



HAL
open science

Étude de l'expression et des interactions de la protéine ORF1p encodée par LINE-1 dans le cerveau dans un contexte pathophysiologique et de vieillissement

Tom Bonnifet

► **To cite this version:**

Tom Bonnifet. Étude de l'expression et des interactions de la protéine ORF1p encodée par LINE-1 dans le cerveau dans un contexte pathophysiologique et de vieillissement. Neurosciences. Sorbonne Université, 2023. Français. NNT : 2023SORUS498 . tel-04511686

HAL Id: tel-04511686

<https://theses.hal.science/tel-04511686>

Submitted on 19 Mar 2024

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



COLLÈGE
DE FRANCE
—1530—



SORBONNE UNIVERSITÉ

ÉCOLE DOCTORALE : ED3C

Laboratoire de recherche : CIRB, collège de France

Thèse de Neurosciences présentée et soutenue par

Tom BONNIFET

le : 15 décembre 2023

**Étude de l'expression et des interactions de la protéine
ORF1p encodée par LINE-1 dans le cerveau dans un
contexte pathophysiologique et de vieillissement**

Sous a direction de :
Dr Julia FUCHS, CIRB

Membres du jury :

Dr. Éric BATSCHÉ – Président du jury

Dr. Nicolas GILBERT – Rapporteur

Dr. Michael RERA – Rapporteur

Dr. Olga CORTI – Examineur

Dr. Pascale BERTRAND – Examineur

Dr. Michela DELEIDI – Examineur

Dr. Rajiv L. JOSHI – Examineur

Dr. Julia FUCHS – Directeur de thèse

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier et à exprimer ma profonde reconnaissance à l'ensemble des membres de mon jury, pour avoir accepté d'évaluer mes travaux en y consacrant votre temps. Vos expertises, connaissances et conseils élargiront et construiront ma réflexion. Ces remerciements s'adressent aussi particulièrement à mes rapporteurs qui ont accepté de lire et d'évaluer ce présent manuscrit.

Merci également aux deux membres de mon comité de thèse, Laure Teyssset et Christian Neri pour les suggestions et discussions que nous avons eues au cours de ces CSI.

Je souhaite remercier tout particulièrement mon encadrante et chef d'équipe. Julia, tu as été pour moi une encadrante formidable. Tes conseils, idées et expertises ont été d'une aide inestimable au cours de ces 4 années. Tu m'as toujours enseigné avec sourire, gentillesse et patience. Ces années ont été très enrichissantes pour moi et c'est un honneur de les avoir réalisées à tes côtés. Merci sincèrement pour tout, je te souhaite tout le meilleur.

J'aimerais également remercier Rajiv, pour ta participation à ce projet, pour nos discussions sur la science et ce domaine, pour ton savoir et ta générosité. Sache que tu as été d'un grand soutien pour moi.

Je tiens bien évidemment à remercier Olivia, pour m'avoir formée. Toutes ces manip n'auraient pas été possibles sans ton temps et ton partage. Tu as été d'une grande aide dans cette thèse, alors merci d'y avoir mis tes compétences, tant sur le plan paillasse que cognitif.

J'aimerais aussi remercier tous les autres membres de l'équipe lors de cette thèse, à savoir Rania, François, Myriam et Sandra. Toujours motivés et dynamique. Merci pour votre aide précieuse. J'aimerais en particulier remercier Sandra. Cela a été très formateur pour moi de t'encadrer lors de ton M2 et tu as appris très vite. Les projets que nous avons menés furent compliqués et chronophages, mais ensemble ils le furent bien moins.

Je souhaite exprimer ma gratitude à Héloïse Monnet et Philippe Mailly. L'analyse à grande échelle de ces millions de cellules n'aurait pas été possible sans vous. Merci d'avoir pris le temps de toujours m'écouter pour avancer ensemble. Et aussi un grand merci à Héloïse pour m'avoir partagé son savoir sur ces lignes de code. Cette aide fut précieuse.

Merci également à Julien et Tristan de la plateforme imagerie pour vos formations et vos aides respectives.

Un grand merci à Vincent, sans ton efficacité, aucune manip ne serait possible.

Je voudrais aussi remercier Rachel, Camille, Fanny, David, et Salimata. Merci pour votre aide, votre énergie et votre bonne humeur. Merci d'avoir rigolé à (presque) toutes mes blagues

et merci pour ces moments passés ensemble. Merci tout particulièrement à Rachel, toujours à l'écoute, et pour ton aide dans le sacrifice des souris.

Je remercie Edmond pour ses nombreuses aides, pour nos discussions et pour son sourire communicatif. Merci aussi à Ariel et Alain pour leurs conseils et leurs expertises. Un grand merci également à Stéphanie pour son aide et ses dons de souris.

J'aimerais également remercier toutes les personnes du CIRB qui ont fait de cette aventure un enrichissement personnel et amical : Pierre, Shayan, Rachel, Marc, Katia, Marie, Hosni, Sofia et les autres. Merci pour ces moments passés ensemble.

Je voudrais remercier du fond du cœur toute ma famille, pour avoir toujours cru en moi. Votre soutien a été le socle de ma réussite. Vous m'avez toujours porté vers l'avant, encouragé et stimulé intellectuellement. A mon père pour son soutien sans faille, à ma mère pour son temps et sa détermination à toute épreuve, à ma petite sœur pour tout ce que tu représentes pour moi et à mes grands-parents pour avoir toujours été là pour moi. Mon goût pour les sciences est sûrement le fruit de vos curiosités, amours et reconnaissances respectives.

J'aimerais également dire un grand merci à Naomie. Tes encouragements et ta compassion ont été un vrai moteur pour avancer dans les dernières étapes de cette thèse.

Je remercie également tous mes amis de Paris : Rémi, Valentin, Willy, Théo, Nadia, Morgane, Marc, Jérôme, Yann, Thomas. Je remercie également Lucia pour ces années passées et le soutien que tu m'as apporté. Merci à vous pour avoir écouté mes plaintes et aidé à surmonter les épreuves.

Je souhaite pour terminer, remercier tous mes amis de Toulouse et d'ailleurs : Sarah, Julia, Théophile, Guillaume, PA et Julien. Merci d'être qui vous êtes, tout simplement.

Enfin je remercie aussi à tous ceux que j'aurais pu oublier et qui ont participé de près ou de loin à cette aventure.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	8
Chapitre I: LINE-1, de leur composition à leur expression dans le cerveau	9
I.A: Les éléments transposables.....	9
I.A.1 Découverte	9
I.A.2 Classification	9
I.A.3 Proportion.....	10
I.B: LINE-1.....	11
I.B.1 Structure des LINE-1s	11
I.B.2 Cycle de vie	12
I.B.3 Des LINE-1s hautement régulés	14
I.B.4 Une épée à double tranchant finement maniée.....	15
I.C: ORF1p : expression, structure & fonction, polymérisation et partenaires.	17
I.C.1 : ORF1p: expression	17
I.C.2 : ORF1p: Structure, fonction et polymérisation.	18
I.C.3 : ORF1p: partenaires.	20
I.D: LINE-1 dans le cerveau	22
I.D.1 Mosaïcisme Somatique.....	22
I.D.2 Expression.....	24
Chapitre II: LINE-1 dans le vieillissement et les maladies neurodégénératives	25
II.A: Vieillesse et Maladies neurodégénératives.....	25
I.A.1 Le vieillissement.....	25
I.A.2 Le vieillissement dans le cerveau.....	29
I.A.3 Les maladies neurodégénératives.....	31
II.B: ...Associées aux LINE-1s ?	34
II.B.1 Dérépression des LINE-1s et vieillissement.....	34
II.B.2 Dérépression des LINE-1s lors vieillissement et son lien avec les MNs.....	39
II.B.3 Et ORF1p ?	41
PUBLICATION	44
RESULTATS ANNEXES	113
Resultat Annexe I: Dysregulation of TEs and specific full-length LINE-1 elements and ORF1p expression in Alzheimer's and Parkinson's Disease.	114
Résultat Annexe II: Identifying the dynamic interactome of ORF1p at steady-state and under stress in human dopaminergic neurons in vitro	132
REVUE	152
DISCUSSION	171
I. L'expression d'ORF1p dans le cerveau :	171
A. Une expression généralisée.....	172
B. Une expression neuronale.....	173
II. L'expression d'ORF1p et des LINE-1s dans le cerveau au cours du vieillissement.	176
III. L'expression d'ORF1p et des LINE-1s dans la maladie de Parkinson et d'Alzheimer	184
IV. Partenaires d'ORF1p dans le cerveau murin et dans les neurones dopaminergiques en condition de stress	189
A. Des partenaires ORF1p conservés de l'humain à la souris.	190

B. Implications pathologiques.....	191
1. Intégrité de la membrane nucléaire.....	191
2. Équilibre du RBPome.....	191
3. RBP impliqués dans la neurodégénérescence et interagissant avec ORF1p	193
4. ORF1p et RBP impliqués dans les modifications m6A.....	195
C. Potentiel physiologique	196
1. Immunité.....	196
2. ORF1p dans le carrefour métabolique des ARNs	197
CONCLUSION.....	199
BIBLIOGRAPHIE	202

TABLE DES FIGURES

Figure 1 : Classification des ETs chez les eucaryotes.....	10
Figure 2 : Proportion des ETs sans le génome humain.....	11
Figure 3 : Structure du rétrotransposon humain LINE-1.	12
Figure 4 : Cycle de vie de LINE-1.....	13
Figure 5 : Schéma de la régulation de LINE-1 aux différentes étapes de son cycle de vie dans les cellules somatiques.....	16
Figure 6 : Structure de la protéine ORF1p chez la souris et l'humain.....	18
Figure 7 : Alignement des séquences protéiques ORF1p de la souris et de l'humain.....	19
Figure 8 : Modèle de rétrotransposition de LINE-1s conduisant au mosaïcisme génétique des cellules du cerveau.	23
Figure 9 : Les composantes du vieillissement.....	26
Figure 10 : Régulateurs transcriptionnels des rétrotransposons et leur défaillance au cours du vieillissement.....	34
Figure 11 : Cycle de vie des LINE-1s et leurs influences sur le processus de vieillissement.....	37
Figure 12 : Les challenges associés à l'études des transcrits issus des éléments transposables.....	181
Figure 13 : Reconnaissance des rétrotransposons par le système immunitaire inné et déclenchement de la réponse interféron dans le cancer, la sénescence et le syndrome d'Aicardi Goutières.....	187
Figure 14 : L'équilibre de l'interactome des RBPs et sa perturbation.....	192
Figure 15 : Bilan du silencing de ces hnRNPs sur le phénotype des drosophile sur-exprimant TDP-43.....	193

LEXIQUE

6-OHDA : 6-Hydroxydopamine
AD : Alzheimer's Disease
ASOs : Oligonucléotides antisens
cGAS : GMP-AMP synthase cyclique
CpG : Cytosine-phosphate-guanine-dinucleotide
DE-TEs: Differentially Expressed Transposable Elements
ET : Élément transposable
FTD : Démence frontotemporale
HERVs : Human endogenous retrovirus
HP1 : Heterochromatin protein 1
IFN : Interféron
LINE-1 : Long interspersed nuclear elements 1
LINE-1 : Long interspersed nuclear elements
LTR : Long terminal repeat
LUHMES : Lund Human Mesencephalic Neuronal
m6A : modifications methyladenosines (ARN)
MA : Maladie d'Alzheimer
MN : Maladie neurodégénérative
MP : Maladie de Parkinson
MeCP2 : Methyl-CpG binding protein 2
NRTIs : Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor
NUP : Nucleoporine
PD: Parkinson's Disease
RBP : RNA Binding Protein
RBPome : Interactome des RBPs
RNP : Ribonucleoprotein
SIRT : Sirtuin
SLA : Sclérose Latérale Amyotrophique
TE : Transposable Element
TSD : Site-cible de duplication
UID : Unique Identifier (Séquence LINE-1 unique et intacte)
UTR : Untranslated transcribed region
VM : Ventral Midbrain

INTRODUCTION

Chapitre I: LINE-1, de leur composition à leur expression dans le cerveau.

I.A: Les éléments transposables

I.A.1 Découverte

Les Éléments Transposables (ETs), aussi appelés gènes « sauteurs » ou « voyageurs », sont des séquences d'ADN ayant la capacité de se déplacer dans le génome. On leur préférera le nom d'éléments transposables qui, sur le plan sémantique, fait référence à son mode de déplacement dit de transposition, du latin *transponere* : avec l'influence de poser. Ils furent initialement découverts dans le domaine végétal par Barbara McClintock dans les années 1940 en étudiant l'instabilité des motifs de couleurs sur les épis de maïs. D'abord en identifiant deux locus génétiques dominants et interagissant entre eux, elle découvrit que l'interaction de ces locus avait une influence sur les gènes voisins. Quelques années plus tard, elle observa que ces locus pouvaient se déplacer dans le génome et causer un changement dans les motifs de couleurs des épis (McClintock, 1950). Il fallut attendre presque 20 ans pour accepter et saisir l'importance de ses travaux. Pourtant ses concepts de régulation qu'elle décrira furent similaires à ceux découverts par François Jacob et Jacques Monod dans le contexte de l'opéron lactose (McClintock, 1961). Quant aux éléments transposables qu'elle découvrit, ils furent caractérisés par la suite comme des éléments autonomes de classe II.



I.A.2 Classification

Chez les eucaryotes, les ETs sont séparés en deux classes. La première est celle des éléments de classe I, appelés aussi rétrotransposons. Ils nécessitent une étape ARN et une transcriptase inverse pour parfaire leur intégration dans le génome sous forme d'ADN. Ils

s'amplifient par un mécanisme dit de « copier-coller ». La deuxième classe est celle des transposons ou class II. Ils nécessitent une transposase pour « couper-coller » leurs séquences au sein du génome.

Les rétrotransposons sont eux divisés en 3 groupes : ceux étant flanqués par des séquences terminales longues répétées (ou LTR en anglais), contenant des séquences promotrices et participant à l'intégration de l'élément (Kojima, 2020; Romerio, 2023) et ceux ne les contenant pas. Ces non-LTR rétrotransposons regroupent les SINEs (Short Interspersed Nuclear Elements) comprenant les SVA et les LINEs (Long Interspersed Nuclear Elements). Les éléments transposables peuvent aussi être subdivisés en deux groupes, indépendamment de la classification explicitée ci-dessus, en fonction de la dépendance qu'ils entretiennent avec d'autres ETs pour leur mobilité. On les nommera « autonomes » s'ils possèdent la machinerie protéique complète leur permettant de transposer, comme les LINEs. A l'inverse si cette machinerie n'est pas complète, l'ET pourra s'approprier celle d'un autre ET, on le nommera donc éléments « non-autonome ». Les SINEs par exemple utilisent la transcriptase inverse des LINEs pour rétrotransposer.

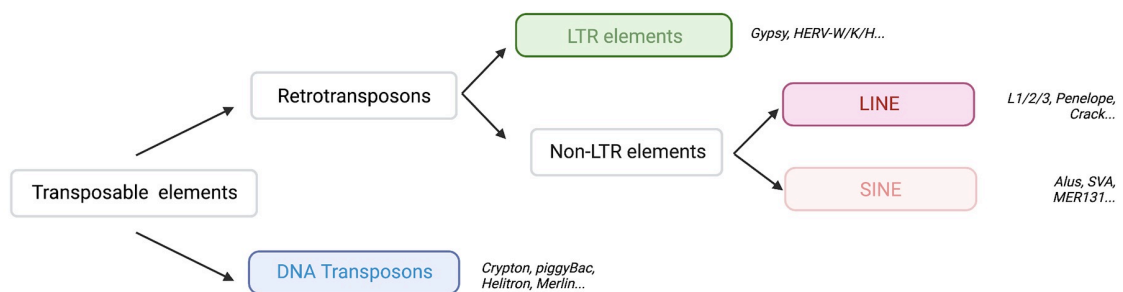


Figure 1 : Classification des ETs chez les eucaryotes. Adapté de notre revue (Peze-Heidsieck et al. 2022)

Par tous ces mécanismes, notamment de « copier-coller », les ETs ont pu constituer une part importante des génomes particulièrement chez les mammifères.

I.A.3 Proportion

Chez l'humain, les ETs représentent pas moins de 47% du génome, lorsque les exons codant pour nos protéines représentent quant à eux seulement 2%. Les séquences n'étant ni des cadres de lectures ouvertes ni des ETs sont annotées comme

« autres » et sont principalement des séquences promotrices, introniques, télomériques centromériques ou des pseudogènes. Parmi les ETs, les transposons occupent 3% du génome et sont la classe minoritaire au sein de notre génome suivie des rétrotransposons LTR. Viennent ensuite les SINEs puis les LINEs, ces derniers étant les plus abondants avec 21% de notre ADN dérivé de séquences LINEs (Lander et al., 2001).

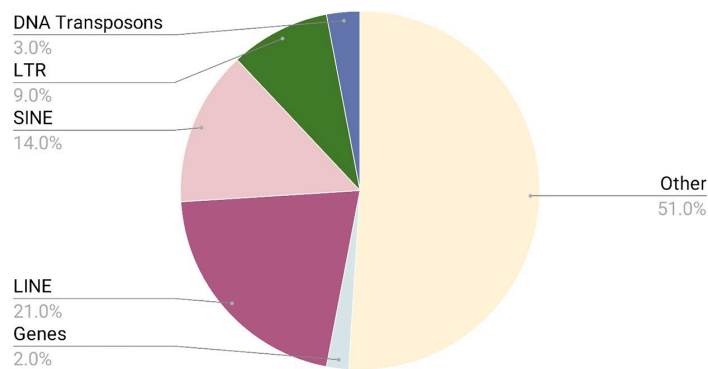


Figure 2 : Proportion des ETs dans le génome humain. Adapté de notre revue (Peze-Heidsieck et al. 2022)

Ces proportions retrouvées chez l'homme sont très similaires de celui du génome de la souris (Copley & Shorter, 2023). Les LINEs sont, comme chez nous, les éléments transposables majoritaires de ces deux génomes, représentant plus de 19% chez la souris (Mouse Genome Sequencing Consortium et al., 2002). Il en est de même pour la sous-classe LINE la plus active : LINE-1.

