut déceler les membranes plasmiques des prolongements cellulaires superposés qui possèdent les traits de cellules arachnoïdiennes à noyau clair. Dans le cytoplasme on observe des mitochondries, des microfilaments très abondants ainsi que des vacuoles. L'enchevêtrement des processus cellulaires est très serré et on observe des différenciations des membranes plasmiques.

Etant donné que ces proliférations de cellules arachnoïdiennes ont parfois été attribuées à l'effet de microtraumatismes, nous avons essayé d'en produire de façon expérimentale. Des lésions méningocorticales ont été produites par congélation avec une sonde métallique refroidie à l'azote liquide. Ces lésions étaient similaires à celles décrites par Klatzo et coll. (22) et nous-mêmes (23), entre autres, dans le cerveau du rat. Elles sont très superficielles et aux limites bien définies. Des échantillons provenant des cortex lésionné et contralatéral (pour le contrôle) ont été préparés pour des études en microscopie optique et électronique. Pour la période de 6 heures à 3 jours d'évolution, l'aspect histologique

correspond essentiellement à celui d'un infiltrat premièrement à leucocytes polynucléaires, suivi de cellules monocytaires très étroitement regroupées. A une semaine d'évolution, on observe la présence de macrophages abondants, de vaisseaux vides (en raison de la technique de perfusion), de noyaux plus allongés d'allure fibroblastique, et d'aires de débris cellulaires. Pour la période de deux semaines à un mois d'évolution, il y a formation de cavités, dû à l'enlèvement du tissu préalablement congelé. Il y a un épaississement considérable des méninges, avec une fibrose, mais on trouve également que les cellules arachnoïdiennes ont proliféré. Ces cellules ont une tendance à s'enrouler et à former des manchons périvasculaires. A deux mois d'évolution, les amas superficiels de cellules en prolifération sont très nets. Quelques colonnes de cellules pénètrent le tissu nerveux proprement dit; les limites cellulaires sont difficiles à déceler et donnent une image syncytiale. En plus des lésions ci-dessus mentionnées, on trouve des altérations des éléments du parenchyme nerveux (23). Dans les états chroniques suivis pendant une période de sept mois à 381 jours d'évolution, on a observé un arrangement des cellules proliférées en couches superposées, avec, par endroits, une tendance à l'enroulement et à la formation de manchons cellulaires périvasculaires extracérébraux et intracérébraux. L'aspect en tourbillon des proliférations donne une image en MEB semblable à celle des méningiomes humains. Une ligne très osmiophile intensément colorée au PPDA est observée à la périphé-

rie des cordones cellulaires envahissant le parenchyme nerveux.

L'examen ultrastructural des amas superficiels démontre la présence d'un seul type cellulaire bien défini qui possède des caractéristiques qui ressemblent à celles des cellules arachnoïdiennes. Ces cellules sont claires, avec un noyau unique encoché, et de la chromatine régulièrement distribuée. Dans le cytoplasme, on observe de petites mitochondries, des filaments, des sacs de réticulum endoplasmique rugueux, des ribosomes libres et un appareil de Golgi bien développé. Un aspect très caractéristique est présenté par les prolongements cellulaires qui sont d'une épaisseur variable et très égrenés. Les membranes cellulaires, difficilement décelables en microscopie optique, apparaissent très nettement en microscopie électronique, épaissies à de nombreux endroits par des différenciations cellulaires variables. On retrouve des formations desmosomiques, des points de jonction cellulaire, des formations pentalaminaires. Très souvent, des vacuoles avec un contenu de moyenne densité s'ouvrent dans l'espace extracellulaire. Les aires d'espace extracellulaire sont souvent augmentées pour loger des fibres de collagène.

L'examen ultrastructural des nodules périvasculaires démontre qu'il y a deux types bien définis d'éléments cellulaires. L'un possédant les mêmes caractéristiques que les cellules décrites ci-haut. L'autre type de cellule est plus dense aux électrons et possède un nombre plus restreint d'organelles.

Les prolongements des cellules de ce type constituent la majeure partie de la bande dense qui sépare, avec la participation d'une membrane basale, les amas cellulaires du neurogliopile voisin.

En résumé, dans le modèle expérimental que nous décrivons, au stade chronique qui suit la production d'une lésion par congélation, on obtient une prolifération des cellules arachnoïdiennes. Au point de vue histopathologique, ces amas sont composés du tissu arachnoïdien du type épithélioïde ou meningoexothéliale, tel que les granulations arachnoïdiennes de Meyer (24) attribuées depuis Weed (25) au vieillissement et tel que la variété pseudo-syncytial des méningiomes. D'après leur ultrastructure on peut donc qualifier ces proliférations de méningiomatoides. Un point physiopathologique important à éclaircir est la possible implication de ces altérations méningées dans la dynamique du LCR spécialement dans la réabsorption au niveau des villosités arachnoïdiennes.

L'atrophie cérébrale et la perte neuronale

L'atrophie se traduit par une diminution du volume et du poids du cerveau et se caractérise macroscopiquement par l'aspect grêle des circonvolutions, par des sillons élargis et par la dilatation ventriculaire. Le degré d'atrophie est relativement modéré dans le cas du vieillissement "normal" et de la démence sénile; la démence pré-sénile, par contre, entraîne une atrophie diffuse qui est souvent très importante. Récemment Corsellis (26) a signalé que l'atrophie décrite comme étant de 10 à 20% peut

être de seulement 5 à 6% en réalité dû au fait que le poids moyen des cerveaux témoins a augmenté dans ce dernier siècle probablement en relation avec l'accroissement séculaire de la taille moyenne de l'homme. Terry (27) a également trouvé que le poids des cerveaux des patients avec lésions type Alzheimer n'est pas très différent de celui des témoins du même âge. Ces altérations macroscopiques décrites initialement à la table d'autopsie sont aujourd'hui vérifiables chez le vivant et de façon non invasive grâce à la tomographie axiale computerisée (CAT). Cette méthode qui commence à être appliquée à l'étude du vieillissement et de la démence a démontré chez des personnes âgées de plus de 65 ans, comparées à des témoins de 30 et 40 ans, des sillons élargis et de la dilatation ventriculaire. Ces altérations sont aussi évidentes dans les patients atteints de démence sénile (28).

Le substrat microscopique de l'atrophie cérébrale comporte non seulement la perte neuronale dans le sens d'une diminution des péricaryones neuronaux du cortex et des arborisations de leurs prolongements intracorticaux, mais aussi une diminution de la substance blanche (26). Cette altération peut être attribuée en partie à une diminution de l'espace intercellulaire démontrée dans des rongeurs par Bondareff (29).

La perte neuronale est diffuse dans le vieillissement "normal" (30,31) elle est aussi diffuse dans la démence pré-sénile (32). L'application des méthodes de comptage automatique avec des analyseurs

d'image et des ordinateurs n'a pas permis de confirmer pour le moment l'existence d'une perte neuronale (33, 34,27) et a rouvert la question.

Plusieurs chercheurs se sont intéressés aux altérations de la morphologie des corps neuronaux et de leurs prolongements, spécialement l'arborisation dendritique, le nombre d'épines et la synaptologie en relation au processus de vieillissement. Les Scheibels (35) dans une étude de cerveaux avec imprégnations de Golgi, ont trouvé dans les cellules pyramidales corticales une perte de dendrites, surtout les dendrites basales et horizontales. Feldman et Dowd (36) ont trouvé une diminution dans le nombre d'épines accompagnant la perte progressive des dendrites. Mehraein et coll. (37) ont trouvé que cette perte est plus grande dans le vieillissement pathologique que dans le "normal". Par contre, très récemment Connor et coll. (38) ont réalisé une étude chez des rats âgés mais non isolés et ont observé une augmentation du nombre d'épines par unité dans les neurones pyramidales superficielles du cortex occipital et aussi dans le cortex somatosensoriel. Ces observations tendent à prouver que la perte d'épines est plutôt une conséquence de l'isolement et de l'inactivité neurologique que du vieillissement en lui-même.

Etant donné les controverses existant encore relativement à l'évaluation de la perte neuronale, même après l'utilisation des méthodes de comptage automatique, il est important de mentionner des études biochimiques du vieillissement du cerveau

ayant pour objectif non seulement l'étude d'altérations fonctionnelles mais aussi celles des composants cellulaires et sous-cellulaires. Mentionnons entre autres les suivantes: Meier-Ruge et coll. (39) dans une étude de cerveaux humains en vieillissement "normal" ont trouvé une faible perte des neurones qui s'accompagnait d'une diminution importante des enzymes. C.B. Smith (40) a fait l'évaluation de 15 constituants biochimiques dans des cerveaux humains atteints de vieillissement "normal" et pathologique. Dans le lobe temporal, elle a observé une perte neuronale de 50% dans les démences.

Cragg (41) a signalé chez des chats adultes, comparés à des animaux de 5 semaines, une réduction de la densité synaptique du cortex visuel. Les études microchimiques de Bass (cités par Rapport) (42), indiquent une perte très importante des contacts synaptiques et des axons myéliniques chez les cerveaux humains âgés, et signalent le rôle possible du "dying back of neuronal processes" comme un facteur critique dans la démence sénile. Rapport et coll. (42) analysent les perturbations immunologiques qui peuvent être impliquées dans la synaptopathologie du vieillissement.