I.B: LINE-1

I.B.1 Structure des LINE-1s.

Un LINE-1 fonctionnel pour la rétrotransposition fait approximativement 6 kilobases. Il est composé d'une région 5'UTR contenant une séquence promotrice, deux cadres de lectures ouvertes codant pour deux protéines (ORF1p et ORF2p), une région 3'UTR et une queue polyA. Ils sont généralement flanqués de régions appelées « site-cible de duplication » (TSD en anglais) de 7 à 20 paires de bases (Beck et al., 2011). Le 5'UTR a une activité promotrice à la

fois sens et antisens (Speek, 2001; Swergold, 1990). Il existe aussi chez le primate un cadre de lecture ouvert sur le brin antisens nommé ORF0 (Boeke & Fenyo, 2015; Denli et al., 2015).

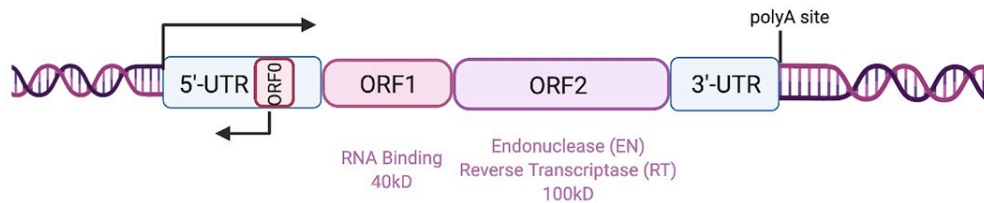


Figure 3 : Structure du rétrotransposon humain LINE-1. Adapté de notre revue (Peze-Heidsieck et al. 2022)

Le premier cadre de lecture ouverte (ou Open Reading Frame (ORF)) code pour ORF1p, une protéine de liaison à l'ARN d'environ 40kDa (42kDa chez la souris). Sa structure et ses domaines seront détaillés plus bas. Le second ORF code pour ORF2p, une protéine possédant une activité endonucléase et de transcriptase inverse (Reverse Transcriptase). De part des défauts d'insertion, de mutations accumulées au cours de l'évolution, ou des remaniements chromosomiques, l'immense majorité des séquences LINE-1 ont perdu leur aptitude à rétrotransposer, et se retrouve fossilisées dans le génome, incapable de se mobiliser. On dénombre environ 800 000 séquences LINE-1 de ce type dans le génome humains et 600 000 dans le génome murin (Goodier et al., 2001; Mouse Genome Sequencing Consortium et al., 2002). Seulement une centaine de LINE-1 est réellement actif (environ 2000 chez la souris) et capable de parfaire leur cycle.

I.B.2 Cycle de vie

Quand l'environnement chromatinien de LINE-1 le lui permet, celui-ci va être transcrit puis exporté dans le cytoplasme. Il sera ensuite traduit puis ORF1p (sous forme de trimère) et ORF2p vont se lier à la séquence ARN LINE-1 pour former une ribonucléoprotéine (LINE-1 RNP). Ce complexe va ensuite tenter d'accéder au génome dont il est issu pour se réinsérer via l'activité endonucléase et transcriptase inverse d'ORF2p par un mécanisme dit de « TPRT » (Target-Primed Reverse Transcription). Brièvement, après avoir coupé un des deux brins par endonucléase sur une séquence hexa-nucléotidique cible (AAAATT), ORF2p va amorcer une

transcription inverse via la queue poly A de l'ARN LINE-1 (Cost et al., 2002). Il est probable que ORF2p synthétise aussi le brin antisens ainsi que l'intégration de cette nouvelle copie LINE-1, cependant le mécanisme de TPRT reste peu compris à ce jour. Ce phénomène de rétrotransposition peut être suivi par un test (Retrotransposition assay) reposant sur la transfection d'un plasmide contenant une séquence LINE-1 à laquelle on a greffé un rapporteur contenant un intron (Rangwala et al., 2009). Ainsi, si cette séquence se rétrotranspose dans le génome, l'épissage du transcrit et sa traduction qui en résultera permettra d'observer le rapporteur.

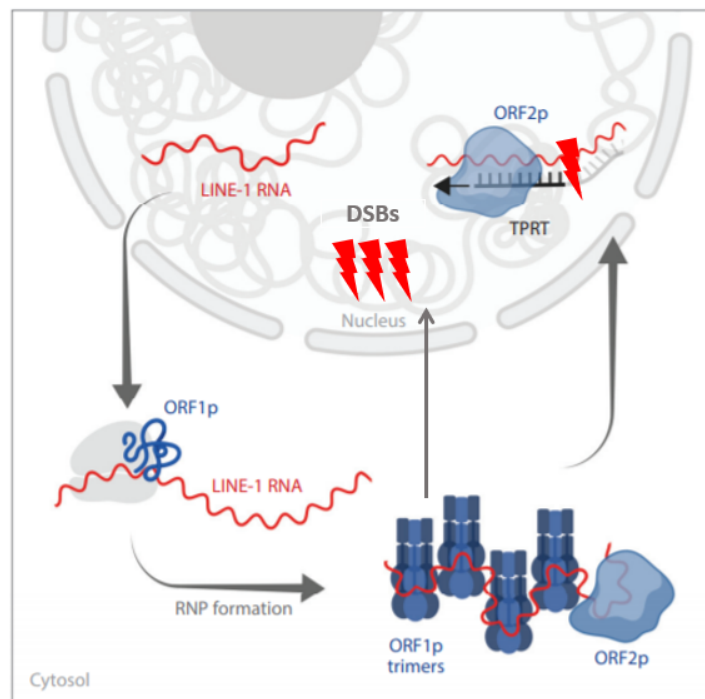


Figure 4 : Cycle de vie de LINE-1 (adapté de Bourque et al, 2018)

Visualisable ou non, l'insertion de nouvelles copies LINE-1 peut avoir un effet néfaste pour le génome de la cellule concernée (Gasior et al., 2006). D'autant plus que l'activité endonucléase de ORF2p peut être aussi indépendante de l'évènement de rétrotransposition et induire de multiples cassures double brins de l'ADN (Belgnaoui et al., 2006; Blaudin de Thé et al., 2018; Gasior et al., 2006). Ainsi les cassures d'ADN générées peuvent avoir des conséquences délétères, raison pour laquelle, les LINE-1s sont hautement contrôlés sur différents niveaux.

I.B.3 Des LINE-1s hautement régulés

Ce sont tout d'abord les modifications épigénétiques qui forment le premier socle de régulation des LINE-1s, à la fois via la méthylation de l'ADN (Hata & Sakaki, 1997; Muotri et al., 2010) et les marques d'histones telle que H4K20me3 (Ren et al., 2021), H3K9me3 (He et al., 2019; N. Liu et al., 2018, 2018) et H3K27me3 (Ishak et al., 2016). Ces modifications épigénétiques sont orchestrées par différents répresseurs dont les principaux sont HP1 α (heterochromatin protein 1), Suv39H, MECP2, Kap1 (aussi appelé TRIM28) et des sirtuins (notamment SIRT6 et 7)(Protasova et al., 2021). Ces remodeleurs chromatiniens vont diminuer l'accessibilité de la chromatine de manière directe en acétylant, méthylant, ou phosphorylant certaines histones, ou de manière indirecte en recrutant d'autres effecteurs. MeCP2 (methyl-CpG-binding protein) va méthyler l'ADN au niveau des séquences LINE-1s, plus précisément sur les îlots CpG de leurs régions promotrices au sein du 5'UTR, ce qui aura pour effet de réprimer la transcription de ces locus (Muotri et al., 2010). SIRT6 se fixe sur la partie 5'UTR des séquences LINE-1 ou il va mono-ADP ribosylé Kap1. Cela permettra à Kap1 d'interagir avec HP1 α pour empaqueter ces LINE-1s au sein de l'hétérochromatine (Van Meter et al., 2014). Lorsque ce premier niveau de régulation échoue et que le LINE-1 est transcrit, de nombreux régulateurs post-transcriptionnel vont prendre le relais en dégradant le transcrit LINE-1 ou en empêchant sa traduction. A titre d'exemple, la dégradation peut se faire via miR-128, un miARN qui va directement se fixer sur l'ARN LINE-1 au niveau de ORF2 (Hamdorf et al., 2015) ou par des facteurs antiviraux comme la RNaseL (A. Zhang et al., 2014). Les transcrits LINE-1 peuvent aussi être ciblés en vue de leur dégradation par les piRNA (Siomi et al., 2011). Le complexe GAIT ainsi que les protéines SAMHD1 et BRCA1 empêche la traduction du LINE-1 soit en le séquestrant dans des granules de stress soit en limitant l'accessibilité de l'ARN LINE-1 au ribosome (Hu et al., 2015; Ward et al., 2017). La liste des régulateurs post-transcriptionnels des LINE-1s est longue, une trentaine est à ce jour identifiée, la plupart impliquée dans des processus de l'immunité innée, de la réparation de l'ADN ou de l'édition m6A des ARN (Warkocki, 2023). Là encore, si les répressions au niveau transcriptionnel, post-transcriptionnel et traductionnel échouent, le LINE-1-RNP peut être séquestrer dans des granules de stress pour être ensuite dégradé via la protéine ZAP et l'hélicase MOV10 (Goodier et al., 2015). TRIM5 α est aussi capable de se lier au LINE-1-RNP. Ce facteur de restriction de l'infection rétroviral va se multimériser lors de la reconnaissance du LINE-1-RNP pour induire une cascade de signalisation réprimant la rétrotransposition (Volkman et al., 2020). Enfin un

dernier niveau de régulation est exercé par les protéines impliquées dans la réparation de l'ADN en limitant l'insertion du LINE-1 (Gasior et al., 2008; Mita et al., 2020). Un autre aspect permet de réguler l'activité des LINE-1s dans les cellules somatiques. En effet, la membrane nucléaire délimite le cytoplasme du noyau et limite l'accessibilité du RNP au génome confinant le LINE-1-RNP au cytoplasme. En revanche, lors de la mitose, en prométaphase, le noyau disparaît durant cette étape, facilitant une possible intégration de LINE-1s (Mita et al., 2018).

Une étude menée par Nian Liu et son équipe a permis d'identifier de nombreux répresseurs et activateurs de LINE-1s (N. Liu et al., 2018). Par une stratégie de criblage par CRISPR/Cas9 alliée à des tests de rétrotransposition sur des cellules de lignée tumorale humaine, ils ont pu caractériser de nouveaux régulateurs ainsi que l'ampleur de l'effet qu'ils pouvaient avoir sur le contrôle des LINE-1. Ils ont pu montrer par la suite que MORC2 et le complexe HUSH (MPP8 et TASOR), de forts inhibiteurs retrouvés dans leur criblage, se fixaient sélectivement sur des LINE-1 intacts situés dans les zones euchromatiniennes, principalement dans les introns de gènes transcriptionnellement actifs. MORC2/HUSH permet d'inhiber la transcription de ces LINE-1 en y déposant des marques histones H3K9me3 au sein de ces introns, mais il en résulte une diminution de l'expression du gène (N. Liu et al., 2018). De plus, il a été montré que le complexe HUSH, par son implication dans la régulation des LINE-1, module la réponse interféron de type I (Tunbak et al., 2020). Ces exemples illustrent parfaitement comment les LINE-1 sont impliqués dans des mécanismes complexes de régulation des gènes à la fois par les marques épigénétiques qu'ils contiennent et par la multitude de régulateurs qui les contrôlent.

I.B.4 Une épée à double tranchant finement maniée.

La régulation des LINE-1s expliquée plus haut est d'une grande complexité et s'articule sur plusieurs niveaux afin de contrôler chaque étape de son cycle de vie. Cependant, dans certains cas, ce contrôle ne s'exerce pas uniquement dans le but de limiter les effets néfastes que les LINE-1 peuvent avoir sur la cellule, mais au contraire de le réguler pour en tirer profit.

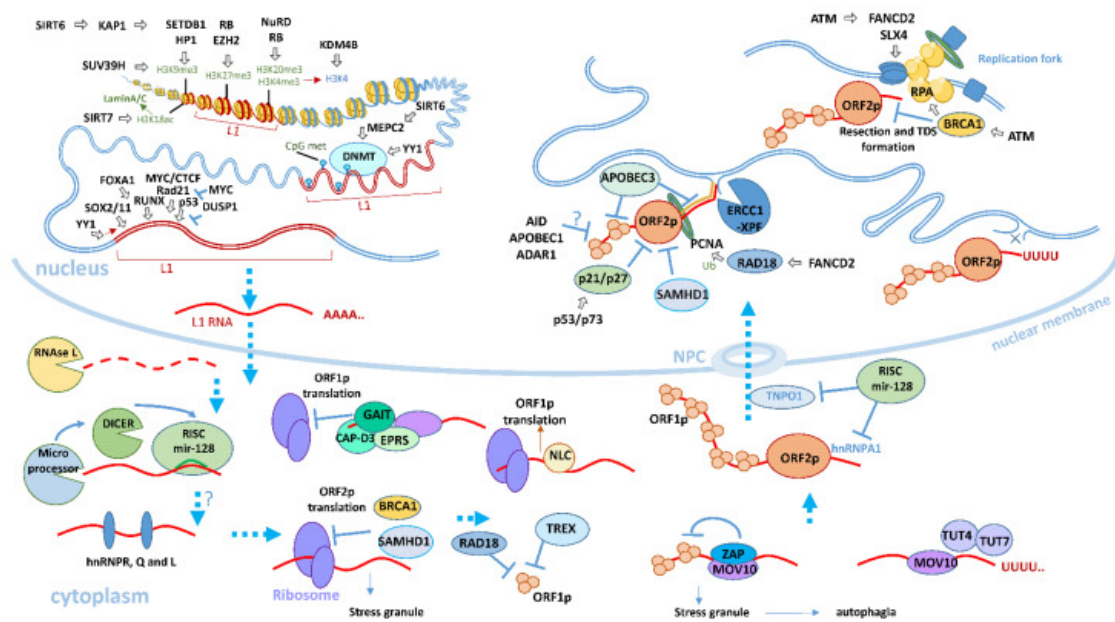


Figure 5 : Schéma de la régulation de LINE-1 aux différentes étapes de son cycle de vie dans les cellules somatiques (adapté de Protasova et al. 2021)

Ainsi, depuis quelques années, le rôle des LINE-1s comme acteur essentiel dans certains processus biologiques gagne du terrain. C'est notamment le cas dans le domaine de l'embryologie où il s'est avéré que LINE-1 joue un rôle prépondérant dans le développement et l'identité des cellules souches embryonnaires chez la souris (Percharde et al., 2018). En effet, au stade 2 cellules (après la toute première division cellulaire) l'inactivation des LINE-1s par l'utilisation d'oligos antisens (ASOs) conduit à un arrêt total de la division. LINE-1 va servir de structure ARN dans le noyau pour recruter KAP1 et la nucléoline afin de réprimer le gène *Dux* d'une part et de promouvoir la synthèse d'ARN ribosomiques d'autre part. Par ces deux mécanismes essentiels à la sortie du stade 2 cellules, LINE-1 va se révéler être un acteur clé dans le développement. Cependant cette activation n'est que transitoire puisque les LINE-1 devront ensuite être réprimés et dégradés après ce stade par le complexe NEXT pour maintenir l'intégrité du génome (Wu et al., 2019). Les LINE-1s peuvent donc jouer un rôle important dans la régulation des gènes, notamment en fonction de leurs emplacements et leurs orientations. Les LINE-1s, en particulier ceux intacts, sont préférentiellement situés dans les introns. Ainsi ces LINE-1 peuvent moduler l'expression génique à la fois par les marques épigénétiques qu'ils contiennent, comme vu précédemment via HUSH, mais aussi directement par la nature de leurs séquences (promoteur, enhanceur, queue poly-A, site de splicing) (Belancio et al., 2008;

Garcia-Perez et al., 2016). Les LINE-1s vont ainsi façonner en profondeur la dynamique du transcriptome (Branco & Chuong, 2020; Elbarbary et al., 2016; Ramos et al., 2021). Ils vont aussi pouvoir influencer la dynamique de régulation des gènes en comportementalisant le génome. En effet, avec l'aide d'autre TE, LINE-1 va permettre une séparation spatiale du génome en particulier dans la périphérie du noyau et du nucléole (Lu et al., 2021). Enfin, sur le plan évolutif, les LINE-1s vont aussi amener du polymorphisme génétique dans les cellules germinales. Ils vont aussi amener du polymorphisme dans les organes, au sein même de l'individu. Cet aspect sera discuté plus en détail au prochain sous chapitre.

LINE-1 constitue donc une épée à double tranchant maniée par une multitude d'effecteurs. D'un côté le LINE-1 s'avère être un élément essentiel, tant pour le développement que la régulation génique, d'un autre côté les effets délétères, principalement dûs à l'activité endonucléase d'ORF2p, doivent être contrôlés et réprimés pour maintenir l'intégrité du génome.

Dans les rôles de LINE-1s explicités ci-dessus, ce sont soit les loci, soit les transcrits LINE-1s qui sont mis en avant.