Quoiqu'il existe encore des points à éclaircir quant au rôle de la perte neuronale, nous ne devons pas oublier que cette perte est progressive et continue. Comme il a été mentionné par Pfeiffer (43), cette perte, même sans donner une symptomatologie appréciable, altère la capacité de réserve du cerveau de telle façon que, à un certain moment, sa réponse

aux agents nocifs endogènes ou exogènes peut se traduire par une altération réversible (délire ou syndrome organique cérébral réversible) ou irréversible (démence ou syndrome organique cérébral irréversible).

Dans le contexte des altérations neuronales (perte ou altérations morphologiques) on croit que les modèles analogues de perte neuronale et de synaptopathologie associée seront utiles à cette étude.

Comme modèle expérimental pour l'étude de la perte neuronale, on a choisi la dégénérescence neuronale par irradiation et l'atrophie par déafférentation. On observe la nécrose de presque 50% des grains du cervelet du rat, 24 heures après une dose de 20,000 roentgens de rayons X ou gamma, ou après des lésions par des protons. Les altérations des grains ne se limitent pas au noyau et au cytoplasme périnucléaire mais s'étendent à toute l'arborisation en produisant la dégénérescence synaptique aux niveaux glomérulaire et moléculaire (16,17,18). Au niveau moléculaire plusieurs terminaux des fibres parallèles en dégénérescence ont été observés en relation synaptique avec une épine de Purkinje. Au niveau du glomérule dans la couche granulaire, on observe des prolongements dendritiques des grains en dégénérescence, densifiés avec des mitochondries altérées et en relation synaptique avec une fibre moussue. Des altérations semblables des grains externes et internes du bulbe olfactif en dégénérescence synaptique ont été observées dans le bulbe olfactif du rat dans des conditions expérimentales

semblables (19).

On peut aussi observer une atrophie très évidente du cortex cérébral du rat, après une irradiation à 6000 rad de particules alpha. Des néurites en dégénérescence sont mises en évidence par la microscopie électronique.

Un exemple très évident d'atrophie corticale est celui observé après la déafférentation chronique du bulbe olfactif du rat.

La résection unilatérale de la muqueuse olfactive chez le rat provoque une atrophie remarquable du bulbe olfactif du même côté. Cette atrophie se manifeste sous la forme d'un amincissement et même d'une disparition de la couche fibrillaire et d'un rétrécissement considérable des glomérules olfactifs. Ces phénomènes donnent lieu à une atrophie qui est même visible à l'oeil nu chez les animaux opérés, quatre mois ou plus après l'intervention.

Dégénérescence neurofibrillaire

La dégénérescence neurofibrillaire consiste en une prolifération et une agglomération des protéines fibreuses du cytoplasme neuronal qui donne des formes bizarres aux cellules qui, à leur tour, deviennent fortement argyrophiles. Elle a été surtout reliée à la démence pré-sénile, mais on l'observe également dans le vieillissement normal (44) aussi bien que dans des processus dégénératifs, tels que la parkinsonnisme postencéphalitique (45), le syndrome de Down (46), la sclérose amyotrophique latérale de l'Ile de Guam (47), la démence pugilistique (48).

La distribution topographique des neurones atteints par la dégénérescence neurofibrillaire est inégale; il y a des cellules comme les Purkinje du cervelet qui ne sont pas touchées par le processus tandis que des neurones de l'hippocampe sont spécialement affectés. On a montré une bonne corrélation quantitative entre ces lésions et la clinique quand il y a un processus démentiel (49,50).

Nous avons étudié cette altération dans le matériel humain et dans des modèles expérimentaux chez l'animal. La dégénérescence neurofibrillaire se reconnaît même dans le matériel humain qui est demeuré pendant plusieurs années dans la formaline. On observe dans ces cas la présence de boucles ou de trousseaux de matériel fibrillaire près du noyau; autour de ces boucles la lipofuchsine et les mitochondries sont abondantes. Quant à la nature de cette altération, les boucles d'Alzheimer se sont montrées comme des amas d'éléments fibrillaires dont les constituants individuels avaient été interprétés initialement comme des neurotubules de 22 nm avec des constriction périodiques chaque 80 nm (51) plutôt que comme des filaments hélicoïdaux couplés. Aujourd'hui par contre, c'est cette dernière interprétation (52) qui s'est avérée juste. En effet, les composants individuels des boucles ont été caractérisés définitivement au moyen d'études en microscopie électronique avec platine inclinée; celles-ci ont montré sans aucun doute qu'il s'agit de filaments couplés et non pas de tubules (53). Ces filaments exclusifs à l'espèce humaine ont 10 nm d'épaisseur et se disposent en paires enroulées en

hélicoïde avec des demi-périodes de 80 nm. Ils sont mentionnés dans les publications comme PHF ("paired Helical filaments"). Les études des fractions des PHF indiquent une masse moléculaire d'environ 51,000 daltons (54). Du point de vue chimique et immunologique ils s'approchent des neurofilaments et des neurotubules (27,55). Leur production expérimentale dans des cultures de tissus foetaux humains du neocortex traités avec des extraits de tissu cérébral affecté par la maladie d'Alzheimer a été récemment signalée par De Boni et Crapper (56).

La distribution régionale de cette altération ainsi bien que de la dégénérescence vacuolaire, des plaques séniles et des corps d'Hirano, dans les cerveaux âgés, démentiels et non démentiels a été le sujet de plusieurs études (57,58,59,60 entre autres). Récemment, Ball (61) a établi pour la dégénérescence neurofibrillaire dans le cortex hippocampique l'ordre de distribution suivante: cortex enthorinal > subiculum > H₁ > plaque terminale > presubiculum > H₂.

Dans les animaux d'expérimentation on peut produire des altérations neurofibrillaires par diverses méthodes. Nous avons opté pour l'application d'hydroxide d'aluminium qui est la méthode la plus simple et la plus sûre pour la production de lésions similaires aux boucles d'Alzheimer. Dans les colorations argentiques on voit des neurones avec des aires cytoplasmiques très argyrophiles. Dans les coupes semi-fines, la présence de plusieurs aires cytoplasmiques claires qui se prolongent jusqu'aux dendrites peut être observée. En microscopie électronique ces aires claires ou pseudo-

vacuoles sont remplies d'amas de nombreux neurofilaments très entassés. Les boucles de neurofilaments peuvent repousser les organelles normaux du cytoplasme vers la périphérie. Quand elles sont observées au plus fort grossissement, on peut voir qu'il s'agit de filaments normaux présents en grand nombre et non de PHF comme dans le cas d'Alzheimer.

Dans les fibres amyéliniques du bulbe olfactif de rats âgés non-traités, nous avons observé la présence accrue de neurofilaments; ce fait peut représenter une autre manifestation des altérations neurofibrillaires du vieillissement.

Les plaques séniles

Les plaques séniles sont la forme la plus complexe de lésion du neuropile. Rappelons qu'on décrit avec ce terme la partie de la substance grise, située entre les pericaryones neuronaux et gliaux, composée d'un enchevêtrement complexe d'axons et de dendrites, de leurs ramifications et de leurs terminaisons. Le neuropile est donc le siège de la grande majorité de synapses et par conséquent son atteinte lésionnelle a des implications importantes dans le réseau des connections interneuronales, dans les fonctions nerveuses supérieures et, éventuellement, dans le psychisme. Décrites initialement par Blocq et Marinresco (62) elles se présentent sous la forme d'amas éosinophiles avec l'hématoxiline-éosine et d'amas argyrophiles avec les imprégnations argentiques. D'un diamètre d'environ 150 μ les PS se présentent

dans le cortex de personnes avec le processus du vieillissement "normal" et en plus grand nombre dans le cas de vieillissement démentiel. On a signalé aussi pour cette altération une distribution topographique. Chez l'hippocampe, les plaques, les boucles d'Alzheimer et la dégénérescence granulo-vascularaire sont plus fréquents. On les observe chez quelques animaux âgés tels que le chien et le singe (63,64) mais ils ne présentent pas de PHF.

En utilisant la coloration argentique de Kelemen (11) les plaques séniles deviennent très évidentes. Quand elles ont un noyau central, on peut observer leur fluorescence avec l'ultra-violet dans des coupes congelées et colorées avec thioflavine. Elles peuvent aussi être identifiées dans les coupes semi-fines du matériel préparé pour la microscopie électronique, après inclusion en résine Epon et coloration avec le bleu de tolouidine ou le PPDA. Avec cette méthode il est possible de reconnaître la participation des axones dégénérés dans la structure des plaques. D'après leur structure elles peuvent être classifiées en trois types: une plaque primitive formée seulement de prolongements neuronaux dégénérés; un deuxième type constitué uniquement de dépôts extracellulaires d'amyloïde et finalement un type complet dit plaque "en cocarde" formé 1) d'un noyau central de fibres d'amyloïde 2) d'une couronne de dendrites et de terminaux axonaux dégénérés contenant des PHF, des lysosomes et des mitochondries altérées et 3) de cellules réactives non neuronales.

La substance amyloïde est interprétée comme étant des dépôts polymérisés et filaments de chaînes légères d'immunoglobulines provenant de la dégradation des complexes antigène-anticorps, probablement par des cellules phagocytaires environnantes (65). Son rôle initial ou tardif dans la pathogénèse de la plaque sénile n'a pas été établi de façon certaine, car nous ne disposons pas encore d'un bon modèle expérimental, même si nous avons observé des plaques primitives dans des animaux après irradiation ainsi que dans des animaux traités par l'aluminium. Nous avons aussi observé des neurites altérées avec des nombreuses mitochondries, filaments et granules de glycogène chez les rats âgés (66).

Lipofuchsine

On appelle lipofuchsine les substances intracellulaires se présentant comme un pigment facilement détectable dans le tissu par des méthodes histochimiques, de fluorescence ou ultrastructurales, et ayant certaines réactions communes avec des graisses. On l'appelle aussi pigment d'usure parce que, augmentant avec l'âge, elle constitue un des éléments le plus constamment retrouvé dans des neurones âgés chez l'animal ou l'humain. Chez les rongeurs la formation de lipofuchsine semble être un processus continu et progressif. D'après Nandy (67) la lipofuchsine présente chez les jeunes animaux est plus facilement colorée avec le Sudan Black B et le PAS et présente une fluorescence jaune-verdâtre. Par contre, chez

les animaux âgés, on trouve une autre forme plus facilement colorée par le Blue Nile et les méthodes ferrique-ferrocyanide et possédant une auto-fluorescence jaune doré. Cette forme mûre est aussi plus résistante aux traitements avec des enzymes et des dissolvants de lipides. L'origine de la lipofuchsine a été attribuée à différents organelles, aux lysosomes et aux mitochondries mais sa déposition est indiscutablement liée aux lysosomes. Chez le rat âgé, on la trouve dans le cytoplasme neuronal ainsi que dans le cytoplasme astrocytaire. On trouve dans ces cas des formations arrondies homogènes et des corps granulaires plus denses, aussi bien que des figures myéliniques. Dans le cytoplasme astrocytaire on observe aussi des granules de glycogène. Après irradiation chez le rat, on trouve une augmentation des images de lipofuchsine dans le corps et des prolongements neuronaux. Les formations de lipofuchsine très osmiophiles sont enveloppées par une membrane simple. Le rôle pathogénique de la lipofuchsine dans le vieillissement est encore mal connu (68). Quelques effets citotoxiques ont été signalés mais en général la déposition de lipofuchsine est considérée comme une conséquence non spécifique et ne semble pas être responsable de la mort neuronale.

Les corps d'Hirano

Les corps d'Hirano, décrits initialement chez des malades de sclérose amyotrophique latérale, se trouvent aussi dans la maladie de Pick, le Kuru, le

vieillissement pathologique et le vieillissement "normal" (47,69). Du point de vue ultrastructural, ils sont composés de filaments de 6 à 10 nm d'épaisseur qui alternent avec des couches de même épaisseur. Ils sont intra ou extraneuronaux; le type cellulaire qui les produit n'est pas encore connu (69). Récemment, Ball (61) a établi pour les corps d'Hirano l'ordre suivant de distribution: $H_1 > \text{subiculum} > H_2 > \text{cortex enthorinal} > \text{endplate} > \text{presubiculum}$. Signalons que les ressemblances dans la distribution topographique des boucles d'Alzheimer, de la dégénérescence granulo-vacuolaire et des corps d'Hirano ont amené cet auteur à poser comme possibilité l'existence d'un mécanisme cytotoxique dans ces régions.

Corps amylicés

Les corps amylicés sont des inclusions arrondies d'environ 5 microns fréquents chez les sujets âgés. Ils se trouvent surtout dans des endroits à proximité du LCR. Leur origine est intracellulaire et gliale. En microscopie électronique on voit qu'ils ne sont pas limités par une membrane. Ils sont formés par des filaments d'environ 9 nm.

Glioses

On observe des glioses en relation au processus du vieillissement "normal". Cette gliose, du point de vue ultrastructural, ressemble à celle observée dans les différentes conditions expérimentales consi-

dérées précédemment. Il y a beaucoup de discussion quant au type de cellule gliale qui en est responsable.

On a observé chez des rats âgés des prolongements astrocytaires bourrés de gliofilaments dans la couche limitante externe du cortex cérébral, la présence de formations lamellaires concentriques et une abondance de glycogène dans le cytoplasme glial.

La dégénérescence granulovacuolaire et vacuolaire

On observe la dégénérescence granulovacuolaire de Simchowicz (70) surtout dans les neurones de la corne d'Ammon, dont le matériel est autopsique et pauvrement conservé. Cette altération consiste en de petites vacuoles claires intracellulaires, de 4 à 5 microns de diamètre et aussi en des grains argyrophiles. En microscopie électronique on observe une ou plusieurs vacuoles claires et limitées par une membrane de structure trilamellaire; à l'intérieur, on trouve un amas central d'une substance granulaire très dense aux électrons. La pathogénèse et la signification biologique de cette altération cellulaire si caractéristique du cerveau âgé, surtout pathologique, sont très peu connues. Récemment d'autres formes de dégénérescence vacuolaire, dont la dégénérescence spongiforme du neurogliopile, ont été reliées au vieillissement normal ou dementiel.

Autres marqueurs

Pour compléter notre brève révision des possibles marqueurs spécifiques du vieillissement pathologique,

mentionnons deux paramètres biochimiques qui ont attiré récemment l'attention des chercheurs: l'aluminium et certaines enzymes. L'aluminium (71) semble être plutôt un marqueur de vieillissement (72) que de la démence, tandis que dans cette dernière, on trouve une grande diminution d'acétylcholine transférase (73), marqueur de neurones cholinergiques, qui se maintient stable dans des conditions agoniques ou post-mortem indiquant donc une perte des neurones cholinergiques ou bien l'altération de leur capacité de synthèse enzymatique.

Relations nosologiques

Des études faites par l'entremise de méthodes quantitatives et de méthodes expérimentales dans plusieurs centres de recherche pendant la dernière décennie ont permis de mieux établir les relations nosologiques entre le vieillissement "normal", la démence sénile et la maladie d'Alzheimer d'une part et les démences transmissibles à virus d'autre part (74,75,76). La compilation, la confrontation et l'évaluation des données ainsi obtenues ont permis récemment de formuler les hypothèses suivantes. Premièrement, il semble que le vieillissement dit normal et la démence sénile ne sont que les deux extrémités d'un spectre continu tant du point de vue lésionnel que clinique (Tableau III). En effet, les boucles (BA), les plaques séniles (PS) et la dégénérescence granulovacuolaire (DGV) se trouvent dans les deux cas, les différences entre les deux n'étant

TABLEAU III

		B.A.	P.S.	D.G.V.	S.S.
SPECTRE CONTINU	①. VIEILLISSEMENT "NORMAL"	★	★	★	
	②. D.S.T.A. (après 65a)	☆	☆	☆	
	③. M.A. (avant 65a)	⊙	⊙	⊙	☆
	④. M.C.J.	☆			⊙
démence à virus lents	⑤. Kuru		☆		⊙
CHEVAUCHEMENT LÉSIONNEL ET PATHOGENIQUE					

que quantitatives. Deuxièmement, la forme non vasculaire ou parenchymateuse de la démence sénile, appelée maintenant démence sénile type Alzheimer (DSTA) et la maladie d'Alzheimer ne seraient que deux expressions de la même entité que certains chercheurs appellent complexe DSTA-MA ("SDTA-AD complex") ou tout simplement maladie d'Alzheimer (forme sénile et forme pré-sénile). La seule différence entre les deux formes serait l'âge de l'apparition des symptômes, arbitrairement fixé à 65 ans. Troisièmement, il y a de plus en plus de preuves de l'existence d'un chevauchement tant lésionnel que pathogénique entre la maladie d'Alzheimer dont on ignore la cause et les démences à virus. Ces données ne font qu'accentuer les facteurs possibles environnementaux versus génétiques dans la cause de ces lésions. En effet, des travaux récents ont montré la présence de PS dans le Kuru et son équivalent animal, la tremblante du mouton. Aussi les BA ont été observé dans le C-J au Japon; en outre, la dégénérescence spongiforme type C-J a été démontrée dans des biopsies de maladie d'Alzheimer. De plus une encéphalopathie spongiforme transmissible a été induite chez des singes qui ont été inoculés avec du tissu provenant de malades atteints d'Alzheimer (77).

Autres lésions

Dans le contexte ci-haut exposé, nous croyons utile de rapporter nos observations sur des altérations du tissu nerveux âgé autres que celles classi-

quement décrites. Ces observations proviennent non seulement d'études de tissu humain d'autopsie mais aussi de l'étude de 60 rats Sprague-Dawley âgés de 2 semaines à 2 ans. En plus des altérations bien connues par des études antérieures, nous avons trouvé: 1) une augmentation des granules de glycogène dans les prolongements gliaux et neuronaux 2) des rudiments de PS formés par des prolongements neuronaux, isolés, bourrés de mitochondries, de filaments et de granules de glycogène; 3) des corps membraneux astrocytaires; 4) une augmentation des neurofilaments dans les fibres amyéliniques et finalement 5) des lésions de vacuolisation du corps cellulaire et des prolongements neuronaux (78). Les vacuoles sont décelées facilement dans des coupes enrobées à l'Epon colorées à la paraphénylénédiamine (PPDA) ou au bleu de toluidine aussi bien que dans les coupes à paraffine colorées avec l'hématéine-éosine ou le Kluver-Barrera. Cette altération a été observée dans 12 rats âgés de 2 ans, surtout dans le cortex cérébral et dans les neurones des différents noyaux thalamiques. Des vacuoles isolées ou en groupes ont été retrouvées. En microscopie électronique, les vacuoles plutôt circulaires étaient nettement délimitées par une membrane lipoprotéique à structure trilamillaire. Les vacuoles multiples étaient soit séparées par des ponts cytoplasmiques fins, soit en contiguïté par la juxtaposition des membranes. Leur contenu est faiblement osmiphilique, généralement homogène mais parfois flocculant. Le cytoplasme entou-

rant les vacuoles présente une dispersion ou une diminution des polysomes libres et du réticulum endoplasmique rugueux. Des études biochimiques faites dans le laboratoire de V. Murthy (communication personnelle) sur les éléments ribosomales attachés aux membranes ou libres dans le cytoplasme chez des rats Sprague Dawley de 2 ans et de 2 semaines, montrent une augmentation de monomères et une diminution très marquée des polysomes attachés aux membranes dans les rats de 2 ans. Le même phénomène mais moins intense, se produit dans le cas de ribosomes libres. Il existe donc une corrélation étroite entre ces données biochimiques et nos données ultrastructurales.