Mais qu'en est-il d'ORF1p ? Cette protéine ne possède pas d'activité enzymatique pouvant constituer une menace pour le génome.

I.C: ORF1p : expression, structure & fonction, polymérisation et partenaires.

I.C.1 : ORF1p: expression

ORF1p est réparti sous forme de trimère tout le long du ARN-LINE-1, alors que seulement un dimère de ORF2s est nécessaire pour former un LINE-1-RNP. On estime que pour une seule protéine ORF2p, on retrouve 200 protéines ORF1p (Martin, 2010). Cela explique en partie la difficulté à détecter ORF2p, même après immunoprécipitation du LINE-1-RNP (Ardeljan et al., 2020). Le suivi de l'expression de protéique des LINE-1s se fait donc principalement par la détection d'ORF1p.

Cette dernière est retrouvée dans presque tous les tissus. Chez l'humain, on la retrouve exprimée dans les reins, le foie, les poumons, l'épithélium des trompes de Fallope et le cerveau

(Sato et al., 2023; Sur et al., 2017). Chez la souris, ORF1p a été retrouvé dans le foie et les testicules (Simon et al., 2019). De plus, cette protéine encodée par le LINE-1 est exprimée dans la quasi-totalité des lignées tumorales humaines comme HeLa, MCF-7 ou HEK-293T à différents niveaux d'expression (Philippe et al., 2016; Sharma et al., 2016; Sur et al., 2017). Récemment, en réanalysant des données protéomiques de spectrométrie de masse issues de 29 tissus humains (D. Wang et al., 2019), une équipe s'est intéressée à rechercher des peptides protéotypiques de la protéine ORF1p (McKerrow et al., 2023). Elle a identifié ORF1p dans les poumons, les ovaires, le placenta et la prostate. Pour les autres tissus où ORF1p n'a pas été identifié, les auteurs suggèrent que ORF1p était présent mais en dessous du seuil de détection.

I.C.2 : ORF1p: Structure, fonction et polymérisation.

On sait que ORF1p est capable d'interagir avec les acides nucléiques sans réelle spécificité de séquences, à la fois sur l'ARN et l'ADN (Martin, 2010; Martin et al., 2005, 2008; Naufer et al., 2019). Cette interaction est primordiale pour accomplir le cycle de vie du LINE-1 et il est possible que ORF1p joue aussi un rôle dans l'insertion par son activité de chaperonne sur l'ADN (Kulpa & Moran, 2005; Moran et al., 1996; Naufer et al., 2019). Comme pour n'importe quelle protéine, la fonction, ici permettant l'interaction avec les acides nucléiques, provient de sa structure.

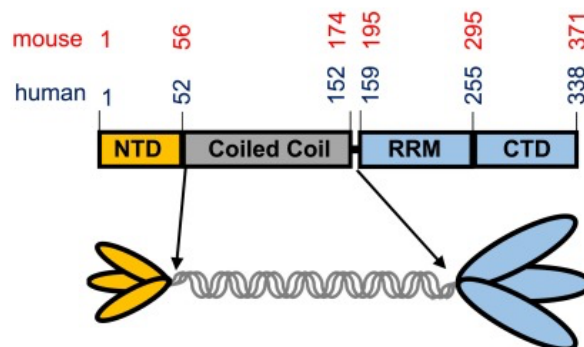


Figure 6 : Structure de la protéine ORF1p chez la souris et l'humain (d'après Naufer et al. 2019)

Chez la souris comme chez l'homme, la protéine ORF1p est composée de 4 domaines : Le domaine N-terminal (NTD : N-terminal domain), le domaine superhélice ou coiled coil (CC); le domaine de reconnaissance à l'ARN (RRM : RNA recognition motif) et le domaine C-terminal

(CTD)(Figure 6). Ces domaines diffèrent en taille et en composition d'acides aminés entre les deux espèces. Le domaine superhélice permet la trimérisation (Callahan et al., 2012; Khazina et al., 2011) et le domaine RRM la reconnaissance et la liaison à l'ARN (Khazina & Weichenrieder, 2009), deux fonctions vitales pour la rétrotransposition du LINE-1. Globalement, la moitié de la séquences ORF1p du côté C-terminal, qui possède une affinité pour l'ARN et une activité chaperonne vis-à-vis des acides nucléiques, est très conservée entre l'homme et la souris (Martin et al., 2005, 2008; Naufer et al., 2019). En revanche, la moitié du côté N-terminal est assez variable entre les deux espèces, bien que la partie superhélice demeure plutôt conservée (Boissinot et al., 2000; Sookdeo et al., 2013) (illustré ci-dessous).

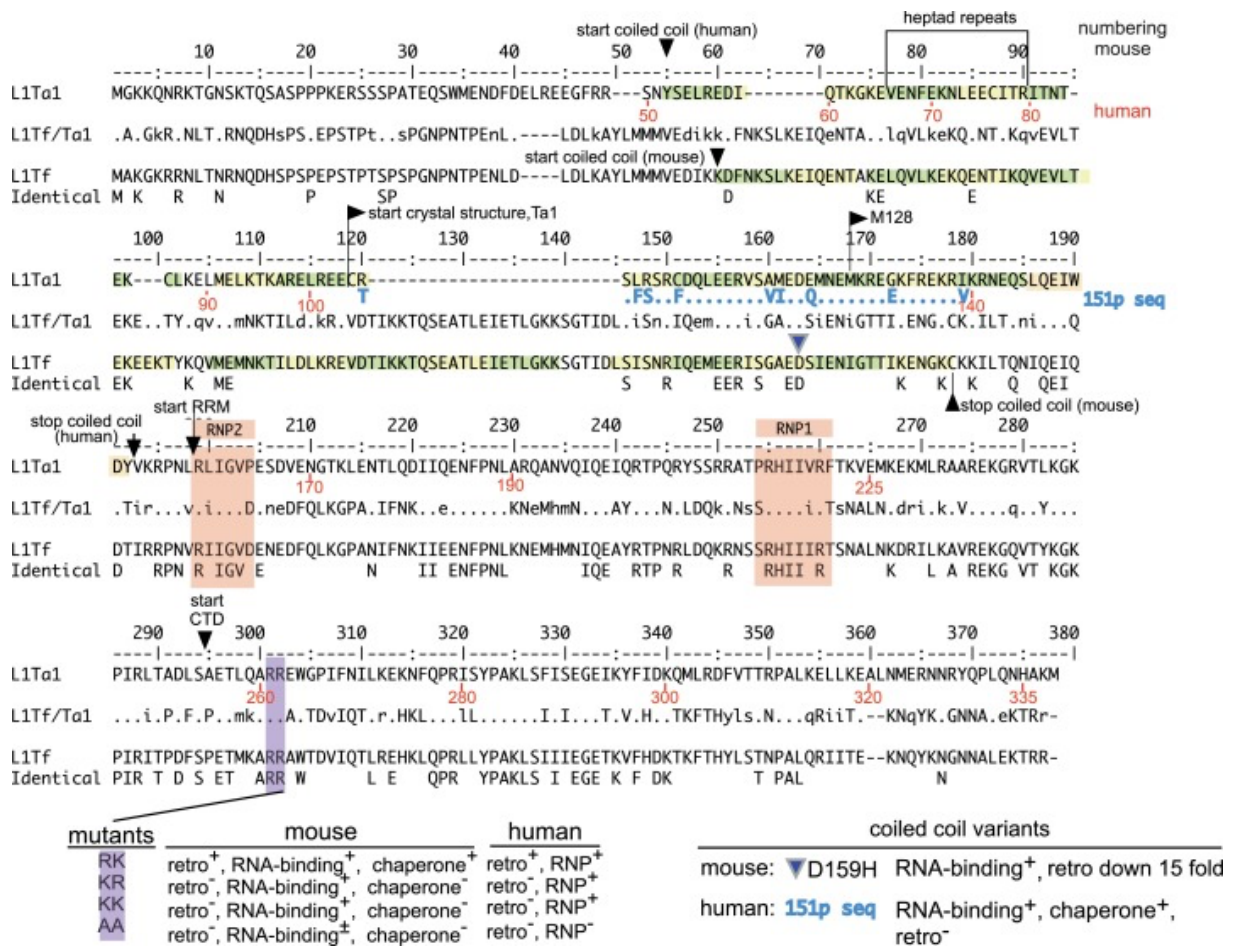


Figure 7 : Alignement des séquences protéiques ORF1p de la souris et de l'humain (d'après Naufer et al. 2019)

La liaison à l'ARN n'est pas seulement due au domaine RRM. Deux arginines dans la partie CTD sont très importantes à la fois dans la liaison à l'ARN et dans l'efficacité de

rétrotransposition. Ainsi suivant le type de mutation, cela pourrait impacter la rétrotransposition sans affecter la capacité de liaison à l'ARN ou alors affecter la liaison à l'ARN et donc rendre impossible la rétrotransposition, que ce soit chez l'homme (Kulpa & Moran, 2005; Moran et al., 1996) ou la souris (Martin et al., 2005). La liaison de ORF1p à l'ARN, dont il est issu, est donc indispensable à l'insertion du LINE-1 dans le génome. ORF1p possède aussi 4 sites de phosphorylation, 2 dans le domaine RRM et 2 domaines N-terminal. La phosphorylation de ces sérines et thréonines est là aussi indispensable à la rétrotransposition (Cook et al., 2015; Furano & Cook, 2016).

Comme nous l'avons vu, ORF1p est capable de former des trimères via le domaine superhélice. Cependant il a aussi été montré *in vitro* que ORF1p peut massivement polymériser et former des multimères de trimères (Callahan et al., 2012; Naufer et al., 2019). Cette polymérisation est indépendante de la présence d'oligonucléotides. De plus, il a récemment été montré que la partie N terminal et la superhélice de la protéine ORF1p humaine possèdent des propriétés de séparation de phase *in vitro* (Newton et al., 2021). Des spécificités de séquences ARN peuvent aussi influencer la capacité de ORF1p à former des granules. Les répétitions de séquences ARN « GGGGCC » (ou G4C2) par exemple, favorisent l'agglomération de ORF1p (Pereira et al., 2018). Ces séquences ARN répétées sont abondamment présentes dans les LINE-1s actifs (Sahakyan et al., 2017). Enfin, les interacteurs de ORF1p pourraient aussi participer à son agglomération (Pereira et al., 2018).

I.C.3 : ORF1p: partenaires.

Dans tous ces tissus et cellules où ORF1p est exprimé, il interagit avec une multitude de partenaires. A ce jour et à ma connaissance, 9 spectrométries de masse ont été réalisées en immunoprécipitant ORF1p, ORF2p ou l'ARN LINE-1 (Ardeljan et al., 2020; De Luca et al., 2023; Goodier et al., 2013; Luqman-Fatah et al., 2023; Moldovan & Moran, 2015; Peddigari et al., 2013; M. S. Taylor et al., 2013, 2018; Vuong et al., 2019). Les 3 premières études (Goodier et al., 2013; Moldovan & Moran, 2015; M. S. Taylor et al., 2013) ont immunoprécipité ORF1p via un tag dans des lignées tumorales humaines (HEK293T et HeLa). Dans les travaux de Suresh Peddigari, les auteurs ont quant à eux immunoprécipité l'ARN LINE-1 par RIP (RNA

ImmunoPrecipitation) (Peddigari et al., 2013). Bien que dans ces quatre études, le vecteur LINE-1, le type de Tag et la méthode de détection des partenaires étaient différents, un nombre important d'interacteurs communs sont ressortis de ces études protéomiques (Pizarro & Cristofari, 2016). Ces études ont permis de caractériser de nouveaux acteurs interagissant avec le LINE-1-RNP, facilitant ou réprimant le cycle de vie du LINE-1. L'équipe de Goodier a en particulier étudié l'effet de certains de leur interacteurs sur l'efficacité de la rétrotransposition des LINE-1s (test de rétrotransposition) et ont caractérisé de puissants inhibiteurs des LINE-1, impliqués notamment dans le contrôle des rétrovirus. La spectrométrie de masse qui suivie fut dirigée contre ORF1p endogène, dans des cellules souches embryonnaires humaines, faisant ainsi de cette étude la première dirigée sur l'ORF1p naturellement présent dans des cellules non-transformées (Vuong et al., 2019). Des partenaires communs aux études précédentes et de nouveaux interacteurs furent caractérisés. Une autre spectrométrie de masse fut ensuite réalisée sur l'ORF1p endogène dans des tissus tumoraux humains (seins, ovaire et colon) dans le but de quantifier ORF2p mais sans succès (Ardeljan et al., 2020). Une autre étude faite sur un ORF1p taggué dans des cellules HeLa a permis de caractériser de nouveaux régulateurs de LINE-1 (Luqman-Fatah et al., 2023). Les auteurs ont aussi immunoprécipité avec ORF1p de nombreuses protéines faisant partie des ISG (Interferon Stimulated Genes). Ils ont proposé une hypothèse selon laquelle il existerait une boucle de régulation négative entre les transcrits LINE-1s et les protéines stimulées par l'interféron, avec ORF1p comme « bouclier » pour atténuer cette boucle. Les auteurs ont aussi défini la protéine HELZ2 comme nouvelle inhibiteur des rétrotransposons LINE-1s chez l'humain. Enfin la dernière spectrométrie de masse sur ORF1p réalisée à ce jour identifie les partenaires endogènes dans les spermatocytes de souris déficiente en ARN piwi (De Luca et al., 2023). Leurs travaux mettent en évidence de nouveaux partenaires, dont l'interaction avec de nouveau complexe, comme les ribosomes.

Toutes ces analyses protéomiques ont révélé des interactions avec des protéines impliquées dans le transport, la dégradation, la traduction et la reconnaissance des ARNs mais aussi des modificateurs post-transcriptionnels, des hélicases et des facteurs d'épissage. Les ARNs liés à ORF1p ont aussi été caractérisés, par Séquençage RIP et ont permis d'identifier des ARN contenus principalement dans les P-bodies (Briggs et al., 2021), des « corps » formés

par séparation de phase et impliqués dans l'équilibre entre la dégradation et la traduction des ARN messenger (Parker & Sheth, 2007).

Cependant, notre connaissance de ORF1p dans le cerveau reste très limitée. Comme mentionné plus haut, nous savons que ORF1p est exprimé dans quelques régions du cerveau humain, mais guère plus (Sur et al., 2017). Pourtant l'expression des LINE-1s est quant à elle bien relatée dans le cerveau humain (Guo et al., 2018; McKerrow et al., 2023; Pereira et al., 2018; Savage et al., 2019; Y. Zhang et al., 2022).

I.D: LINE-1 dans le cerveau

I.D.1 Mosaïcisme Somatique

En effet, plusieurs études ont montré une expression de LINE-1s dans le cerveau ainsi qu'une capacité à pouvoir rétrotransposer dans ce tissu (Coufal et al., 2009; Macia et al., 2017; Muotri et al., 2005, 2010), avec même un taux plus élevé que dans d'autres tissus (Baillie et al., 2011; Coufal et al., 2009; Evrony et al., 2012; Muotri et al., 2005; Suarez et al., 2017). Il faut toutefois préciser que cela a été montré dans des régions comme l'hippocampe, où la neurogénèse est présente.

Cette activation des rétrotransposons LINE-1s pourrait conduire à un mosaïcisme génétique dans les cellules somatiques du cerveau (Figure 8). Ce phénomène fait largement écho avec les travaux initiaux sur la découverte des ETs et le mosaïcisme de couleur retrouvé sur les épis de maïs de Barbara McClintock. Ces insertions ayant lieu dans les gamètes, il est estimé que chaque individu diffère de son semblable par environ 285 événements d'insertions de LINE-1s, participant activement à la variabilité génétique inter-individuel (Ewing & Kazazian, 2010). Ajouté à cela, l'insertion de LINE-1s va aussi avoir lieu lors de l'embryogenèse et initier un mosaïcisme au niveau intra-individuel (Kano et al., 2009).

Une fois l'organisme développé, ces insertions vont aussi toucher les cellules souches nerveuses (NSC pour Neural Stem Cell) (Coufal et al., 2011). Lors de la différenciation des cellules souches nerveuses en cellules postmitotiques neuronales, il y a une réduction du niveau de méthylation dans les promoteurs LINE-1s conduisant à leur dérégulation créant ainsi un

terrain favorable à de nouvelles insertions (Coufal et al., 2009; Muotri et al., 2005, 2010; Richardson et al., 2014). Ce phénomène n'est pas caractérisé dans la différenciation des cellules souches nerveuses en cellules post-mitotiques gliales.