La nature neuronale des cellules atteintes est confirmée par leur ultrastructure et par la présence des contacts synaptiques. La présence de matériel flocculant dans quelques-unes de ces vacuoles nous fait avancer l'hypothèse que les vacuoles décrites ci-dessus sont ou peuvent être l'expression de la DGV chez l'animal. L'intérêt de cette étude chez l'animal est renforcé du fait qu'elle permet d'éviter les artefacts inhérents au tissu provenant des autopsies humaines. A l'encontre de cette interprétation, il faut mentionner une distribution topographique plus étendue que dans la DGV humaine et l'absence de pigments au voisinage des vacuoles. Une autre possibilité est que cette vacuolisation intracellulaire représente la forme élémentaire d'une lésion qui, dans son expression la plus extrême, devient la forme neuronale du status

spongiosus, telle que décrite dans la maladie d'Alzheimer par Rewcastle et d'autres (79,80) et que nous avons également observée dans le neurogliopile du cortex cérébral provenant du matériel autopsique de vieillards âgés de 96 et de 105 ans (81). Dans ces cas, la dégénérescence prenait deux formes: a) une vésiculisation axoplasmique b) des grosses vacuoles, type C-J dans le neurogliopile. S'agit-il d'un marqueur du vieillissement ou bien d'un artefact? La discussion reste ouverte. Dans le matériel humain, il est plus difficile d'écarter cette dernière possibilité. Dans les animaux fixés par perfusion, la vacuolisation est au contraire une réalité indiscutable.

Nous voulons mentionner à titre spéculatif la dite "hypothèse membranaire" du vieillissement énoncée par Nagy (82). En effet, nous pourrions envisager la vacuolisation comme un cas particulier d'atteinte membranaire et du même coup expliquer les changements du réticulum endoplasmique rugueux et des polysomes, par une altération de la synthèse protéique résultant des altérations ioniques provoquées par les modifications, produites par le vieillissement, de la perméabilité de la membrane cellulaire.

Conclusion

Quelle est la signification des lésions décrites ci-dessus? Elle est double. Comme nous avons mentionné, sur le plan médical, l'étude quantitative de

ces lésions traitées dans plusieurs centres a permis l'analyse nosologique des démences de type parenchymateux qui sont d'une part en relation avec le vieillissement "normal" et, d'autre part, avec les démences à étiologie connue. Sur le plan biologique, les plaques séniles et les autres lésions du neuropile sont interprétées en général comme la traduction à distance de processus de dégénérescence et mort cellulaire. La dégénérescence neurofibrillaire traduit une altération profonde du métabolisme protéique intracellulaire. La dégénérescence granulovacuolaire et vacuolaire sont probablement liées à des altérations dans les systèmes de membranes intracellulaires. Mais les mécanismes fondamentaux dans la production de ces lésions sont encore un défi non relevé tant au niveau cellulaire que moléculaire. Et ceci malgré l'étude intensive dont elles sont présentement l'objet et malgré la "longévité" centenaire des recherches sur leur nature.

Références

1. Ramon y Cajal, S.: El mundo visto a los ochenta anos. Madrid, 1934, réédition dans: Obras literarias completas Madrid. Aguilar, 1950, p. 285.
2. Benitez-Bribiesca, L.: Los procesos de envejecimiento cerebral. *Patologia* 11, 57, 1973.
3. Cohen, B., Anver, M.R., Ringler, D.H. et Adelman, R.C.: Age associated pathological changes in male

- rats. Federation Proceedings 37, 2848, 1978.
4. Atkins, S.: Progeria, report of case with post-mortem findings. New England Journal of Medicine, 250, 1065, 1954.
 5. Epstein, C.J., Martin, G.M., Schultz A.L. et al: Werner's syndrome: a review of its symptomatology, natural history, pathologic features, genetics and relationship to the natural ageing process. Baltimore 45: 177, 1966.
 6. Beadle, G.F., Mackay, I.R., Whittingham, S. Taggart, G., Harris, A.W., Harrison, L.C.: Werner's syndrome. A model of premature aging? Journal of Medicine 9: 377, 1978.
 7. Villee, D., Powers, L.: Progeris: a model for the study of aging. In: Senile Dementia A biomedical approach. K. Nandy(ed) Elsevier Press 1978, p. 259
 8. Leaf, A.: Age isolates. The Saul R. Korey Memorial Symposium: The aging of the brain. Albert Einstein College of Medicine, 1973.
 9. Leaf, A.: Introduction. In: Biology of Aging. XI Annual "Clinical Day" Jewish General Hospital, Montreal, 1974.
 10. Leaf, A.: Youth in old age. McGraw Hill, New York, 1975.
 11. Kelemen, J.: A new rapid method for the demonstration of senile plaques and Alzheimer's neurofibrillary changes. Eur neurol 95: 287, 1973.

12. Estable-Puig, J.F., Bauer, W., Blumberg, J.M.: Paraphenylenediamine staining of osmium-fixed plastic embedded tissue for light and electron microscopy *Journal Neuropath exp Neurol* 24: 531, 1965.
13. Trump, B., Smuckler, E.A., Benditt, E.P.: A method for staining epoxy sections for light microscopy. *Journal Ultrastr Res* 5: 343, 1961.
14. Venable, J.H., Goggeshall, R.: A simplified lead citrate stain for use in electron microscopy *Journal Cell Biol* 25: 407, 1965.
15. De Estable-Puig, R.F., Estable-Puig, J.F., Romero, C. Estable, A.B.: Pathological study of the cat spinal cord after chronic local implantation of aluminium hydroxide III Electron microscopy of neuronal and glial changes *Exptl Pathol* 10: 184, 1975.
16. De Estable-Puig, R.F., Estable-Puig, J.F.: Cerebellar synaptic degeneration by X rays. *Brain Res* 21: 289, 1970.
17. Estable-Puig, J.F., De Estable-Puig, R.F.: Differential neuronal radio-sensitivity as a tool for the study of short connections *Experientia* 26: 1250, 1970.
18. De Estable-Puig, R.F., Estable-Puig, J.F.: Fine structural study on the response of the cerebellar cortex to acute radiation injury *Exptl Pathol* 9: 231, 1974.
19. De Estable-Puig, R.F., Estable-Puig, J.F.: Cell

- response of the olfactory bulb to ionizing radiation injury. An electron microscopy study. *Acta neuropath* 17: 287, 1971.
20. De Estable-Puig, R.F., Estable-Puig, J.F.: Meningiomatoid proliferation of arachnoidal cells after focal brain injury *Exptl Pathol* 9: 37, 1974.
21. De Estable-Puig, R.F., Ligatto de Slobodrian, M.L., Estable-Puig, J.F., Genest, P., Bonenfant, J.L.: Méthode de séchage au point critique pour l'observation des échantillons biologiques au microscope électronique à balayage. *La Vie Méd. Canada Français* 5: 544, 1976.
22. Klatzo, Piraux, A., Laskowski, E.J.: The relationship between edema, blood-brain barrier and tissue elements in a local brain injury *Journal Neuropath Exp Neurol* 4: 548, 1958.
23. Estable-Puig, J.F., De Estable-Puig, R.F.: Paralesional reparative remyelination after chronic local cold injury of the cerebral cortex. *Exp Neurol* 35: 239, 1972.
24. Meyer, L.: Die Epittelgranulationen der Arachnoidea. *Virchows Arch F path Anat*, 17: 209, 1859.
25. Weed, L.H.: The cells of the arachnoid. *Johns Hopkins Hospital Bull* 31: 343, 1920.
26. Corsellis, J.: Some observations on the Purkinje cell population and on brain volume in human aging. In: *Neurobiology of aging* Terry R. and Gershon S. (eds) New York Raven Press 1976 *Aging* vol. 3, p. 205.

27. Terry, R.: Senile Dementia. Federation Proceed 37: 2837, 1978.
28. Gado, M., Hughes, Ch. P.: Computerized tomography scan in the diagnosis and management of senile dementia. In: Senile Dementia: Abiomedical approach K. Nandy (ed) Elsevier Press 1978, p. 223.
29. Bondareff, W.: Age changes in the neuronal microenvironment. In: Development and Aging in the Nervous System. M. Rockstein (ed) New York, Academic Press 1973, p. 1.
30. Tomlinson, B.E.: Morphologic brain changes in non-demented old people. In: Aging of the Central Nervous System Biological and Physiological Aspects. N.M. Praag, A.F. Kalverboer (eds) Bohn-Haarlem 1972, p. 38.
31. Tomlinson, B.E. Blessed, G., Roth, M.: Observations on the brains of non-demented old people. Journal Neurol Sci 7: 331, 1968.
32. Colon, E.J.: The cerebral cortex in presenile dementia. A quantitative analysis Acta neuropath 23: 281, 1973.
33. Tomlinson, B.E. and Henderson, G.: Some quantitative cerebral findings in normal and demented old people. In: Neurobiology of Aging. R.D. Terry and S. Gershon (eds), New York, Raven Press 1977, vol. 3, p. 183.
34. Terry, R.D., Fitzgerald, C., Peck, A., Millner, J. and Farmer, P.: Cortical Cell counts in senile

dementia Abstract 53rd Ann Meet Am Assoc Neuropathol Chicago, II, 1977.

35. Scheibel, M.E., Lindsay, R.D., Tomayasu, U., Scheibel, A.B.: Progressive dendritic change in aging human cortex. *Exp Neurol* 17: 392, 1975.

36. Feldman, M.L. and Dowd, C.: Aging in rat visual cortex. Light microscopic observations on layer V pyramidal apical dendrites *Anat Rec* 178: 355, 1974.

37. Mehraein, P., Yamada, M. and Tarnowska-Dziduszek, E.: Quantitative study on dendrites and dendritic spines in Alzheimer's disease and senile dementia. In: *Physiology and Pathology of dendrites*. G.W. Kreutzberg (ed), New York, Ravens Press 1975, *Adv in Neurol* 12: p. 453.

38. Connor, J.R., Beban, S.E., Hansen, B., Hopper, P., Diamond, M.C.: Dendritic increases in the aged rat somatosensory cortex. Abstract 10th Annual Meet Neurosciences Cincinnati, Ohio, 1980, p. 739.

39. Meier-Ruge, W., Hunziken, O., Iwangoff, P., Reichlmeier, K., and Sandoz, P.: Alterations of morphologic and neurochemical parameters of the brain due to normal aging In: *Senile dementia: a biomedical approach* K. Nandy (ed) Elsevier Press 1978, p. 33.

40. Smith, C.B.: Studies on Biochemical changes in aging brain In: *Senile Dementia: A biomedical approach*. K. Nandy (ed) Elsevier Press 1978, p. 45.

41. Cragg, B.G.: The density of synapses and neurons in normally, mentally defective and ageing human brains *Brain* 98: 81, 1975.
42. Rapport, M.M. and Karpiak, S.E.: Immunological perturbation of neurological functions. In: *Senile Dementia A biomedical Approach* K. Nandy (ed) Elsevier Press 1978, p. 73.
43. Pfeiffer, E.: Clinical manifestations of Senile Dementia In: *Senile Dementia: a biomedical Approach* K. Nandy (ed) Elsevier Press 1978, p. 171.
44. Matsuyama, H., Namiki, H., and Watanabe, I.: Senile changes in the brain in the Japanese Incidence of Alzheimer's neurofibrillary change and senile plaques. In: *Proceedings of the Fifth International Congress of Neuropathology*. F. Luthy and A. Bischoff (eds) Amsterdam Excerpta Medica Series #1100, 1966, p. 979.
45. Wisniewski, H., Terry, R.D. and Hirano, A.: Neurofibrillary pathology *Journal Neuropath exp Neurol* 29: 163, 1970.
46. Burger, P.C., Vogel, F.S.: The development of the pathologic changes of Alzheimer's disease and senile dementia in patients with Down's syndrome. *Amsterdam Journal Pathol* 73: 457, 1973.
47. Hirano, A., Dembitzer, H.M., Kurland, L.T., Zimmerman, H.M.: The fine structure of some intraganglionic alterations: neurofibrillary tangles, granulovacuolar bodies and rod like structures as seen in Guam amyotrophic lateral sclerosis and

Parkinsonism-dementia complex. *Journal Neuropath exp Neurol* 27: 167, 1968.

48. Wisniewski, H.M., Narang, H.K., Corsellis, J., and Terry, R.D.: Ultrastructural studies of the neuropil and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease and post-traumatic dementia. Abstract 52nd Ann Meet American Association neuropathol San Francisco, CA 1976.

49. Blessed, G., Tomlinson, B.E. and Roth, M.: The association between quantitative measures of dementia and of senile changes in the cerebral grey matter of elderly subjects *Br Journal Psychiatry* 114: 797, 1968.

50. Farmer, P.M., Peck, A., and Terry, R.D.: Correlations among numbers of neuritic plaques Neurofibrillary tangles and the severity of senile dementia Abstract 52nd American Meet Association Neuropath San Francisco CA 1976.

51. Terry, R.D.: The fine structure of neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease *Journal Neuropath Exp Neurol* 22: 629, 1963.

52. Kidd, M.: Paired helical filaments in electron microscopy in Alzheimer's disease *Nature, London*, 197: 192, 1963.

53. Wisniewski, H.M., Narang, H.K., and Terry, R.D.: Neurofibrillary tangles of paired helical filaments. *Journal Neurol Sci* 27: 173, 1976.

54. Iqbal, K., Wisniewski, H.M., Shelanski, M.L., Brostoff, S., Liwnicz, B.H., Terry, R.D.: Protein changes in senile dementia *Brain Res* 77: 337, 1974.
55. Iqbal, K., Grundke-Iqbal, I., Wisniewski, H.M., Terry, R.D.: Chemical relationship of the paired helical filaments of Alzheimer's dementia to normal human neurofilaments and neurotubules *Brain Res* 142: 231, 1978.
56. De Boni, U., and Crapper, D.R.: Paired helical filaments of the Alzheimer type in cultured neurons. *Nature (London)* 271: 566, 1978.
57. Hirano, A., and Zimmerman, H.M.: Alzheimer's neurofibrillary changes. A topographic study *Arch Neurol* 7: 227, 1962.
58. Dayan, A.D.: Quantitative histological studies of the aged human brain. I Senile plaques and neurofibrillary tangles in "normal" patients. *Acta neuropath* 16: 85, 1970.
59. Ball, M.J.: Neurofibrillary tangles and the pathogenesis of dementia: a quantitative study. *Neuropath Appl Neurosc* 2; 395, 1976.
60. Kemper, T.L.: Senile Dementia: a focal disease in the temporal lobe. In: *Senile Dementia A Biomedical Approach* K. Nandy (ed) Elsevier Press 1978, p. 105.
61. Ball, M.J.: Histotopography of cellular changes in Alzheimer's disease. In: *Senile Dementia: A biomedical approach* K. Nandy (ed) Elsevier Press 1978, p. 89.

62. Blocq, P., Marinesco, G.: Sur les lésions et la pathogénie de l'épilepsie dite essentielle. *Semin Med* 12: 445, 1892.
63. Wisniewsky, H.M., Ghetti, B., and Terry, R.D.: Neuritic (senile) plaques and filamentous changes in aged rhesus monkeys *Journal Neuropathol Exp Neurol* 32: 566, 1973.
64. Wisniewski, H.M., Johnson, A.B., Raine, C.S., Kay, W.J. and Terry, R.D.: Senile plaques and cerebral amyloidosis in aged dogs. A histochemical and ultrastructural study. *Lab Invest* 23: 287-296, 1970.
65. Glenner, G.G., Page, D., Iversky, C., Harada, M. et al.: Murine amyloid fibril protein Isolation, purification and characterization *Journal Histochem Cytochem* 19: 16, 1971.
66. De Estable-Puig, R.F., Estable-Puig, J.F., Purriel, J.A.: Envejecimiento cerebral *Acta Neurol Latinoamer* 25: 167, 1979.
67. Nandy, K.: Morphologic changes in the aging brain In: *Senile Dementia: a biomedical approach* K. Nandy (ed) Elsevier 1978, p. 19.
68. Brody, H.: The Nervous System and Aging. In: *Aging Cancer and Cell Membranes* Borek C., C.M. Fenoglio, D.W. King (eds) Thieme Stratton Inc New York 1980, p. 200.
69. Gibson, P.E., Tomlinson, B.E.: Numbers of Hirano bodies in the hippocampus of normal and demented people with Alzheimer's disease *Journal*

Neurol Sci 33: 199, 1977.

70. Simchowicz, T.: Histopathologische Studien
uber die senile Demenz. In: Histologie und histo-
pathologische Arbeiten uber die grosshirnrinde.
Niss F, Alzheimer A (eds) Fischer Jean 1911, p. 267.

71. Crapper, Dr, Krishnan, S.S., Dalton, A.J.:
Brain aluminium distribution in Alzheimer's disease
and experimental neurofibrillary degeneration
Science 180: 511, 1973.

72. Davies, P. and Maloney, A.J.R.: Selective loss
of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease
Lancet 2: 1403, 1976.

73. McDermoth, J.R., Smith, A.I. Iqbal, K. and
Wisniewski, H.M.: Aluminium and Alzheimer's disease
Lancet 2: 710, 1977.

74. Katzman, R., Terry, R.D., and Bick, K.L.:
Alzheimer's disease, Senile Dementia and related
disorders, New York, Raven Press 1978.