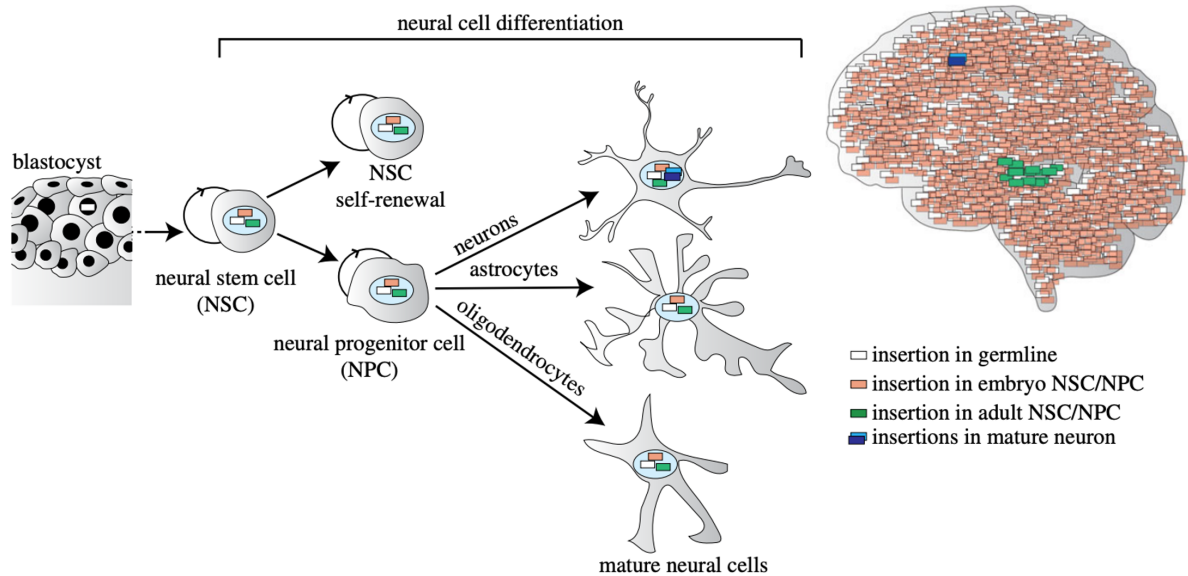


Figure 8 : Modèle de rétrotransposition de LINE-1s conduisant au mosaïcisme génétique des cellules du cerveau (d'après Bodea et al. 2018)

Les neurones seraient peut-être donc plus enclins à contenir de nouvelles insertions, avant même de devenir matures. A la différence des autres cellules post-mitotiques du cerveau, ces neurones matures vont demeurer durant pratiquement toute la vie de l'individu (Bodea et al., 2018). Bien qu'il ne soit pas déterminé avec certitude que la rétrotransposition de LINE-1s endogène a lieu dans les neurones matures post-mitotiques dans le cerveau, elle a cependant été montrée par test de rétrotransposition dans des neurones différenciés à partir des précurseurs *in vitro* (Macia et al., 2017). Cela avait aussi déjà été montré auparavant dans des cellules de fibroblaste et de foie humain ne se divisant pas (Kubo et al., 2006). De ce fait le mosaïcisme somatique pourrait donc avoir lieu dans les neurones matures post-mitotiques durant toute la vie de l'individu, faisant de ces cellules de potentiels accumulateurs d'insertions LINE-1s. D'autant plus que les neurones expriment environ deux fois plus d'ARN LINE-1s que les autres cellules du cerveau de la souris (McKerrow et al., 2023). En analysant les génomes d'échantillons *post-mortem* humains du noyau caudé et de l'hippocampe d'individus d'âge avancé par RC-Seq (Retrotransposon Capture Sequencing), les

auteurs ont pu identifier un total de 7743 insertions somatiques putatives LINE-1 chez les 3 individus analysés (Baillie et al., 2011).

Ces résultats rendent compte de l'étendue de cette potentielle rétrotransposition dans le cerveau mais aussi de la grande permissivité de cet organe face à l'expression et l'insertion des LINE-1s (Faulkner & Garcia-Perez, 2017).

I.D.2 Expression

L'expression des LINE-1s dans le cerveau est bien caractérisée, notamment via des analyses de RNA-Seq et de RTqPCR (Bedrosian et al., 2018; Blaudin de Thé et al., 2018; Guo et al., 2018; Moszczynska, 2020; Savage et al., 2019; W. Sun et al., 2018; T. Takahashi et al., 2022). Ces études ont permis de montrer une expression basale de LINE-1 dans le cerveau d'individus sains chez l'Homme et la souris. Récemment, une étude a permis d'aller plus loin dans notre connaissance de l'expression de LINE-1 dans le cerveau. En effet, comme mentionné plus haut, cette récente étude a pu caractériser, par une approche de 5' RNA-Seq sur cellule unique, l'expression des LINE-1s dans plusieurs milliers de cellules provenant de l'hippocampe de souris (McKerrow et al., 2023). Les auteurs ont ainsi démontré que cette expression était plus forte dans les types cellulaires neuronaux que dans les autres types cellulaires comme les microglies, les oligodendrocytes et les astrocytes bien que tous les types cellulaires soient capables d'exprimer l'ARN LINE-1 en condition physiologique.

Cependant, la plupart de ces études ne relatent pas simplement l'expression de LINE-1 dans le cerveau, mais aussi une dérégulation de cette expression soit dans un contexte de vieillissement, soit dans un contexte pathologique (Blaudun de Thé et al., 2018; Guo et al., 2018; Pereira et al., 2018; Savage et al., 2019; W. Sun et al., 2018; T. Takahashi et al., 2022; Terry & Devine, 2020). Par les avancées technologiques dans le domaine du séquençage et une recherche intense, on observe depuis quelques années de nombreux liens entre l'expression des éléments transposables et plus particulièrement entre LINE-1 et le vieillissement mais aussi entre LINE-1 et les maladies neurodégénératives (MNs).

La deuxième partie de cette introduction vise donc à définir le vieillissement, les MNs et leurs liens avec l'expression des LINE-1s.

Chapitre II: LINE-1 dans le vieillissement et les maladies neurodégénératives.

II.A: Vieillissement et Maladies neurodégénératives...

I.A.1 Le vieillissement

Le vieillissement peut se définir comme un processus naturel et progressif conduisant à l'incapacité d'un organisme à maintenir son homéostasie avec le temps. Récemment, il a été proposé de caractériser le vieillissement comme un ensemble de 12 composantes (Figure 9): l'instabilité génomique, l'attrition des télomères, les altérations épigénétiques, la perte de la protéostase, une désactivation de la macroautophagie, la dérégulation de la détection des nutriments, le dysfonctionnement mitochondrial, la sénescence, l'épuisement des cellules souches, l'altération de la communication intercellulaire, l'inflammation chronique et la dysbiose (Lopez-Otín et al., 2023). Jusqu'à peu, ces composantes étaient au nombre de neuf (Hou et al., 2019; Lopez-Otín et al., 2013), mais 3 nouvelles composantes ont été intégrées pour définir le vieillissement (désactivation de la macroautophagie, inflammation chronique et dysbiose). Ces composantes peuvent être de trois ordres : primaire, antagoniste et intégrative.

Les composantes primaires vont s'accumuler au cours du temps et les manifestations de leurs détériorations ont lieu au cours du vieillissement. Ces composantes se caractérisent par des dommages impactant le génome, les télomères, l'épigénome, le protéome et les organites. L'accumulation de ces dommages au cours de la vie de l'organisme contribue directement au processus de vieillissement.

Les composantes antagonistes, reflètent quant à elles la réponse aux dommages des composantes primaires. Elles arrivent plus tardivement et constituent une forme de compensation qui va manifestement participer au vieillissement. Ces composantes antagonistes se caractérisent par la dérégulation de la détection des nutriments, le dysfonctionnement mitochondrial et la sénescence.

Enfin, dans un dernier temps, les composantes dites intégratives vont apparaître lorsque les composantes primaires et antagonistes ne peuvent plus être compensées. Cela se caractérisera par un épuisement du pool des cellules souches au sein des tissus, une altération des communications intercellulaires, une inflammation chronique ainsi qu'une dérégulation du microbiote intestinale.

Il est important de noter que ces différents aspects du vieillissement sont intrinsèquement dépendant les uns des autres.

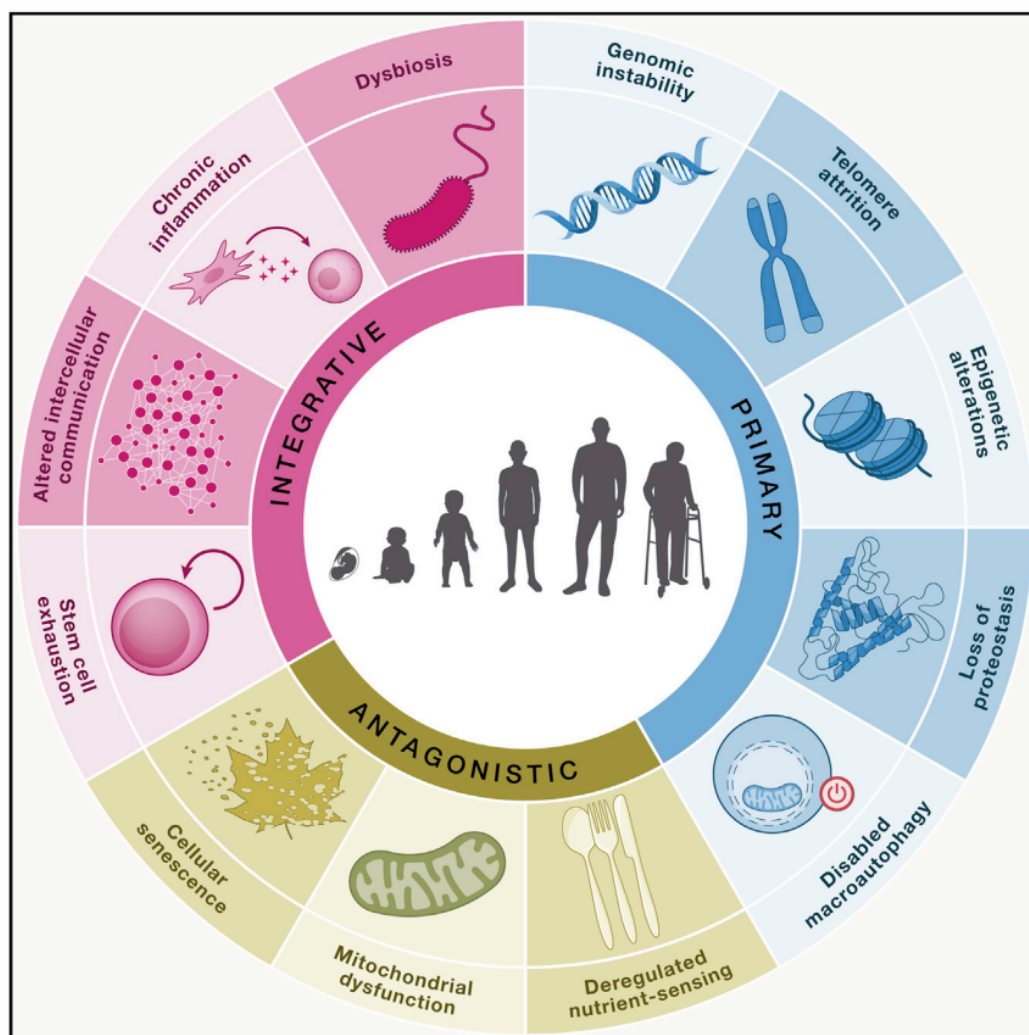


Figure 9 : Les composantes du vieillissement (d'après Lopez-Otin et al. 2023)

Schéma compilant les 12 caractéristiques du vieillissement : l'instabilité génomique, l'attrition des télomères, les altérations épigénétiques, la perte de la protéostase, la désactivation de la macroautophagie, la dérégulation de la détection des nutriments, le dysfonctionnement mitochondrial, la sénescence, l'épuisement des cellules souches, l'altération de la communication intercellulaire, l'inflammation chronique et la dysbiose.

Le génome est donc marqué au cours du vieillissement par des instabilités génomiques et des altérations épigénétiques. Au cours de notre vie, différents facteurs endogènes et exogènes vont menacer l'intégrité de notre génome (erreurs induites lors de la réplication, agents chimiques, stress oxydatif, etc...). De ce fait plusieurs stratégies de réparation de l'ADN ont été mises en place en fonction de la nature des dommages à l'ADN tel que la réparation par excision de base ou par mésappariements qui vont aussi induire des mutations. De plus, la réparation de ces mutations a un certain coût énergétique pour la cellule qui devra donc les tolérer au détriment de son intégrité génomique (Nik-Zainal & Hall, 2019). Au cours du temps, les génomes des cellules qui nous composent vont alors accumuler un certain nombre de mutations (Huang et al., 2022). A titre d'exemple, à un âge d'environ 40 ans, certains tissus vont accumuler plus de 2000 mutations par cellule (Martincorena et al., 2018). L'emplacement et le taux d'accumulation de ces mutations dans le génome impactera *in fine* l'expression de gènes. Différentes études démontrent l'importance des protéines impliquées dans la réparation de l'ADN sur le processus de vieillissement (Quesada et al., 2019; Tian et al., 2019). Les protéines de la famille des sirtuines par exemple sont des histones désacétylases de classe III (Bhatt & Tiwari, 2023). Une partie de ces sirtuines est impliquée dans la réparation de l'ADN (SIRT1, SIRT6 et SIRT7) (Vazquez et al., 2019). SIRT6 par exemple est une sirtuine impliquée dans la réparation par excision de base de l'ADN (Kawahara et al., 2009; Mostoslavsky et al., 2006). Sa surexpression restaure l'efficacité de la réparation par recombinaison homologue dans les cellules sénescentes (Mao et al., 2012). Chez la souris, l'absence de SIRT6 mène à un vieillissement prématuré (Mostoslavsky et al., 2006; Simon et al., 2019) alors que sa surexpression ralentit ce processus (Tian et al., 2019). De plus, de rares variants de cette protéine ont été détectés chez plusieurs centenaires (Simon et al., 2022). SIRT7, une autre sirtuine, est nécessaire pour la réparation des cassures double brins de l'ADN par jonction d'extrémités non homologues (Vazquez et al., 2016). Tout comme SIRT6, les souris invalidées (knock-out) pour le gène SIRT7 ont une espérance de vie réduite (Bhatt & Tiwari, 2023; Lagunas-Rangel, 2022; Vazquez et al., 2016). D'autres exemples non mentionnés ici font des sirtuines des régulateurs clés du vieillissement (Bhatt & Tiwari, 2023). Ces protéines, en désacétylant les histones, sont aussi de grands régulateurs de l'épigénome, lui aussi impacté dans le processus de vieillissement.

Les altérations de l'épigénome touchent la méthylation de l'ADN, les marques post-traductionnelles des histones et le remodelage de la chromatine. A noter que contrairement aux mutations explicitées plus haut, ces altérations de l'épigénome sont dynamiques et peuvent être réversibles.

Globalement, lors du processus de vieillissement, on observe une hypométhylation de l'ADN (Ciccarone et al., 2018; Urban et al., 2021). Cela a donné naissance à une théorie du vieillissement : « l'horloge épigénétique » selon laquelle on pourrait déterminer l'âge, d'un organe par exemple, en fonction du degré de méthylation de l'ADN (Horvath & Raj, 2018). Quoiqu'il en soit, aucun lien de causalité n'a été trouvé entre vieillissement et méthylation du génome, toutefois le vieillissement est bien associé à une déméthylation de l'ADN (Seale et al., 2022).

Le vieillissement s'accompagne aussi d'une modification des marques d'histones. Ces marques tendent à s'acétyler avec le temps (notamment la lysine 16 de l'histone H4), conduisant à une relaxation de la chromatine et donc aussi à une exposition de l'ADN pouvant être délétère pour son intégrité (Lopez-Otín et al., 2023). Comme mentionné plus haut les histones désacétylases de la famille des sirtuines régulent ces acétylations, et sont intimement liées au processus de vieillissement (Bhatt & Tiwari, 2023; K. Brown et al., 2013; Kawahara et al., 2009; Mostoslavsky et al., 2006; Simon et al., 2019). A l'inverse, les histones acétyltransférases peuvent participer au phénotype de sénescence. Une inactivation du gène KAT7, gène codant pour une histone acétyltransférase de la lysine 14 de l'histone H3, permet un allongement de la durée de vie chez la souris (W. Wang et al., 2021). Par leurs importances dans l'accessibilité du génome et la dynamique du transcriptome, les protéines impliquées dans les modifications post-traductionnelles des histones sont de près ou de loin liées au processus de vieillissement. Chez *drosophila melanogaster* par exemple, une mutation perte de fonction sur HP1 α conduit une baisse de la longévité. A l'inverse cette longévité est augmentée lorsque l'on surexprime HP1 α (Larson et al., 2012). Ainsi il est globalement montré que la relaxation de la chromatine contribue au vieillissement, alors qu'une chromatine condensée et maintenue sous forme d'hétérochromatine, est signe de longévité (Lopez-Otín et al., 2023). Cette ouverture au cours du vieillissement peut conduire à une dérégulation des ETs normalement réprimés par la méthylation de l'ADN, les marques d'histones et les remodeleurs chromatiniens. Cet aspect sera abordé au prochain sous chapitre.

Ces composantes du vieillissement explicitées ici touchent, bien que de manière différente et inégale, tous les organes qui nous composent. Cependant, un organe demeure particulièrement exposé à ce processus naturel.

I.A.2 Le vieillissement dans le cerveau

La susceptibilité du cerveau face au processus de vieillissement peut s'expliquer principalement par la nature même des neurones. Tout d'abord, les neurones ont une certaine vulnérabilité aux dommages à l'ADN (Katyal et al., 2014; Peze-Heidsieck et al., 2021). Ensuite, là où les autres types cellulaires vont perdurer dans notre corps, de quelques jours comme les entérocytes, à quelques années comme les ostéocytes, les neurones vont eux demeurer quasiment toute notre vie (Dolivo et al., 2016; Sameri et al., 2020). Toutes ces cellules vont être confrontées aux processus de vieillissement, notamment les composantes primaires et antagonistes, jusqu'à leur remplacement périodique. Mais comme les neurones ne peuvent pas être renouvelés, ils vont donc devoir subir et accumuler ces composantes (instabilités génomique, épigénomique et du protéome). Pour rappel, certaines composantes dites « intégratives » du vieillissement s'expliquent par un épuisement des cellules souches et une altération des communications cellulaires. Ces aspects peuvent toucher les astrocytes, oligodendrocytes et cellules microgliales de notre cerveau. Les neurones vont eux passer par un stade de perte d'identité, de phénotype sénescence ou directement dégénérés sans passer par cette étape d'épuisement de cellules souches (Mattson & Magnus, 2006; Sikora et al., 2021). Pour accentuer le tout, la complexité des réseaux neuronaux repose sur des régions définies, parfois composées uniquement d'une centaine de neurones. Ainsi la composante intégrative expliquée par l'altération des communications cellulaires peut être directement et fortement impactée dans le cas du cerveau (Camandola & Mattson, 2017; Mattson & Arumugam, 2018). Bien que le réseau de neurones soit plastique, la dégénération de plusieurs neurones peut incomber fortement les communications cellulaires, là où d'autres organes, moins complexes, peuvent maintenir l'équilibre de cette communication cellulaire à la suite d'une perte bien plus importante de cellules. D'autant plus que chaque population neuronale peut avoir une certaine vulnérabilité face au vieillissement, en particulier les neurones dopaminergique (Pandya & Patani, 2021; Surmeier et al., 2017). Les neurones ont aussi un fort

métabolisme et un transport actif de quantité importante de protéines du soma jusqu'aux synapses, deux aspects pouvant participer à cette prédisposition.