75. Traub, R.D., Gajdusek, D.C., Gibbs, C.J. Jr
Transmissible virus dementias, The relation of
transmissible spongiform encephalopathy to Creutz-
feldt-Jakob disease In: Aging Dementia and Cerebral
Function M Kinsbourne and L. Smith (eds) Ch C.
Thomas Publ. Springfield, II Spectrum Publishing
Co. Flushing, New York 1977.

76. Gajdusek, D.C., Unconventional viruses and the
origen and disappearance of kuru Science 197: 4307:
943, 1977.

77. Rewcastle, N.B., Gibbs, C.J. and Gajdusek, D.C.: Transmission of familial Alzheimer's disease to primates *Journal Neuropath Exp Neurol* 37: 679, 1978.
78. De Estable-Puig, R.F. and Estable-Puig, J.F. Vacuolar degeneration in aging rats *Virchows Arch B Cell Path* 17: 337, 1975.
79. Flament-Durand and Couck, A.M.: Spongiform Alterations in Brain Biopsies of Presenile Dementia *Acta Neuropathol* 46: 156-162, 1979.
80. Rewcastle, N.B.: Creutzfeldt-Jacob like vacuolar changes in the cerebral cortex in Alzheimer's disease. 19th Réunion annuelle de l'Association Canadienne des Neuropathologistes, Magog, 1979.
81. De Estable-Puig, R.F. et Estable-Puig, J.F.: Données récentes sur la neuropathologie du vieillissement *La Vie Médicale au Canada Français* 9: 316, 1980.
82. Nagy, I.Z., The role of membrane structure and function in cellular aging: A Review In *Mechanisms of Ageing and Development* 9: 237, 1979.

MÉCANISMES MOLÉCULAIRES DUVIEILLISSEMENT CELLULAIRE

Robert Shmookler Reis et Samuel Goldstein, Départements de médecine et de biochimie, McMaster University, Hamilton.

Au cours de cette présentation, nous discuterons de résultats obtenus dans notre laboratoire et dans d'autres, justifiant l'utilisation de fibroblastes en culture comme modèle des modifications cellulaires associées au vieillissement de l'organisme tout entier. Je ferai aussi état d'indices quant à la nature de l'horloge biologique qui détermine la progression de la sénescence physiologique. Je présenterai enfin des travaux très récents sur des modifications du DNA au cours du vieillissement chez le fibroblaste, suggérant un mécanisme moléculaire possible quant au fonctionnement de cette horloge biologique.

1. La longévité répllicative limitée des fibroblastes diploïdes humains: un modèle du vieillissement biologique

Les fibroblastes diploïdes humains ne peuvent pas se répliquer indéfiniment en culture, contrairement aux lignées cellulaires aneuploïdes transformées. Quelques soient les milieux de culture et la façon de

manipuler ces cellules, elles vont proliférer de plus en plus lentement au fur et à mesure des repiquages, jusqu'à l'inévitable arrêt de toute replication ^{1,2}.

Le nombre maximum de replications est inversement proportionnel à l'âge du donneur ^{3,4} (Fig. 1), bien qu'il y ait des écarts considérables dans cette corrélation, probablement dus à l'hétérogénéité génétique de la population. Certains désordres génétiques accélérant la senescence (progérie, syndrome de Werner) sont caractérisés par des réductions variables de la longévité des fibroblastes. Beaucoup d'autres états physiologiques où l'individu a une santé déficiente, comme le diabète, se reflètent par une réduction du potentiel prolifératif des fibroblastes ⁷. La grande variation dans la capacité de multiplication des fibroblastes en culture dérivés de donneurs choisis au hasard peut donc constituer une preuve de l'hétérogénéité de la population quant aux vitesses de sénescence physiologique.

Il y a une corrélation directe entre la longévité maximale d'une espèce in vivo et celle de ces fibroblastes in vitro ^{2,8}. Chez la souris, qui ne vit pas plus de 3 ans, les fibroblastes épidermiques ont une limite de 20 duplications cellulaires, lorsque cultivés in vitro. Par contre, les tortues des Galapagos, qui vivent jusqu'à 150-200 ans, ont des fibroblastes épidermiques qui prolifèrent durant 50 à 60 duplications.

En résumé, il existe une corrélation entre la longévité d'un individu et celle de ses fibroblastes in vitro. Ce système constitue donc un modèle expérimental

utile dans l'analyse des origines du vieillissement biologique et des maladies associées à l'âge.

2. La nature de l'horloge biologique

On a récemment clarifié un point important au sujet de la longévité limitée des fibroblastes: à savoir si la longévité proliférative dépend d'événements reliés à la division cellulaire, de telle sorte que toutes les cellules ont une limite critique maximale du nombre de générations cellulaires. Ou, au contraire, si l'épuisement du potentiel prolifératif est lié à un "horaire métabolique" indépendant de la division cellulaire. Deux études ont été publiées et contribuent à clore le débat. La première ⁴ se base sur le fait qu'en réduisant de 10 à 0.5% la concentration de sérum dans le milieu de culture, en provoque un arrêt quasi virtuel de la synthèse de DNA et de la mitose, tout en préservant, cependant, la viabilité cellulaire. Après avoir maintenu des cultures dans cet état stationnaire auront 6 mois (ce qui représente la durée maximale de prolifération continue de ces cellules), on ramène ensuite la concentration de sérum aux 10% habituels. Ces cultures reviennent à leur taux de prolifération normale et atteignent le même nombre de duplication que des cellules n'ayant pas été privées de sérum. Dans l'autre étude ¹⁰, on maintient les cellules dans un milieu de croissance normal (contenant dans ce cas, 15% de sérum de fœtus de veau) mais leur croissance est inhibée par confluence. On renouvelle cependant le milieu de culture chaque

semaine. Après cela, on dégage les cellules de la phase stationnaire et on les soumet à une culture continue. Elles atteignent le même nombre de duplication, avant de s'éteindre, que des cellules cultivées sans période d'interruption. Dans ces deux expériences, l'augmentation de temps de vie était très significative. Cela montre clairement que les cellules comptent chaque ronde de division cellulaire plutôt que tout autre type d'événement métabolique.

Dans notre laboratoire, des expériences plus récentes ont confirmé et étendu ce concept de décompte replicatif. Brièvement, ce travail consiste à inoculer une petite goutte contenant quarante mille (40,000) cellules au milieu d'un plat de pétri. Au cours de l'incubation, les cellules adhèrent puis prolifèrent de façon radiale. Cette croissance radiale est linéaire en fonction du temps. Par autoradiographie de l'incorporation de thymidine tritiée, servant d'index de la synthèse de DNA, on peut montrer que la replication d'ADN ne se produit que chez les cellules occupant un mince anneau en périphérie. Après trois ou quatre semaines, le taux de croissance de ces cellules périphériques diminue et finit par s'arrêter, à cause de la sénescence.

Nous nous attendions à ce que les cellules ayant un nombre de génération cellulaire croissant soient ordonnées en anneaux concentriques de rayons croissant. Nous avons démontré que c'était en fait le cas, en repiquant des cellules prélevées à différentes distances au centre et en comparant leur potentiel de division qui leur restait. Nous avons observé un déclin

de 1.33 dédoublement de population (P.D.) par mm de rayon, ce qui est très près de la valeur que nous avions prévue à 1.55 PD/mm.

Ces expériences montrent toutes que la longévité cellulaire est mesurable en terme de division cellulaire plutôt que de temps métabolique. Quelle pourrait donc être la nature de l'horloge moléculaire qui enregistre le nombre cumulatif de division cellulaire? Il semble dès maintenant improbable que l'accumulation d'erreurs puisse intervenir dans ce processus. En effet, si des enzymes défectueux ou des produits incorrects de réaction menaient à la sénescence, leur accumulation devrait dépendre du temps métabolique. De plus, on a des mesures expérimentales directes des erreurs dans la synthèse protéique, *in vivo* et *in vitro*, démontrant clairement que de telles erreurs n'augmentent pas au cours de la culture des fibroblastes ^{12,13}. Le fait que la longévité cellulaire soit mesurée en terme de division cellulaire suggère plutôt que les limites de prolifération implique, d'une façon ou d'une autre, le processus replicatif ou le matériel génétique lui-même.

3. Les séquences d'ADN répétitif enregistre le nombre de répllication du génome

Il semble probable que le fonctionnement d'une telle horloge se situe dans l'ADN qui doit normalement se répliquer une fois par ronde de division cellulaire. Nous avons observé que certaines séquences réitérées

d'ADN diminue régulièrement au cours des repiquages successifs des fibroblastes ¹⁴. Nous avons tout d'abord observé, la disparition, durant le dernier repiquage, de deux bandes de restriction obtenues après digestion complète à l'Eco-RI d'ADN humain (Fig. 3), chez trois souches de fibroblastes diploïdes. Ces pertes sont de l'ordre de 0.6 à 1% par duplication de population (P.D.).

Pour deux de ces souches, nous avons aussi démontré ce déclin par hybridation à saturation d'une séquence purifiée. Pour ce faire, nous avons tout d'abord isolé la bande Eco-RI de 340 paires de base de l'ADN humain et nous l'avons reclinée avec l'endonucléase Hae III, obtenant un fragment extrêmement pur de 290 paires de base. Nous avons ensuite transcrit ce fragment avec la RNA polymérase d'E. coli en cDNA tritié. Nous avons ensuite hybridé diverses concentrations en excès de ce cDNA avec du cDNA-C ¹⁴ total de fibroblaste humain. Ces résultats indiquent clairement une diminution de 50% de cette séquence après 41 duplications de population (P.D.) soit, en moyenne, 1.2% par P.D.