Enfin, la prédisposition des neurones au vieillissement est bien documentée sur le plan de la protéostase. En effet, les neurones accumulent au cours de leur vie un grand nombre de protéines, parfois mal repliées, oxydées ou ubiquitinylées. C'est le cas par exemple de la lipofuscine, une protéine provenant de la dégradation incomplète des lysosomes, qui va s'accumuler tout au long de la vie du neurone. L'injection intranasale de HSP70 chez la souris améliore l'activité du protéasome ce qui aura pour effet une meilleure dégradation de la lipofuscine avec une amélioration de l'espérance de vie (Bobkova et al., 2015). D'autres accumulations de protéines ont un effet néfaste pouvant activer d'autres composantes du vieillissement. Ces protéines vont former des agrégats se traduisant notamment par des inclusions de « corps » intra-cellulaires ou des plaques extracellulaires qui vont toucher différentes régions du cerveau (Hipp et al., 2019). Chez le rat, l'alpha-synucléine par exemple, tend à se propager au cours du vieillissement pour devenir par la suite pathologique (Van Den Berge et al., 2021). De la même manière, une autre protéine, l'amyloïde-beta, est aussi accumulée dans les neurones au cours du processus naturel de vieillissement (Burrinha & Guimas Almeida, 2022). Or, ces deux protéines, que sont l'alpha-synucléine et l'amyloïde-beta sont intimement et respectivement liées à deux pathologies neurodégénératives, la maladie de Parkinson (MP) et la maladie d'Alzheimer (MA) (Balusu et al., 2023). Bien que le parallèle entre le vieillissement et l'établissement des maladies neurodégénératives reste encore à définir on peut néanmoins établir que l'âge est un facteur de risque dans le développement des MNs si ce n'est le principal. Cependant, cet aspect ne fait pas l'unanimité dans la communauté scientifique (Hou et al., 2019; Reeve et al., 2014). Toutefois les parallèles entre processus du vieillissement et maladies neurodégénératives sont indéniables. Le phénomène de vieillissement pourrait donc constituer une forme de prédisposition dans l'établissement des MNs.

On observe à un certain âge et dans le cadre d'un vieillissement « normal » une spécificité de certaines régions du cerveau à la neurodégénérescence (Pandya & Patani, 2021). Ainsi, ne pourrait-on pas considérer l'établissement des MN comme une exacerbation du vieillissement, où l'atteinte de la population neuronale de cette région est telle, qu'elle induit une pathologie décelable sur le plan cognitif ou moteur ?

I.A.3 Les maladies neurodégénératives.

Les maladies neurodégénératives sont un groupe de différentes pathologies neurologiques touchant le système nerveux central ou périphérique. Elles se caractérisent par la perte progressive et sélective d'une population neuronale. Ces maladies peuvent être dans de rares cas héréditaires et résulter de gènes défectueux généralement identifiés. Dans d'autres rares cas, ces pathologies peuvent être aussi due à l'absorption d'agents chimiques neurotoxiques. Ainsi on s'attardera ici uniquement sur les cas sporadiques des MN qui représentent l'immense majorité des cas, bien que les cas familiaux aient permis de caractériser des gènes permettant de mieux comprendre ces pathologies. Les causes exactes des MN menant à la neurodégénérescence de populations neuronales ne sont pas connues. Cependant les MNs partagent des caractéristiques communes : la neurodégénérescence est sélective au niveau d'une région particulière du cerveau et la pathologie va s'étaler et toucher d'autres régions au cours du temps (Fu et al., 2018). D'autre part, il a récemment été montré que les MNs, tout comme le vieillissement partagent aussi des composantes communes (Hou et al., 2019; Wilson et al., 2023). On retrouvera : l'instabilité génomique (Blaudin de Thé et al., 2018; Madabhushi et al., 2014), l'attrition des télomères (Herrmann et al., 2018), les altérations épigénétiques (Bradley-Whitman & Lovell, 2013; Hwang et al., 2017), la perte de la protéostase (Tanaka & Matsuda, 2014), le dysfonctionnement mitochondrial (Menzies et al., 2017), la sénescence (Bhat et al., 2012; Chinta et al., 2018), l'épuisement des cellules souches (Vivar, 2015), l'altération de la communication intercellulaire (De Felice & Lourenco, 2015) et l'inflammation chronique (Hickman et al., 2018) ainsi que des composantes spécifiques des MNs comme des anomalies du cytosquelette (Millecamps & Julien, 2013) et des défauts du réseau synaptique (Fornito et al., 2015). L'agrégation anormale de certaines protéines est plus ou moins spécifique à chaque MN.

Parmi les MNs, la MA est la plus fréquente. Elle se caractérise par une perte progressive et irréversible des capacités cognitives débouchant sur de l'apraxie, de l'agnosie et/ou de l'aphasie en fonction des régions cérébrales touchées (Förstl & Kurz, 1999). Les causes

supputées de la maladie sont multiples et donnent naissance à différentes hypothèses. Bien qu'il y ait des causes génétiques à cette pathologie, elles n'expliquent pas à elles seules l'établissement de la MA. On pourra citer tout de même le gène APOE codant pour l'apolipoprotéine qui est impliquée dans le métabolisme des lipides (Sienski et al., 2021). Une des allèles de ce gène, APOEε4 constitue un facteur de risque pour la maladie (Mahley et al., 2006). Ainsi la majorité des individus atteints d'Alzheimer possèdent cet allèle et on ajoutera que les individus homozygotes pour APOEε4 ont un risque 15 fois plus élevé de développer la maladie (Blennow et al., 2006). La MA se caractérise aussi par des agrégations de protéines. On retrouve principalement deux types d'agrégations relatives à deux protéines distinctes. Le premier est composé d'amyloïde beta. Cette protéine supputée comme ayant des fonctions au niveau synaptique va s'agréger au niveau extracellulaire (Hiltunen et al., 2009). Elle va former des plaques amyloïdes, notamment dans l'hippocampe, les lobes temporaux, qui finissent par rejoindre le cortex frontal. Il existe une corrélation entre un niveau élevé de plaques d'amyloïde beta et les déficits cognitifs (Hsiao et al., 1996; Lesné et al., 2006). Le deuxième type d'agrégation est causé par la protéine Tau. Plusieurs pathologies partagent ce phénotype. Elles portent le nom de tauopathies. La protéine tau est associée au cytosquelette et forme les microtubules, essentiel au transport axonal des neurones (Harada et al., 1994). Dans les tauopathies, on observe une agrégation sous forme d'un enchevêtrement de neurofibrille de tau phosphorylée. A l'instar de la protéine amyloïde beta, l'accumulation de la protéine sous forme d'enchevêtrement de neurofibrilles est liée à une déficience cognitive (Tremblay et al., 2017) et ces structures apparaissent dans l'hippocampe et les lobes temporaux puis rejoignent le cortex. En revanche, l'agrégation de tau a lieu au niveau intra-cellulaires, au sein des neurones. Ces neurofibrilles et ces plaques, respectivement induites par tau phosphorylé et la beta amyloïde induisent une neurotoxicité et constituent un facteur déterminant dans la pathologie (Nelson et al., 2012).

La MP constitue la deuxième pathologie la plus fréquente parmi les MNs. Elle se caractérise par la perte progressive des neurones dopaminergiques, en particulier dans la *substantia nigra pars compacta*, une région du mésencéphale impliquée entre autres dans la motricité. Cette perte entraîne trois troubles caractéristiques de la pathologie qui sont le tremblement au repos, l'akinésie et la rigidité et que l'on nomme la triade parkinsonienne (Kalia & Lang, 2015). Tout comme la MA, la MP possède aussi des facteurs génétiques

notamment avec les gènes PINK1, SNCA ou PRKN par exemple (Quesada et al., 2019; Vizziello et al., 2021). Encore une fois ces facteurs d'ordre génétique n'expliquent pas à eux seuls l'établissement de la MP en revanche, ils permettent de pointer du doigt un des multiples aspects de la pathologie. Certains malades atteints de Parkinson vont aussi accumuler des plaques constituées de beta amyloïde. Cependant, ce sont surtout les repliements anormaux des protéines α -synucléines (codées par le gène SNCA), s'associant en fibrilles, qui pourraient potentiellement conduire à cette pathologie (Q. Wang et al., 2015). Le rôle de la protéine α -synucléine n'est pas concrètement défini mais elle joue un rôle dans la mobilité des vésicules synaptiques (J. Sun et al., 2019). Tout comme les tauopathies, les agrégats d' α -synucléine sont impliqués dans plusieurs MNs que l'on nomme les synucléinopathies. Les fibrilles d' α -synucléine forment des corps de Lewy visibles par microscopie, participant au diagnostic de ces maladies. Cependant on ignore toujours comment la transmission de l' α -synucléine se propage de neurone à neurone.

La progression des maladies d'Alzheimer et de Parkinson peut être mesurée par observation de coupes histologiques de différentes aires du cerveau. En observant la topographie et l'étendue des plaques d'amyloïde bêta et des corps de Lewy, les deux pathologies peuvent être associées à des stades (Braak et al., 2003, 2006). On parlera de stade Braak du nom du scientifique qui a mis en place ces diagnostics.

Récemment, d'autres protéines sont caractérisées comme formant des structures pouvant être reliées aux MNs. Après ces plaques et fibrilles macroscopiques, observées depuis des décennies, c'est maintenant le tour à d'autres protéines. Ainsi depuis seulement quelques années, des chercheurs pointent du doigt le possible rôle des protéines de liaison à l'ARN dans l'agglomération protéique et leur lien dans l'établissement de certaines MNs (J. L. Carey & Guo, 2022; Conlon & Manley, 2017; Milicevic et al., 2022; Naskar et al., 2023; Portz et al., 2021; Xiang et al., 2023). Ainsi, la complexité de cette équation semble désormais intégrer les protéines liées à l'ARN, l'ARN lui-même et leurs interactions réciproques. On retrouvera par exemple les protéines Fus ou TDP-43 (J. L. Carey & Guo, 2022; Jo et al., 2020; Portz et al., 2021) dont l'agrégation semble liée aux MNs. Ces recherches dans le domaine n'en sont qu'à leurs débuts et montrent une nouvelle fois la grande difficulté à comprendre les mécanismes sous-jacents de ces maladies.

Ainsi, après des décennies de recherche intense dans le domaine, l'étiologie des MNs reste encore floue. L'essentiel de ces recherches s'est porté sur le génome codant, ses protéines et leur nature à former des agrégats. Cependant, avec les avancées récentes des technologies de séquençage, il est désormais possible de mesurer l'expression des éléments transposables dans le contexte de ces pathologies. Ainsi, des travaux sous le prisme de la partie non-codante du génome voient le jour et sont en train de façonner la compréhension de ces maladies idiopathiques. Puisqu'il semble maintenant qu'une approche holistique soit la seule solution pour décrypter les causes de ces pathologies.

II.B: ...Associées aux LINE-1s ?

II.B.1 Dérégulation des LINE-1s et vieillissement

Depuis peu, de plus en plus de travaux convergent vers l'idée d'une dérégulation des éléments transposables au cours du vieillissement (Copley & Shorter, 2023). En effet comme nous l'avons vu précédemment, une multitude de facteurs régule sur différents niveaux les ETs et en particulier les LINE1s. Or une partie de ces facteurs va être impactée lors du vieillissement, conduisant à une dérégulation de ces ETs (Figure 10).

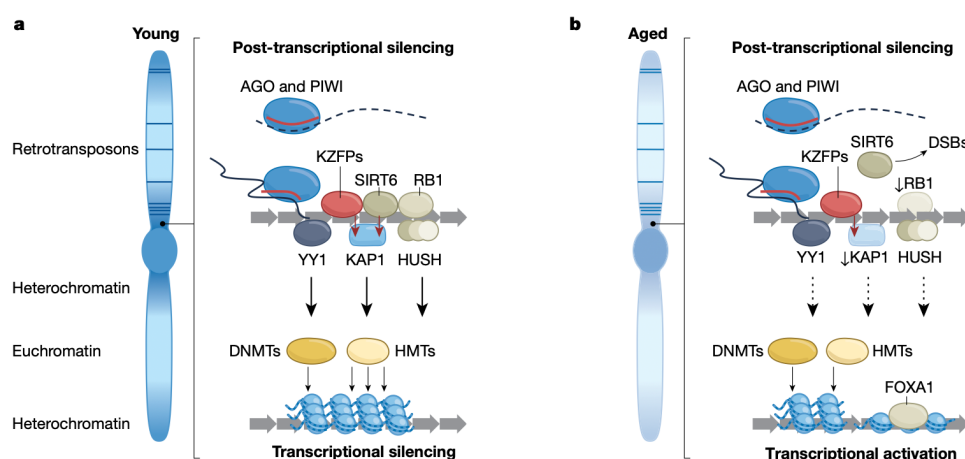


Figure 10 : Régulateurs transcriptionnels des rétrotransposons et leur défaillance au cours du vieillissement (d'après Gorbunova et al. 2021) L'Hétérochromatine est représentée en bleu foncée et l'euchromatine en bleu claire.

Nous avons vu d'une part que le niveau de méthylation de l'ADN baisse au cours du processus de vieillissement et d'autre part que cette méthylation constitue le premier socle de repressions des LINE-1s. Ainsi cette déméthylation pourrait entraîner une dérégulation globale des ETs, bien qu'à ce jour il n'existe pas d'étude formelle le démontrant. En revanche des analyses de RNA-seq montrent que des interventions visant à ralentir le vieillissement minimisent l'activation des rétrotransposons chez la drosophile (Wood et al., 2016) et chez la souris (Wahl et al., 2021). Récemment, il a été montré que l'expression des rétrotransposons, indépendamment du processus d'insertion, contribue au vieillissement chez la drosophile (Schneider et al., 2023). D'autre part, une étude portant sur les ETs, et plus généralement sur les éléments répétés au cours du vieillissement, montre une corrélation entre le niveau d'expression de ces éléments et l'âge des individus (LaRocca et al., 2020). Ainsi, dans ces fibroblastes humains en culture (issus d'individus d'âges différents), les auteurs avancent que ces éléments répétés pourraient constituer des marqueurs transcriptomiques afin de mesurer l'âge biologique, mais aussi des contributeurs du vieillissement (LaRocca et al., 2020).

Les marques post-traductionnelles d'histones jouent aussi un rôle prépondérant dans le maintien de la répression des LINE-1s. Dans les cellules sénescentes, une perte des marques H3K9me3 et H3K27me3 au niveau des loci LINE-1s a été observée, accompagnée par la dérégulation de ces rétrotransposons (De Cecco et al., 2019). Plus globalement, il est montré que les cellules sénescentes ont un niveau d'hétérochromatine plus faible, associé à une activation des ETs (De Cecco et al., 2013). Le cas de la protéine SIRT6 constitue peut-être l'exemple le plus marquant du phénomène de dérégulation des LINE-1s dans le contexte du vieillissement. En effet, chez la souris, il a été montré que la dérégulation des LINE-1s orchestrée par SIRT6 devient moins efficace au cours du vieillissement (Van Meter et al., 2014). Une autre étude a démontré que les souris dont le gène SIRT6 a été désactivé et qui présentent un phénotype de vieillissement précoce ont une plus forte expression de LINE-1s (Simon et al., 2019). Cette expression accrue est détectable dans de nombreux organes de la souris dont le cerveau. Les auteurs observent les mêmes résultats chez des souris âgées de souche sauvage (WT). Par l'utilisation d'inhibiteurs de la transcriptase inverse ou NRTIs (Nucleoside analog reverse-transcriptase inhibitors) bloquant

la rétrotransposition, ils ont été capables de prolonger la durée de vie des souris déficientes pour SIRT6. Ainsi, il semble que la dérégulation des LINE-1s n'est pas seulement une conséquence du vieillissement, mais probablement l'une de ses composantes. Il est intéressant de noter qu'un variant de la protéine SIRT6 a été identifié chez des individus centenaires et que ce variant réprime plus efficacement LINE-1 (Simon et al., 2022). D'autres approches, utilisant aussi des NRTIs, ont permis d'améliorer les fonctions cognitives ainsi que de réduire la neuroinflammation chez des souris WT âgées (Wahl et al., 2023). D'autant plus que la dérégulation des LINE-1s influence les autres composantes du vieillissement énumérées plus haut. La dérégulation des ETs est d'ailleurs largement évoquée dans la revue de Lopez-Otin de cette année sur les 12 composantes de vieillissement, cependant cette dérégulation est classifiée sous la composante « altération épigénétique » (Lopez-Otin et al., 2023). Or, aux vues des thèmes abordés dans cette introduction, il est indéniable que cette dérégulation n'est pas seulement une simple altération épigénétique mais s'accompagne de multiples conséquences qui participent, voire conduisent au vieillissement.

En effet, la dérégulation des LINE-1s est bien caractérisée dans le contexte du vieillissement, cependant les possibles conséquences de cette dérégulation le sont beaucoup moins, et seront énumérées ci-dessous (Figure 11).

Si les LINE-1s peuvent générer des cassures double brins de l'ADN et qu'ils augmentent avec l'âge, alors ils pourraient accentuer la première composante du vieillissement qu'est l'instabilité génomique. C'est d'ailleurs la théorie dite de « LINEAge » qui hypothétise que les LINE-1s induiraient davantage de cassures de l'ADN au cours du temps, et qu'ils seraient des potentiels responsables d'une longévité abaissée (St Laurent et al., 2010). Un nombre croissant de récentes découvertes viennent peu à peu confirmer cette théorie.

L'équipe a précédemment montré que les LINE-1s génèrent des cassures double brins dans l'ADN des neurones dopaminergiques à la suite d'un stress oxydatif (Blaudin de Thé et al., 2018). Ce phénomène entraîne aussi la neurodégénérescence de ces neurones mais peut être abolie via l'utilisation de NRTIs. D'autre part, une perturbation de la méthylation de l'ADN dans les neurones dopaminergiques induit une augmentation de l'expression des LINE-1s et des cassures d'ADN chez la souris (Ravel-Godreuil et al., 2021). D'une manière plus générale, l'utilisation de NRTIs bloquant la rétrotransposition, réduit les dommages à l'ADN chez la

souris âgée ou soumise à un stress (Blaudin de Thé et al., 2018; Simon et al., 2019). Ces résultats sous-entendent l'implication de la dérégulation de LINE-1s dans l'instabilité génomique au cours du vieillissement.

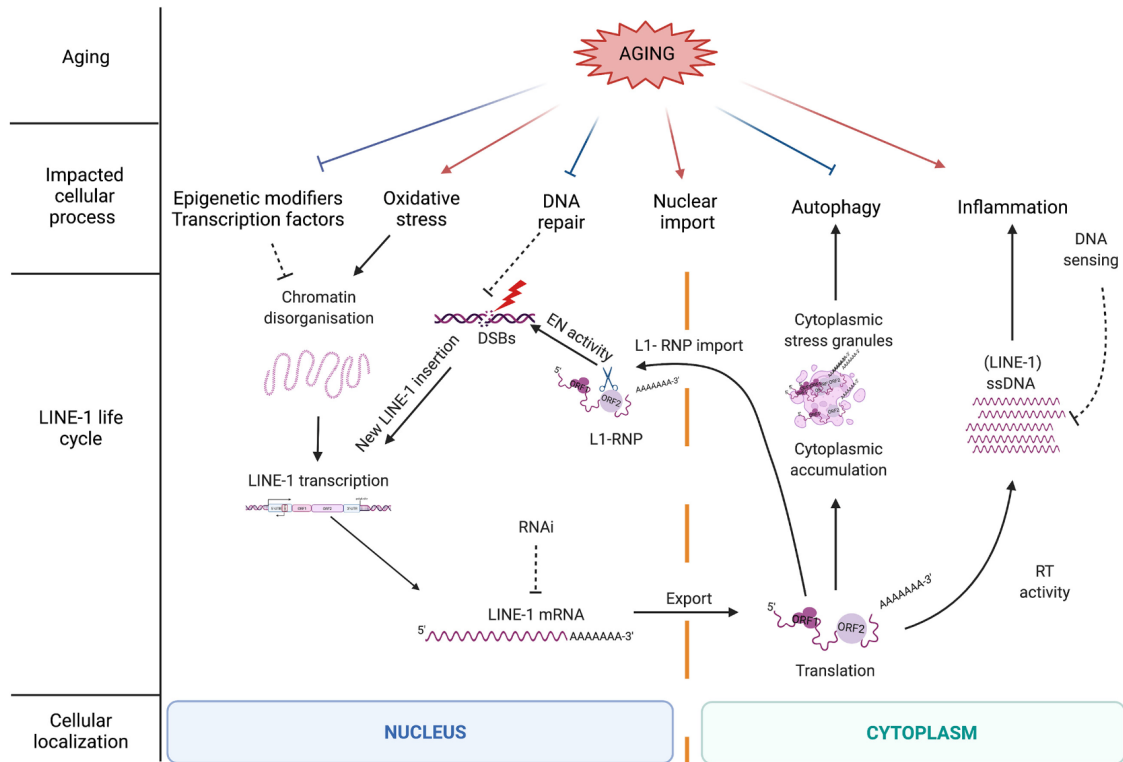


Figure 11 : Cycle de vie des LINE-1s et leurs influences sur le processus de vieillissement (d'après notre revue Peze-Heidsieck et al. 2022)

La dérégulation des LINE-1s peut aussi affecter l'état de la chromatine, une autre composante primaire du vieillissement. Il a été montré l'année passée que la dérégulation des LINE-1s va inhiber une histone lysine N-méthyltransférase : la protéine SUV39H, dans des modèles du syndrome Hutchinson-gilford chez la souris. Ces animaux ont un vieillissement précoce, et la dérégulation des LINE-1s est tout autant (Della Valle et al., 2022). Par RIP (Immunoprecipitation de l'ARN) et mesure de l'activité enzymatique de SUV39H, il apparaît que les ARN LINE-1s contenus dans le noyau vont affecter la capacité de cette protéine à maintenir les marques H3K9me3 et plus globalement de l'hétérochromatine. Dans ce même modèle et en ciblant les LINE-1s par des ASOs, ces marques épigénétiques sont restaurées et la durée de vie de ces souris est allongée. Le même mécanisme est observé in vitro dans des

cellules humaines ayant le même syndrome. De plus, l'ARN LINE-1 a la capacité d'altérer directement l'accessibilité de l'ADN en se liant aux histones et en modifiant la compaction électrostatique de la chromatine, ce qui aura pour effet de la décompacter lorsqu'il y a une forte quantité d'ARN (Dueva et al., 2019). Ainsi LINE-1 pourrait avoir, en plus de l'instabilité génomique, une influence déterminante sur les altérations épigénétiques ayant lieu au cours du vieillissement. Mais il s'avère aussi qu'une troisième composante lie la dérégulation des LINE-1 et le vieillissement : l'inflammation. En effet, la dérégulation des LINE-1s est accompagnée d'une accumulation d'ADN complémentaire (ADNc) dans le cytoplasme dans différents tissus chez les souris âgées ou déficientes pour le gène SIRT6 (De Cecco et al., 2019; Simon et al., 2019). On ignore à ce jour comment les ARNs LINE-1 peuvent conduire à une accumulation d'ADNc cytoplasmique mais deux hypothèses co-existent : soit la reverse transcription pourrait avoir lieu dans le cytoplasme en l'absence d'un brin matrice d'ADN pour l'initier ; soit durant la TPRT, l'ADNc produit ne se réintègre pas et fini par gagner le cytoplasme (Miller et al., 2021). Dans tous les cas, l'ADNc LINE-1 accumulé lors du vieillissement va être détecté et mener à l'activation de la voie cGAS-STING (Simon et al., 2019). Cette voie de l'immunité innée va déclencher une réponse interféron et l'expression de gène pro-inflammatoire. L'inhibition de la synthèse de cette ADN cytoplasmique issus des rétrotransposons, soit par utilisation NRTIs ou de shARN (short hairpin) ciblant les LINE-1s, permet de réduire l'activation des gènes relatif à l'interféron ou associé au phénotype de senescence (De Cecco et al., 2019; Simon et al., 2019). De plus, cette accumulation d'ADN LINE-1 cytoplasmique a aussi été montrée dans des cellules nerveuses déficientes pour l'exonucléase TREX1, une enzyme antivirale (Thomas et al., 2017). Les auteurs ont là aussi montré que LINE-1 était responsable de l'inflammation via l'utilisation de shARN dirigée contre LINE-1. L'accumulation des LINE-1s et la réponse immunitaire qu'elle entraîne a aussi bien été montrée dans le cerveau des souris âgées ou dans des cellules nerveuses en culture (Simon et al., 2019; Thomas et al., 2017). Ainsi la neuroinflammation notamment chronique, une composante intégrative du vieillissement, pourrait en partie venir de la dérégulation des LINE-1s.

Tous ces aspects illustrent le potentiel pathogénique que peut avoir la dérégulation des LINE-1s sur la cellule, à la fois sur l'intégrité génétique et épigénétique, mais aussi sur l'inflammation. Il n'est donc pas surprenant qu'à ce jour, il existe plus de 1000 publications

associant l'expression des LINE-1s et le cancer (Rodic, 2018) ainsi que d'autres pathologies notamment métaboliques ou auto-immunes (X. Zhang et al., 2020). Mais aux vues de l'intime lien, d'une part entre vieillissements et dérépression des ETs et d'autre part entre vieillissement et maladies neurodégénératives, qu'en est-il du lien associant ETs et MNs ?

II.B.2 Dérépression des LINE-1s lors vieillissement et son lien avec les MNs.

Plusieurs études relatent l'expression des LINE-1s dans plusieurs MNs. Dans le cadre de la maladie d'Alzheimer et des tauopathies plus généralement, une augmentation de l'expression des LINE-1s est détectée via RNA-seq dans des échantillons de cerveau *post-mortem* de patients (Grundman et al., 2021; Guo et al., 2018; Wahl et al., 2023). C'est le cas aussi pour d'autres MNs comme la Sclérose Latérale Amyotrophique (SLA) et la démence fronto-temporale (Pereira et al., 2018; Prudencio et al., 2017; Savage et al., 2019; Tam et al., 2019).

De manière générale, l'utilisation de NRTIs permet d'améliorer les fonctions cognitives et de réduire la neuroinflammation chez des souris âgées (Wahl et al., 2023). Plusieurs modèles murins développant des MNs de manière précoce ont aussi été associés à une augmentation de l'expression des LINE-1s. C'est notamment le cas des souris déficientes pour le gène *Bmi* codant pour une protéine impliquée dans la compaction de la chromatine. Les souris hétérozygotes pour le gène *Bmi* impacté possèdent un déficit cognitif accru et de nombreuses caractéristiques similaires à la maladie d'Alzheimer (El Hajjar et al., 2019). Il s'avère que ces souris présentent une forte expression des ETs dont les LINE-1s ainsi qu'une réduction des marques répressives de la chromatine au niveau des régions génomiques de ces ETs (El Hajjar et al., 2019). De manière intéressante, une diminution des transcrits *Bmi* est observée dans le cerveau de patients atteints de la MA (Flamier et al., 2018). Dans un autre modèle murin, cette fois de la maladie de Huntington, une dérégulation des LINE-1s a aussi été observée (Tan et al., 2018). Cette pathologie se manifeste par des déficits moteurs et cognitifs et se caractérise par une perte des neurones du striatum (Bates et al., 2015). C'est dans cette région que les souris R6/2, modèle utilisé communément dans l'étude de cette maladie, présentaient une déméthylation sur les séquences LINE-1s accompagnée d'une surexpression au niveau transcriptionnel (Tan et al., 2018). Dans un troisième modèle, des

souris transgéniques ayant une surexpression de LINE-1s (induite expérimentalement via CRISPRa) développaient progressivement les phénotypes de la maladie Ataxia telangiectasia, une autre MN à forte composante génétique (T. Takahashi et al., 2022). Cette pathologie affectant le cervelet se caractérise par un manque de coordination des mouvements volontaires ainsi qu'un fort déficit immunitaire (McKinnon, 2004). Ces souris transgénique LINE-1 présentaient une baisse des dommages à l'ADN et des transcrits relatifs aux gènes stimulés par l'interféron lorsqu'elle étaient traités avec des NRTIs (T. Takahashi et al., 2022). De plus, les échantillons de cervelet issus de patient atteint de cette d'ataxia telangiectasia présentent une surexpression des ARN LINE-1s et des gènes stimulés par l'interféron (T. Takahashi et al., 2022). Dans un autre modèle murin de tauopathies, il a été démontré une accélération de l'activation des ETs, notamment des LINE-1s, dans le système nerveux central au cours vieillissement (Ramirez et al., 2022). De plus, l'utilisation de NRTIs permet d'augmenter les fonctions cognitives chez ces modèles (Wahl et al., 2023). Enfin, un dernier modèle murin, cette fois de la MP, exhibe également une surexpression des LINE-1s associée à des altérations épigénétiques (Blaudin de Thé et al., 2018). Ces souris sont soit homozygotes pour En1, une homéoprotéine requise pour la survie des neurones dopaminergiques (Rekaik et al., 2015), soit injectées avec de la 6-hydroxydopamine au sein de la substance noire. Dans les deux cas, une neurodégénérescence des neurones dopaminergiques de la substance noire *pars compacta* est observée, un phénotype comparable à ce que l'on retrouve dans les malades atteints de Parkinson. Comme mentionnée précédemment, l'activation des LINE-1s va être responsable d'une partie des cassures double brins de l'ADN et ce phénomène précède la neurodégénérescence de ces neurones. La perte de cette population neuronale peut être évitée par l'utilisation de différentes stratégies telle que des siARN ciblant ORF2, une surexpression de PIWIL1 (PIWI-like-1) ou par l'utilisation de NRTIs. Ainsi, dans ces modèles neurodégénératifs murins, il est montré que LINE-1 apparait et/ou contribue à l'établissement de la neurodégénérescence notamment via des dommages à l'ADN. L'impact des rétrotransposons sur l'intégrité du génome et la neurodégénérescence est largement évoqué dans notre revue publiée l'année dernière et présentée plus bas dans ce manuscrit (Peze-Heidsieck et al., 2021).

Des études pointent aussi du doigt l'impact que pourrait avoir les ETs pas seulement sur l'intégrité du génome, mais aussi sur les interactions protéiques. Ainsi il a été montré que

TDP-43 et Tau, deux protéines de liaisons à l'ARN que nous avons évoquées précédemment dans le contexte des MNs, pourraient jouer un rôle dans le contrôle ou la séquestration des ETs (W. Li et al., 2012; Ramirez et al., 2022; W. Sun et al., 2018; Tam et al., 2019). En effet la protéine Tau est impliquée dans le contrôle des ETs et sa forme pathogénique conduit à une dérégulation des ETs (J. L. Carey & Guo, 2022; Ramirez et al., 2022; W. Sun et al., 2018). La protéine TDP-43 quant à elle possède un domaine « prion like » qui a été montré comme nécessaire au contrôle de la rétrotransposition des LINE-1s dans des cellules embryonnaire murine (T. D. Li et al., 2022). La perte de TDP-43 au niveau nucléaire, un phénotype retrouvé dans les patient SLA, est associée à une décondensation de la chromatine au niveau des séquences LINE-1s (E. Y. Liu et al., 2019). De plus TDP-43 a la capacité de se lier à la protéine ORF1p (T. D. Li et al., 2022).

Cependant l'essentiel des approches visant à décrypter la dérégulation des LINE-1s, soit dans le contexte du vieillissement, soit dans les contextes des MNs, s'est principalement focalisé sur les transcrits ARN. Ainsi, les études visant à caractériser l'expression de la protéine ORF1p encodée par LINE-1 dans le cerveau dans ces deux contextes sont peu nombreuses.

II.B.3 Et ORF1p ?

On ne connaît que peu de chose sur l'expression d'ORF1p dans le cerveau. Par des analyses *in silico* de données de mass spectrométries issues de 29 différents tissus d'individus sains, ORF1p n'a pu être détecté formellement que dans 4 tissus (poumons, prostate, ovaire, placenta) le cerveau n'en faisant pas partie (McKerrow et al., 2023). Des travaux ont montré par immunohistochimie que ORF1p était présent dans plusieurs régions du cerveau de 3 individus sains de différents âges (Sur et al., 2017). Parmi ces échantillons *post-mortem* humains, ORF1p a été retrouvé dans le cortex frontal, l'hippocampe, le thalamus et le mésencéphale. Dans le contexte du vieillissement, ORF1p a été retrouvé augmenté dans les muscles squelettiques des rats âgés dans deux études différentes (Mumford et al., 2019; Osburn et al., 2022). Les travaux de Matthew Simon ont montré une augmentation de ORF1p lors du vieillissement, dans le foie par immunofluorescence, ainsi que dans les poumons et la peau par WB (Simon et al., 2019). L'expression de ORF1p a aussi été montrée dans les

progéniteurs neuronaux (Thomas et al., 2017), dans les neurones dopaminergiques du cerveau de souris (Blaudin de Thé et al., 2018; Ravel-Godreuil et al., 2021) ainsi que dans les neurones dopaminergiques humains différenciés *in vitro* (Znaidi et al., 2023). L'équipe a précédemment montré une augmentation de la protéine ORF1p dans ces neurones dopaminergiques de la substance noire des souris hétérozygotes En1 et des souris soumis à un stress oxydant par la 6-hydroxydopamine (Blaudin de Thé et al., 2018). Enfin, plus récemment, chez des souris âgées de 18 mois, il a été montré une augmentation d'ORF1p dans les neurones corticaux comparés aux souris âgées de 3 mois (Y. Zhang et al., 2022). Cette augmentation est aussi accompagnée d'une diminution de l'intensité de H3K9me3 par immunohistochimie dans les neurones excitateurs. ORF1p a aussi été détecté dans le système nerveux central des souris développant une encéphalomyélite auto-immune expérimentale, pathologie pouvant être associée à une forme de MN, la sclérose multiple (C. Zhang et al., 2023).