Par des cinétiques de reassociation ADN-ADN en solution, suivies d'une digestion avec la nucléase S-1, spécifique aux acides nucléiques monocaténares, nous avons trouvé que cet épuisement, durant des repiquages en série, est une caractéristique commune à plusieurs séquences hautement répétitives, même si nous avons observé que des séquences moins répétitives tendaient plutôt à augmenter au cours de la culture des fibroblastes.

Les principales séquences réitérées qui décroissent régulièrement dans le génome, en fonction de l'âge, sont localisées dans l'hétérochromatine du centromère de tous les chromosomes humains, sauf le Y ¹⁶. Elles existent en séquences répétées de longueur considérable ¹⁴, pouvant donc servir de "compteur" moléculaire des cycles de synthèse d'ADN, la fin de la longévité survenant lorsqu'un nombre limite de copie par centromère est atteint. Comme on l'a rapporté récemment ¹⁷, des recombinaisons inégales entre ces séquences peuvent fournir un élément stochastique dans le potentiel de duplication cellulaire.

Conclusion

De toutes évidences, la longévité proliférative des fibroblastes reflète les processus responsables du vieillissement de l'organisme. Le vieillissement des fibroblastes en culture nous a permis de distinguer le temps métabolique du potentiel de division et d'établir que seules les répliquations des cellules sont enregistrées pour la détermination de leur longévité. Un processus similaire de décompte peut aussi être très important chez les autres cellules se répliquant *in vivo*. On a aussi démontré que le nombre des séquences répétitives de DNA diminue au cours de la culture de cellules, fournissant un mécanisme moléculaire à cette horloge biologique.