Ces recherches semblent donc aussi converger dans une possible implication d'ORF1p dans le vieillissement et les MNs. Comme nous l'avons vu précédemment, une multitude d'études sont peu à peu en train de lier les ETs, et plus particulièrement LINE-1, au processus de vieillissement et à l'établissement des maladies neurodégénératives. Cependant, seulement une portion de ces études vise à caractériser ORF1p dans ces phénomènes. L'étude d'ORF1p constitue aussi une alternative à l'étude des transcrits LINE-1s. ORF1p permet indirectement de refléter le niveau d'activité des LINE-1s intacts via l'utilisation d'anticorps, là où l'étude des transcrits peut s'avérer difficile à évaluer du fait de leur répétitivité. De plus, cette protéine est retrouvée exprimée à un niveau basal dans les neurones dopaminergiques de la souris (Blaudin de Thé et al., 2018) ce qui soulève des questions relatives à de possibles fonctions. En effet, hormis une affinité pour l'ARN associée à une activité chaperonne, ORF1p ne possède, à ce jour, aucune autre fonction connue. Ainsi beaucoup d'interrogations demeurent.

Au cours de la dernière décennie, le génome non-codant a été incorporé à l'étude des MNs. L'étude des transcrits LINE-1s apporte de nouvelles données intéressantes éclaircissant l'établissement et le fonctionnement de ces MNs. Cependant si une approche holistique est nécessaire pour décrypter la cause de ces maladies, il en convient alors d'étudier tous les

aspects du génome « non-codant ». Un de ces aspects réside donc dans l'étude de la protéine ORF1p encodé par LINE-1 et tenter de répondre aux multiples questions qui en découlent. ORF1p est-il exprimé dans tout le cerveau ? Y a-t-il des spécificités régionales ? Dans quel type cellulaire ORF1p est-il exprimé au sein de cet organe ? Dans un contexte de vieillissements du cerveau, y a-t-il une augmentation de la protéine ORF1p endogène ? Avec qui interagit ORF1p dans le cerveau ? Comment ORF1p pourrait-il participer au processus de vieillissement ou à l'établissement des maladies neurodégénératives ? Et enfin, ORF1p a-t-il un possible rôle physiologique ?

PUBLICATION

1 **Title:**

2

3 **Steady-state neuron-predominant LINE-1 encoded ORF1p protein and LINE-1 RNA**

4 **increase with aging in the mouse and human brain**

5

6

7 **Authors:**

8

9 Tom Bonnifet¹, Sandra Sinnassamy¹, Olivia Massiani Beaudoin¹, Philippe Mailly², Héloïse

10 Monnet², Damarys Loew³, Berang  re Lombard³, Rajiv Joshi^{1*} & Julia Fuchs^{1*}

11

12 **Affiliations:**

13 ¹ CIRB, Collège de France, PSL University, INSERM, CNRS, 75005, Paris, France.

14 ² Orion Imaging Facility, CIRB, Collège de France, PSL University, INSERM, CNRS, Labex

15 Memolife, 75005, Paris, France.

16 ³ Institut Curie, PSL University, Centre de Recherche, CurieCoreTech Spectrométrie de Masse

17 Protéomique, 26 rue d'Ulm, Paris 75248 Cedex 05, France

18

19 ***For correspondence:**

20 J.F. (Julia.fuchs@college-de-france.fr); R.L.J. (rajiv.joshi@college-de-france.fr)

21

22 **Key words:** Transposable elements, retrotransposons, LINE-1, ORF1p, aging, brain mapping,

23 mass spectrometry, ORF1p protein interactors, human post-mortem brain, dopaminergic

24 neurons, deep learning algorithm.

25

26 **Abstract**

27

28 Recent studies have established a reciprocal causal link between aging and the activation of
29 transposable elements, characterized in particular by a de-repression of LINE-1
30 retrotransposons. These LINE-1 elements represent 21% of the human genome, but only a
31 minority of these sequences retain the coding potential essential for their mobility. LINE-1
32 encoded proteins can induce cell toxicity implicated in aging and neurodegenerative diseases.
33 However, our knowledge of the expression and localization of LINE-1-encoded proteins in the
34 central nervous system is limited. Using a novel approach combining atlas-based brain mapping
35 with deep-learning algorithms on large-scale pyramidal images, we unveil a heterogeneous,
36 neuron-specific and widespread ORF1p expression throughout the murine brain at steady-state.
37 In aged mice, ORF1p expression increases significantly which is corroborated in human post-
38 mortem dopaminergic neurons by an increase in young LINE-1 elements including those with
39 open reading frames. Mass spectrometry analysis of endogenous mouse ORF1p revealed novel,
40 neuron-specific protein interactors. These findings contribute to a comprehensive description
41 of the dynamics of LINE-1 and ORF1p expression in the brain at steady-state and in aging and
42 provides insights on ORF1p protein interactions in the brain.

43

44

45

46

47

48

49

50

51 **Introduction**

52

53 Only about 2 % of the human genome are DNA sequences that will be translated into protein.
54 The remaining 98 % are comprised of introns, regulatory elements, non-coding RNA,
55 pseudogenes and repetitive elements including transposable elements. However, some
56 sequences in what is generally considered “non-coding genome” do in fact contain sequences
57 which encode proteins. This is true for specific lncRNAs which can encode peptides or
58 functional proteins ¹ but also for a few copies of two transposable element families, Long
59 INterspersed elements-1 (LINE-1) and Human Endogenous RetroViruses (HERV). Non-
60 functional copies of retrotransposons, to which LINE-1 and HERV belong, cover about 44% of
61 the human genome as remnants of an evolutionary ancient activity. Depending on the source,
62 about 100 ² to 146 ³ full-length LINE-1 elements with two open reading frames encoding ORF1
63 and ORF2 are present in the human reference genome (GRCh38 Genome Assembly) and
64 several incomplete HERV sequences encoding either or any combination of envelope (env),
65 gag, pro or pol ⁴ . The LINE-1 encoded protein ORF1p, an RNA binding protein with “cis”
66 preference ^{5,6}, and ORF2p, an endonuclease and reverse transcriptase ^{7,8} are required for the
67 mobility of LINE-1 elements. LINE-1 elements, as many other transposable elements including
68 HERVs, are repressed by multiple cellular pathways. Due to this, it was generally thought that
69 TEs are repressed in somatic cells with no expression at steady-state ⁹⁻¹¹. However, aging might
70 reduce the reliability of these repressive mechanisms ¹². It is now, 31 years after the initial
71 proposition of the “transposon theory of aging” by Driver and McKechnie ¹³, generally accepted
72 that TE activation can be both, a cause and a consequence of aging ^{14,15}. Sparse data has shown
73 that the LINE-1 encoded protein ORF1p is expressed at steady-state in the mouse ventral
74 midbrain ¹⁶ and in some regions of the human post-mortem brain ¹⁷ and recent data informed
75 about the presence of full-length transcripts in various tissues ¹⁸. Repression of LINE-1 might

76 thus be incomplete and if so, it remains unclear how cells then prevent cell toxicity associated
77 with LINE-1 encoded protein activity. Indeed, LINE-1 encoded proteins have been
78 demonstrated to induce genomic instability (ORF2p endonuclease-mediated ^{16,19-24};
79 inflammation (ORF2p reverse transcriptase-mediated ²⁵⁻²⁷ and/or nuclear envelope fragility
80 (ORF1p-mediated ²⁸) and that these cellular activities might be causally related to organismal
81 aging and/or human conditions like cancer , autoimmune and neurological diseases ²⁹. For
82 instance, LINE-1 activation can drive neurodegeneration of mouse dopaminergic neurons ¹⁶, of
83 drosophila neurons ^{30,31} and of Purkinje neurons ³² which can be at least partially rescued with
84 nucleoside analogue reverse transcriptase inhibitors (NRTIs) or other anti-LINE-1 strategies.
85 NRTIs are currently being tested in several clinical trials designed to target either the RT of
86 HERVs or the RT encoded by the LINE-1 ORF2 protein. It is not known today, however, to
87 which extent LINE-1 encoded proteins are expressed at steady-state throughout the mouse and
88 human brain, whether there is cell-type specificity and whether activation of LINE-1 encoded
89 proteins is associated with brain aging or human neurodegeneration. Here, using a deep-
90 learning assisted cellular detection methodology applied to pyramidal large-scale images of the
91 mouse brain mapped to the Allen mouse brain atlas combined with post-mortem human brain
92 imaging, co-IP mass spectrometry and transcriptomic analysis of LINE-1 expression, we
93 describe a brain-wide map of ORF1p expression and interacting proteins at steady-state and in
94 the context of aging. We find a heterogenous but widespread expression of ORF1p in the mouse
95 brain with predominant expression in neurons. In aged mice, neuronal ORF1p expression
96 increases brain-wide and in some brain regions to up to 27% . In dopaminergic human neurons,
97 young LINE-1 transcripts and specific full-length and coding LINE-1 copies are increased in
98 aged individuals. We further describe endogenous mouse ORF1p interacting proteins revealing
99 known interactors and unexpected interacting proteins belonging to GO categories related to
100 RNA metabolism, chromatin remodeling, cytoskeleton and the synapse.

101 **Results**

102

103 **Widespread and heterogenous expression of the LINE-1 encoded ORF1p protein in the**
104 **wildtype mouse brain**

105 To investigate the expression pattern and intensities of endogenous LINE-1 encoded ORF1p
106 protein throughout the entire mouse brain, we devised a deep-learning assisted cellular
107 detection methodology applied to pyramidal large-scale images using a comprehensive
108 workflow complemented by an approach based on confocal imaging as schematized in Figure
109 1A. Briefly, starting from sagittal slide scanner images of the mouse brain, we defined
110 anatomical brain regions by mapping the Allen Brain Atlas onto the slide scanner images using
111 Aligning Big Brains & Atlases (ABBA). We then employed a deep-learning detection method
112 to identify all cell nuclei (Hoechst) and categorize all detected cells into neuronal cells (NeuN+)
113 or non-neuronal cells (NeuN-) and ORF1p-expressing cells (ORF1p+) and cells that do not
114 express ORF1p (ORF1p-). This workflow allowed us then to characterize cell identity and
115 ORF1p intensity throughout the whole brain but also in specific anatomical regions. In parallel,
116 we completed the approach using confocal microscopy on selected anatomical regions allowing
117 for comparison with higher resolution. Importantly, ORF1p antibody specificity was validated
118 by blocking the ORF1p antibody with purified mouse ORF1p resulting in the complete absence
119 of immunofluorescence staining (SupplFigure1A) as well as by immunoprecipitation and mass
120 spectrometry (Fig 6). This specificity was also validated by using an in-house ORF1p¹⁶
121 colocalizing with the anti-ORF1p antibody used in this study (SupplFigure1B). Unexpectedly,
122 we found a generalized and widespread expression of ORF1p throughout the brain of wildtype
123 mice (Swiss OF1 mice, three months-old; Figure 1B). ORF1p is detectable in all regions and
124 subregions analyzed. The expression pattern (density and intensity) per region/subregions was
125 however heterogeneous. The ten regions shown in Figure 1B exemplify visible different

126 densities of ORF1p+ cells with varying levels of expression. Throughout the entire brain, we
127 found a relatively high density of ORF1p cells with a mean density of $\approx 305 \pm 18$ ORF1p +cells
128 per mm^2 (mean \pm SEM), representing up to 20% of all detected cells (Figure 1C). Among
129 ORF1p-positive cells within each analyzed mouse brain, ORF1p intensities between low and
130 high expressing cells were up to eight-fold different (Figure 1C). We then quantified nine
131 anatomical regions according to the Allen Brain Atlas on four brains of three-month old mice
132 (Fig1D) with our unbiased workflow (Fig1A) regarding cell density (Figure 1D), cell
133 proportions (Figure 1E) and fluorescent intensity (Figure 1F) of ORF1p+ cells. This approach
134 permitted the analysis of about 10 000 ORF1p+ cells per individual highlighting the power of
135 our large-scale analysis. Densities of ORF1p+ cells ranged from the lowest density in the
136 hindbrain with 154 ± 19 cells per mm^2 (mean \pm SEM) to the highest density of ORF1p+ cells in
137 the isocortex with 451 ± 44 cells per mm^2 (mean \pm SEM) and the thalamus with 446 ± 50 cells
138 per mm^2 (mean \pm SEM). This correlated with the percentage of ORF1p+ cells among all cells
139 identified per region (Figure 1E, $r^2=0.96$). The percentage of ORF1p+ cells per anatomical
140 region fluctuated between $10\% \pm 2.1$ (ventral striatum, mean \pm SEM) and $31\% \pm 1.6$ (thalamus,
141 mean \pm SEM). The dorsal striatum (“striatal dorsal” in the Allen Brain Atlas denomination)
142 exhibited the lowest ORF1p expression intensity (658 ± 3 mean \pm SEM) of all regions tested, the
143 hindbrain the highest mean intensity of ORF1p per cell (mean 1221 ± 8 (SEM)) as illustrated in
144 Figure 1B and quantified in Figure D and F). Interestingly, cell density did not correlate with
145 expression levels. Dorsal and ventral striatum for instance display similar ORF1p intensities
146 per cell but exhibit significant differences in ORF1p cell density and proportion. The “midbrain
147 motor” region as defined by the Allen Brain Atlas showed an intermediate cell density (mean
148 265 ± 16 (SEM)) and a rather high ORF1p expression intensity (mean 1006 ± 7.3 (SEM)).
149 Statistical analysis comparing mean density of ORF1p+cells per mm^2 or mean intensity per
150 ORF1p+ cells among regions confirmed the heterogeneity concerning ORF1p expression

151 throughout the mouse brain (Fig1D and 1F). Slide scanner and confocal images revealed an
152 exceptionally high ORF1p expression intensity in the ventral region of the midbrain which we
153 identified as the *Substantia nigra pars compacta (SNpc)*, an anatomical region containing
154 dopaminergic neurons which are vulnerable in Parkinson's disease. This region displayed an
155 important density of ORF1p+ cells and a comparatively high level of ORF1p expression as
156 illustrated by confocal imaging (Figure 1B, panel 8), but could not be quantified independently
157 with our brain-wide approach due to the geometrically-complex anatomy of this region and its
158 small size (subregion-level in the Allen Brain Atlas hierarchy). Another region which could not
159 be included in our brain-wide analysis is the cerebellum due to its extremely high density of
160 cell nuclei. However, slide scanner and confocal imaging (panel 10 in Figure 1B) revealed that
161 ORF1p is highly expressed in Purkinje cells, while not detectable in the molecular or granular
162 layers.

163 In order to confirm ORF1p expression by an independent method, we performed Western blot
164 analysis on six micro-dissected regions from the mouse brain (Swiss/OF1 mouse, three-month
165 old). As shown in SupplFig1C, ORF1p is expressed in all six regions with varying expression
166 levels confirming the overall presence of ORF1p throughout the brain. We then chose two
167 regions with significantly divergent ORF1p expression intensities as identified and quantified
168 on pyramidal large-scale images: the frontal cortex (low) and the ventral midbrain (intermediate
169 to high). We confirmed a significant higher expression of ORF1p in the ventral midbrain
170 compared to the frontal cortex using an approach based on the unbiased, automated
171 quantification of multiple z-stacks using a confocal microscope (Figure 1G) and by Western-
172 blotting on micro-dissected regions (Figure 1H and I). In concordance with the findings
173 stemming from the large-scale image quantification pipeline (Figure 1F), the ventral midbrain
174 showed \approx 2-times higher expression of ORF1p than the frontal cortex as quantified in Figure
175 1G (1.8-fold) and Figure I (2.3-fold) validating our cellular detection methodology for

176 pyramidal large-scale imaging and underscoring the heterogeneity of ORF1p expression levels
177 in the mouse brain. To investigate intra-individual expression patterns of ORF1p in the post-
178 mortem human brain, we analyzed three brain regions of a neurologically-healthy individual
179 (Figure 1J) by Western blotting. We detected two bands, the upper one corresponding to ORF1p
180 ($\approx 40\text{kD}$) and a lower band ($\approx 36\text{kD}$) of unknown nature. ORF1p was expressed at different
181 levels in the cingulate gyrus, the frontal cortex and the cerebellum underscoring a heterogenous
182 widespread expression of human ORF1p across the human brain. In summary, our findings
183 reveal the consistent presence of ORF1p expression throughout the mouse brain in all
184 anatomical regions analyzed with high regional variability in terms of density of ORF1p+ cells
185 per mm² per region and ORF1p+ intensity per cell per region. This indicates a consistent
186 presence of a LINE-1 encoded protein in brain cells and raises several questions concerning
187 cell-type identity of ORF1p expressing cells and potential functions or consequences of ORF1p
188 expression in the mouse and human brain.