Figure 1

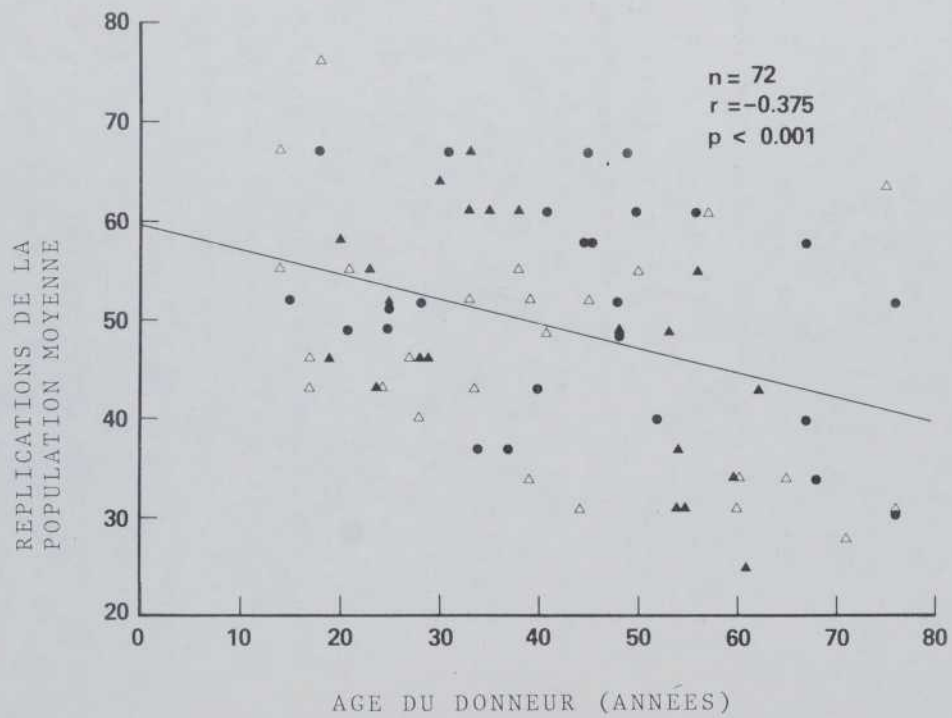


Figure 2

RELATION ENTRE LA DUREE DE VIE D'ORGANISMES INTACTS ET
LA DUREE DE CELLULES EN CULTURE

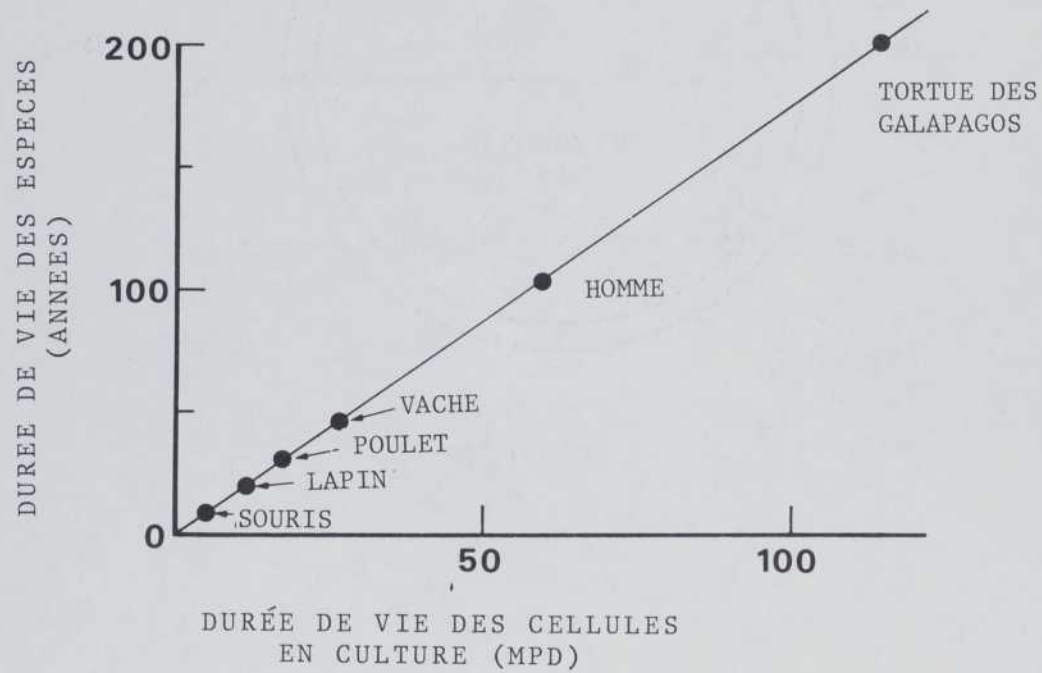


Figure 3a

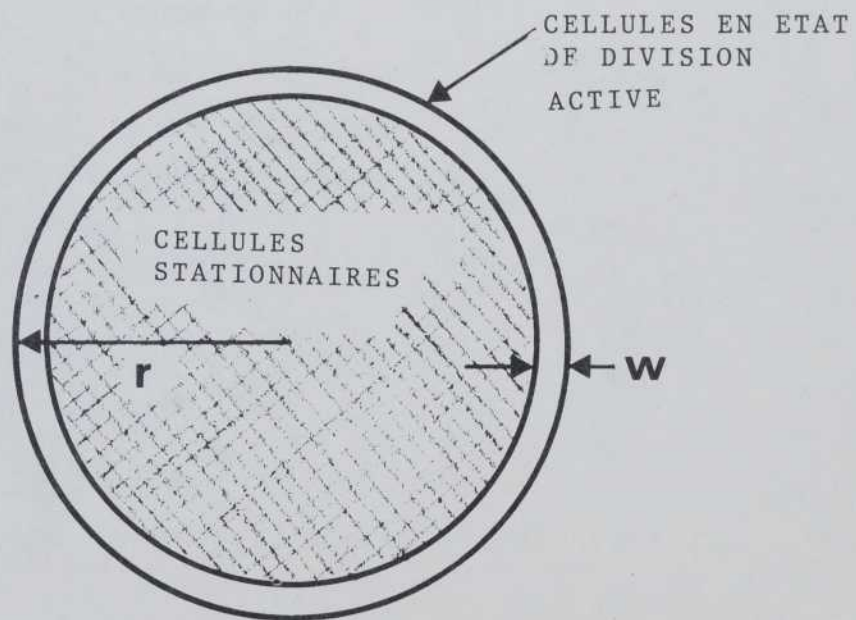


Figure 3b

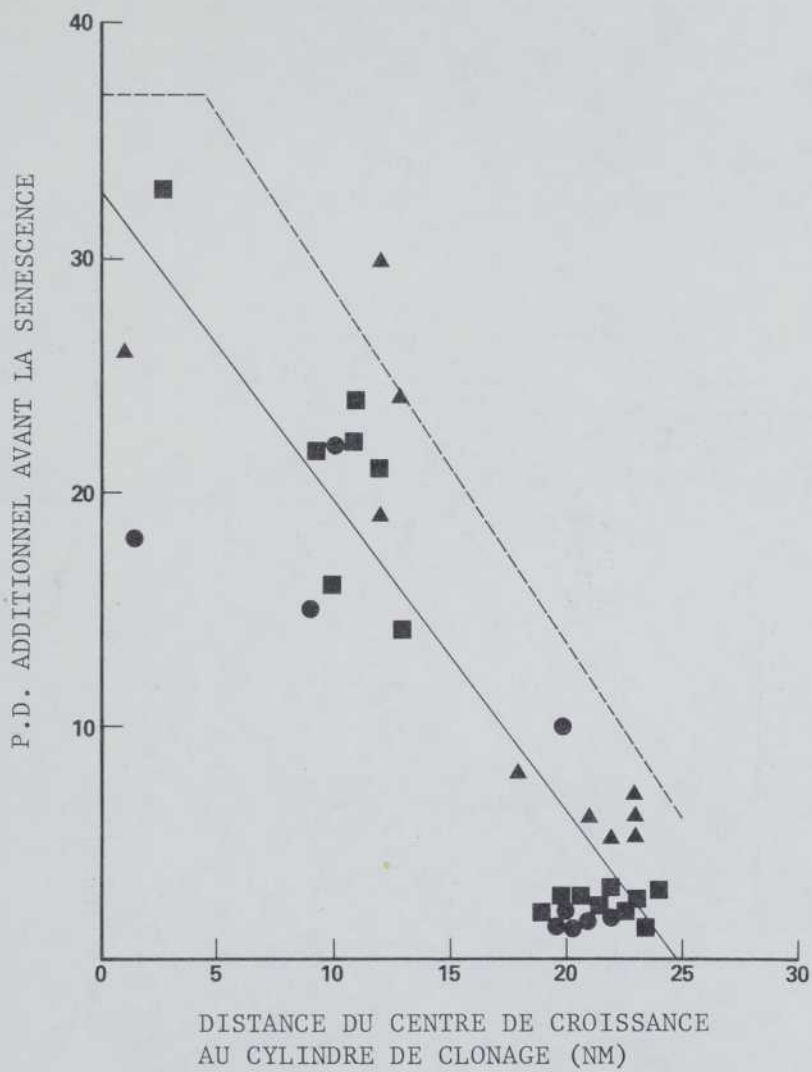


Figure 5

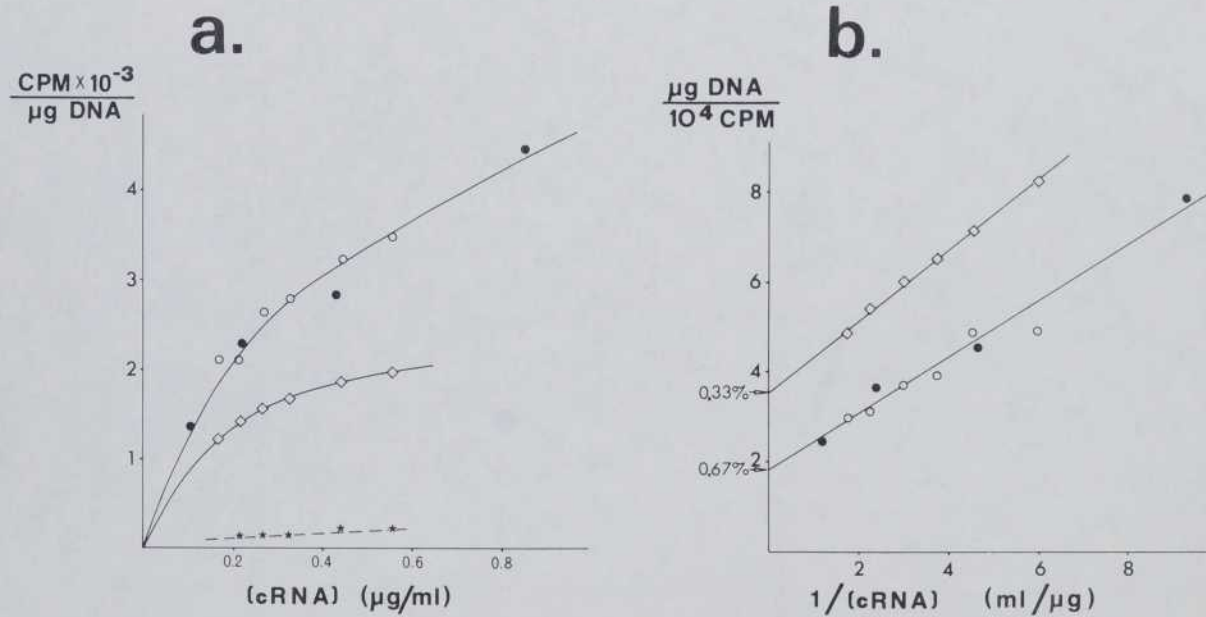
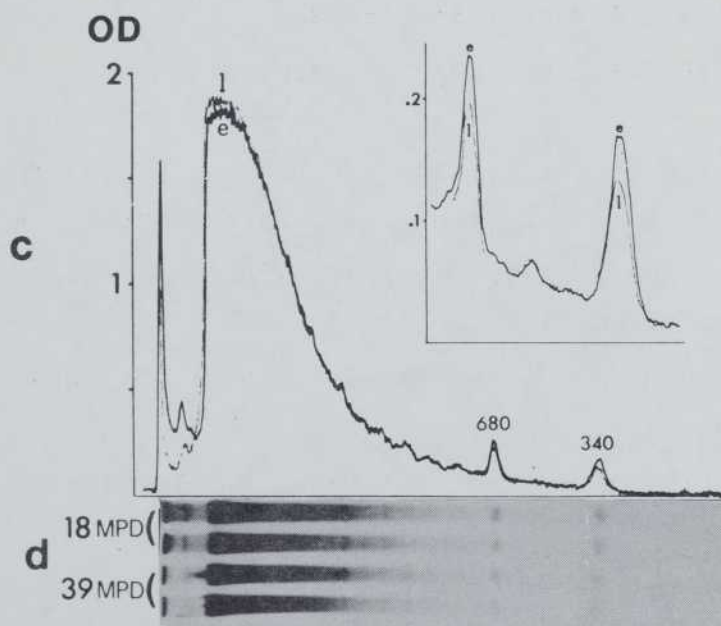
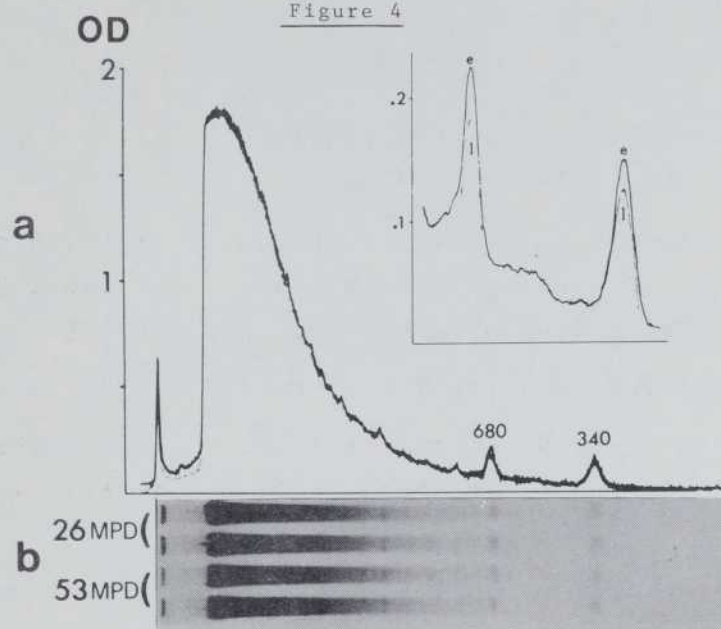


Figure 4



Références

1. Hayflick, L., and Moorehead, P.S. (1961) Exp. Cell Res. 25: 585-621
2. Hayflick, L. (1977) in "Handbook of the Biology of Aging", Finck, C.E. and Hayflick, L., eds., Van Nostrand Reinhold Co., New York, pp. 159-186.
3. Hayflick, L. (1965) Exp. Cell Res. 37: 614-636.
4. Goldstein, S. Littlefield, J.W., and Soeldner, J.S. (1969) Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 64: 155-160.
5. Goldstein, S., (1978) in "The Genetics of Aging, E.L. Schneider, ed., Plenum Press, New York, pp. 171-224.
6. Martin, C.M. Sprague, C.A., and Epstein, E.J. (1970) Lab. Invest. 23: 86-92.
7. Goldstein, S., et al. (1978) Science 199: 781-782.
8. Goldstein, S. (1979) in "Endocrinology", De Groot, L.J., et al. eds., Grune and Stratton, New York.
9. Dell'Orco, R.T., Mertens, J.G. and Kruse, P.F.Jr. (1973) Expt. Cell Res. 77: 356-360.
10. Goldstein, S. and Singal, D.P. (1974) Exp. Cell Res. 88: 359-364.
11. Harley, C.B. and Goldstein, S. (1978) J. Cell. Physiol. 97: 509-516.
12. Harley, C.B., Pollard, J.W., Chamberlain, J.W., Stanners, C.P. and Goldstein, S. (in press).

13. Wojtyk and Goldstein (in press).
14. Shmookler Reis, R. and Goldstein, S., Fed. Proc. 38: 535 (1979); and in press.
15. Shmookler Reis, R. and Goldstein, S. (in press).
16. Manuelidis, L. (1978) Chromosoma 66: 23-32.
17. Smith, J.R. and Whitney, R.G. (1980) Science 207: 82-84.







BNQ



000 229 893