189

190 **ORF1p is predominantly expressed in neurons**

191 Following up on our observation of wide-spread expression patterns of endogenous ORF1p
192 throughout the brain, we first addressed the question of the cellular identity of ORF1p+ cells.
193 To this end, we used the neuron-specific marker NeuN, which has been used for many decades
194 to identify post-mitotic neurons in the central nervous system³³ allowing us to determine the
195 proportion of neuronal (NeuN+) or non-neuronal cells (NeuN-) expressing ORF1p (ORF1p+)
196 or not (ORF1p-). Making use of our large-scale imaging approach (Figure 1A), we observe
197 drastic dissimilarities in detected cellular proportions between the white and the grey matter
198 throughout the entire brain. As expected, we observed only 1% of NeuN+ cells in the white
199 matter (corpus callosum; Figure 2A) validating both, the neuronal marker NeuN as such and
200 the ABBA superposition of the Allen Brain Atlas onto the sagittal brain slices. Interestingly,

201 among the non-neuronal cells predominating in this region, only 5.5 cells (mean value of 4
202 individuals) cells were detected as ORF1p positive indicating a near absence of ORF1p positive
203 cells in non-neuronal cells of the white matter. In the grey matter, our approach detected 30.5%
204 NeuN+ cells (dark red and yellow bars in Figure 2A) which, according to the literature, should
205 include all post-mitotic neurons with only minor exceptions ³³⁻³⁶ and corresponds to the
206 reported proportion of neurons present in the mouse brain ³⁷. The nine identified grey matter
207 regions in Figure 2A display the proportions of the different cell types per region. The
208 proportion of all cells in a given region which are positive for ORF1p (dark red bars) differs
209 between regions (lowest proportion: hindbrain: 7%; highest proportion dorsal striatum: 26.6%).
210 In the isocortex and the midbrain motor-related regions, the majority of neurons detected
211 express ORF1p (54% and 59% by large-scale analysis, Figure 2A; 68.8% and 68.7% by
212 confocal imaging (Figure 2B, quantified in C), respectively), while in the midbrain sensory
213 related regions the proportion dropped to 25% whereas it reached 82% in the thalamus (Suppl
214 Figure 2A). Altogether, nearly half of all NeuN+ cells throughout the mouse brain expressed
215 ORF1p (mean of all regions: 48.2%; Figure 2E). Regarding the cell identity of ORF1p+ cells
216 brain-wide (except the cerebellum), more than 70% were identified as neuronal by the large-
217 scale approach (Suppl Figure 2A). The regional analysis indicated that 73% (isocortex) and
218 64.4% (midbrain motor) of ORF1p+ cells were also NeuN+ (Suppl Figure 2A). This contrasted
219 with results obtained by the second approach using confocal imaging on multiple z-stacks
220 which indicated that 91.3% (frontal cortex) and 88.5% (ventral midbrain) of ORF1p cells were
221 neuronal (Figure 2D). This difference in numbers observed between our large-scale image cell
222 detection methodology and the confocal workflow are most probably due to technical
223 limitations inherent to our large-scale pipeline. Indeed, with the latter approach, region-
224 dependent differences in cell density and signal intensity levels might be the cause for an
225 underestimation of the proportion of ORF1p+ cells being neuronal due to difficulties in cell

226 detection by StarDist/Cellpose (high cell density) on a single focal plan, technical difficulties
227 which are widely reduced by the multiple z-stack based approach when using a confocal
228 microscope. Notably, we also observed a difference in the % of NeuN+ cells between these two
229 regions with significantly less NeuN+ cells in the ventral midbrain compared to the frontal
230 cortex (SupplFig2B). As we could not rule out that ORF1p might also be expressed in non-
231 neuronal cells, we turned to non-neuronal markers specific for different glial cell populations
232 using two different astrocytic markers (GFAP, Sox9), the astro- and oligodendrocytic marker
233 S100b and the microglial marker Iba1^{37,38} and performed co-stainings with ORF1p followed by
234 confocal imaging as illustrated in Figure 2G. We screened multiple images of frontal cortex,
235 ventral midbrain, hippocampus and striatum and did not find a single cell, which could
236 unambiguously be defined as non-neuronal, to express ORF1p. This indicated that ORF1p is
237 not or only very rarely expressed in non-neuronal cells. To assess whether predominant, if not
238 exclusive ORF1p expression in neurons is mouse brain specific or a pattern also applicable to
239 the human brain, we investigated the identity of ORF1p expressing cells in the cingulate gyrus
240 of a healthy human brain. Similar to what we found in the mouse brain, we observed sparse
241 NeuN expression in the white (Figure 2H, left) and extensive NeuN staining in the grey matter
242 corresponding to the cortical layers (right, separated by a dashed white line) with ORF1p+ cells
243 predominantly located in the grey matter. All cells stained by ORF1p were co-stained with
244 NeuN indicating that ORF1p was expressed in neuronal cells also in the human brain
245 (Figure2H, right). However, as in the mouse brain, not all neurons expressed ORF1p (Figure
246 2H, bottom right). Finally, to further confirm the absence of ORF1p expression in non-neuronal
247 cells and the presence of expression of ORF1p in neurons, we used fluorescence-activated cell
248 sorting (FACS) to isolate neurons (using a NeuN antibody) from non-neuronal cells (NeuN-)
249 followed by Western blotting with an antibody against ORF1p on both fractions (Figure 2I and
250 2J). We detected ORF1p exclusively in the neuronal fraction, again confirming our prior results

251 based on two different imaging approaches. In summary, ORF1p expression in the mouse brain
252 is widely restricted to neurons of which about 50% express ORF1p. This raises the question of
253 the function and consequences of ORF1p expression specifically in neurons but also on the
254 dynamic regulation of this expression upon exogenous (exposome) or endogenous (aging)
255 challenges.

256

257 **ORF1p expression is increased in the aged mouse brain**

258 ORF1p is expressed at steady-state throughout the brain, but whether there is a dynamic
259 regulation of this expression is not known. Aging has unequivocally been linked to LINE-1
260 regulation^{15,39} both as a trigger and as a consequence of LINE-1 activation but whether this is
261 true for the brain has not been thoroughly investigated. We therefore addressed the question
262 whether advanced age (16-month-old mice) was paralleled by a dynamic regulation of ORF1p
263 expression in the brain compared to young, three-month old mice. In the context of aging, we
264 globally observed a reduction in the proportion of ORF1p+/NeuN+ cells using the cell detection
265 workflow applied to large-scale images described in *Figure 1A*, phenomenon mainly driven by
266 the midbrain motor, the dorsal striatum, the pallidum and the thalamus regions (Figure 3A, dark
267 red bars, SupplTable1). The confocal approach applied to two regions, the frontal cortex and
268 the ventral midbrain (Figure 3B) confirmed a loss of ORF1p+/NeuN+ cells in the ventral
269 midbrain with no change in cell proportions in the frontal cortex in accordance with the large-
270 scale imaging approach (Figure 3A). The predominantly neuronal identity of ORF1p+ cells,
271 however, was unchanged (SupplFig3A) just as the proportion of neurons expressing ORF1p
272 (SupplFig3B). We observed a significant decrease of NeuN+ cells in the ventral midbrain
273 (Figure 3B, SupplFig3C). We next analyzed ORF1p expression levels in the context of brain
274 aging. Interestingly, the mean intensity of ORF1p expression increased significantly with age
275 throughout the brain (13% increase brain-wide; Figure 3C). Frequency distribution analysis

276 unveiled a general shift in ORF1p mean expression per cell in aged mice (Figure 3D).
277 Importantly, the Hoechst mean intensity within nuclei of ORF1p-positive cells, serving as an
278 internal control, showed no significant alteration (Figure 3E). Among nine analyzed regions,
279 five demonstrated a general increase in ORF1p mean intensity per cell during aging ($p \leq 0.05$),
280 a change independent from inter-individual variations in both young and aged mice (Figure 3F).
281 An increase of ORF1p expression was also observed in three others regions but albeit not
282 significant. The only exception was the isocortex which remained unchanged with aging. This
283 shift of ORF1p expression (fold change intensity) in the whole brain, reaching nearly a 30%
284 increase in some regions, is represented in Figure 1G. These results were confirmed by the
285 confocal imaging approach: ORF1p expression with aging in the frontal cortex remained
286 unchanged and the ventral midbrain region increased significantly as quantified in Figure 3H
287 and shown with a representative image in Figure 3I. Overall, these results highlight an age-
288 dependent increase in ORF1p expression in neurons throughout the brain with some regions
289 showing an increase of up to 30% in ORF1p intensities.

290

291 **Coding LINE-1 transcripts are increased in aged human dopaminergic neurons**

292 Following the observation of increased ORF1p expression in the aged mouse brain, among
293 which the ventral midbrain, and given the age-related susceptibility of dopaminergic neurons
294 in the *substantia nigra pars compacta* to degenerate in Parkinson's Disease, we turned to a
295 RNA-seq dataset of laser-captured micro-dissected post-mortem human dopaminergic neurons
296 of brain-healthy individuals⁴⁰, in order to interrogate full-length LINE-1 expression profiles as
297 a function of age. To avoid read-length bias to which TE analysis is particularly sensitive, we
298 analyzed only the data derived from 50bp paired-end reads of linearly amplified total RNA as
299 this dataset regrouped all age categories (n=41; with ages ranging from 38 to 97 (mean age:
300 79.88 (SD \pm 12.07); n=6 \leq 65y; n=35 $>$ 65y; mean PMI: 7.07 (SD \pm 7.84), mean RIN: 7.09

301 (± 0.94). As age-related dysregulation of TEs might not be linear, we considered individuals
302 with ages-at-death younger or equal to 65 years as “young” (n=6, 38-65 years, mean age 57.5
303 years (SD ± 9.9)) and individuals older than 65 years as “aged” (n=35, 65-97 years, mean age
304 83 years (SD ± 7.8). The expression of the dopaminergic markers tyrosine hydroxylase (TH) and
305 LMX1B were not different in both populations indicating no apparent change of dopaminergic
306 identity of analyzed melanin-positive dopaminergic neurons (Suppl Fig4A). Next, we
307 compared the expression of repeat elements at the class, family and name level based on the
308 repeat masker annotation implemented in the UCSC genome browser using a commonly used
309 mapping strategy for repeats ⁴¹. No overt dysregulation of repeat elements at either level of
310 repeat element hierarchy was observed (SupplFig4C, D, E, F), however there was a significant
311 increase in several younger LINE-1 elements (L1HS, L1PA2-17) at the “name” level (Figure
312 4A, B). This was not observed for HERVK-int, a human endogenous retrovirus family with
313 some copies having retained coding potential (Figure 4B) or other potentially active TEs like
314 HERVH-int, HERV-Fc1 or SVA-F with the exception of a trend for an increase in AluYa5
315 transcripts in the >65y group, a young Alu family mobilized by the LINE-1 retrotransposition
316 machinery (SupplFig4G). Interestingly, L1HS expression was highly correlated with L1PA2
317 expression and this correlation extended to almost all younger LINE-1 subfamilies weaning
318 down with evolutionary distance (Fig5A). This was not true for other active TEs as L1HS was
319 negatively correlated with HERVK-int expression (Fig5A). Several regulators of LINE-1
320 activity have been identified ^{16,42} and correlation of their expression with L1HS might allow to
321 infer their relevance of interaction (activation or repression) with L1HS in human dopaminergic
322 neurons. Besides the co-regulation of young LINE-1 elements (L1HS, L1PA2-11, Fig5A),
323 Spearman correlation analysis revealed three known repressors of LINE-1 activity; EN1
324 (Engrailed 1 ¹⁶, SupplFig5A) with important functions for dopaminergic neuron homeostasis
325 ⁴³, CBX5/HP1a, a heterochromatin binding protein binding to the histone mark H3K9me3,

326 thereby mediating epigenetic repression ⁴⁴ (SupplFig5B) and XRCC5 and 6, also known as
327 Ku86/Ku70, which are essential for DNA double-stranded break repair through the
328 nonhomologous end joining (NHEJ) pathway and limit LINE-1 full-length insertions ⁴⁵
329 (SupplFig5C). The transcripts of these genes showed a trend for decreased expression in the
330 elderly (SupplFig5D-G). Based on the increase of young LINE-1 families L1HS and L1PA2 in
331 aged human dopaminergic neurons and the finding that ORF1p was increased in the aged mouse
332 brain, we focused our attention on LINE-1 elements with coding potential for ORF1 and ORF2
333 according to the L1Basev2 annotation which are specific elements comprised in the L1HS and
334 L1PA2 annotation at the “name” level. Most of the 146 full-length and coding LINE-1 termed
335 UIDs (= Unique Identifier) in the L1Base are L1HS elements (76.03%), whereas the remaining
336 35 UIDs belong to the evolutionary older L1PA2 family (SupplFig6B). The L1Base annotation
337 is based on the human reference genome (GRCh38) and annotates 146 human full-length
338 (>6kB), intact LINE-1 elements (ORF1 and ORF2 intact) with a unique identifier from 1 to 146
339 ³. Attribution of sequencing reads to a specific, individual TE copy is problematic ⁴⁶ and several
340 approaches have been proposed to circumvent this problem including the mapping of unique
341 reads ⁴¹. While several tools using expectation maximization algorithms in assigning multi-
342 mapping reads have been developed and successfully tested in simulations ^{41,47}, we used a
343 different approach in mapping unique reads to the L1Base annotation of full-length LINE-1.
344 Specific “hot” LINE-1 loci in a given cellular context have been identified ², but usage of the
345 L1Base annotation enabled an unbiased approach albeit ignoring polymorphic LINE-1
346 sequences. Unique read mapping strategies for repeat elements, especially young LINE-1
347 elements, will unavoidably underestimate LINE-1 locus-specific expression levels ⁴¹, but will
348 be most accurate in assigning reads while allowing the comparison of two different conditions
349 analyzed in parallel. Assuming that expression of UIDs was correlated with mappability, we
350 plotted a mappability count of each UID (see methods) against its mean normalized read count

351 expression of the six individuals ≤ 65 y. Non-parametric Spearman correlation revealed no
352 correlation between UID mappability and expression (SupplFig6A) indicating no apparent
353 relationship between the two parameters. However, individual UID dependency of mappability
354 on expression cannot be excluded, especially for high expressing UIDs like UID-16 for example
355 (SupplFig6A and E). Expression of LINE-1 at the locus-level has been attributed to artefacts
356 not representing autonomous transcription including differential high intronic read counts ⁴⁸
357 pervasive transcription or reads attributable to passive co-transcription with genes when the
358 LINE-1 element is intronic ⁴⁹. To evaluate the latter, we determined the number of intronic
359 (46.58%) and intergenic UIDs (78/146; SupplFig6D) and identified the corresponding genes
360 for intronic UIDs (SupplFig6C). Of the 146 UIDs, 140 passed the threshold of >3 reads in at
361 least 6 individuals. Differential expression of UID between “young” and “aged” dopaminergic
362 neurons revealed several significantly deregulated full-length LINE-1 loci. However, while no
363 single locus stood out, paired analysis of the expression of all UIDs indicated a general increase
364 (Fig4D), especially of low expressed UIDs. The comparative analysis of the sum expression of
365 UIDs per individual comparing young (≤ 65 y) with elderly human dopaminergic neurons,
366 however, did not reach statistical significance (Fig4E). Several specific loci were dysregulated
367 in particular, for instance UID-68 (Fig4C), a L1HS element located on chromosome 7 (chr7:
368 141920659-141926712) in between two genes, CLEC5A (C-type lectin domain containing 5A)
369 and OR9A4 (olfactory receptor family 9 subfamily A member 4). To rule out any influence of
370 “hosting” gene transcription interference on measurable UID-68 expression differences (Fig4F,
371 left), we performed Spearman correlation which did not indicate any correlation between
372 CLEC5A or OR9A4 expression with UID-68 (Fig4F). Further, UID-68 had a high mappability
373 count of 16 (range of all UIDs: 1-30, mean 9.0 (SD ± 6.05), SupplFig6A) indicating that UID-
374 68 might be a candidate for an age-dependent gain of activity. L1HS UID-129, located on
375 chromosome 15 (chr15: 54926081-54932099) is intergenic, at ≈ 2 Mb distance upstream and \approx

376 200Mb downstream from the next genes. However, the mappability count of UID-129 was only
377 1, indicating possible mapping biases inherent to the unique read-based mapping strategy
378 employed (Figure 4G and SupplFig6A). Another UID increased in individuals >65y, the L1HS
379 UID-37 (chr10:98,782,942-98,788,971, minus strand), located in intron 3 of the HPSE2 gene
380 (mappability count of 13, minus strand), showed no correlation with its “hosting” gene
381 indicating potential autonomous transcription of this LINE-1 element and suggesting its
382 contribution to the increase of full-length LINE-1 transcripts (SupplFig7A). We also inspected
383 UID-127 (chr13:40,356,291-40,362,321, mappability count: 14), a L1PA2 element which
384 slightly decreased in elder individuals (Fig4C). We found a positive association with
385 LINC00598 (intron 6 of 6; $\leq 65y$: $r=0.2$, $p=0.71$; $>65y$: $r=0.37$, $p=0.03$), a non-coding RNA
386 which hosts UID-127 in its 6th intron, indicating transcriptional co-regulation potentially
387 indicative of non-autonomous transcription of UID-127 (SupplFig7B). The decrease in the
388 expression of UID-137 (Fig4C) was mostly driven by one young individual with high
389 expression (SupplFig7C) and thus not reflecting an overall decrease (SupplFig7C, $p=0.23$). In
390 conclusion, TE expression analysis of this human dataset covering an age-span of 59 years
391 indicates an increase in the expression of young LINE-1 elements including those which have
392 coding potential in elderly dopaminergic neurons. A slight net sum increase of UID
393 transcripts/cell might be sufficient for the production of “above steady-state” levels of ORF1p
394 and ORF2p. Other TEs with coding potential, namely members of the HERV family, were not
395 increased. Further, correlation analyses suggest that LINE-1 HS expression might possibly be
396 controlled by the homeoprotein Engrailed 1, a protein specifically expressed in dopaminergic
397 neurons in the ventral midbrain ⁴³, the heterochromatin binding protein HP1, two known
398 regulators of LINE-1, and the DNA repair proteins XRCC5 and 6.
399
400

401 **Endogenous ORF1p interactors in the mouse brain**

402 To go further in our understanding of steady-state neuronal ORF1p expression across the mouse
403 brain, we immunoprecipitated ORF1p and performed label-free and quantitative LC/MS-MS to
404 identify potential protein partners of ORF1p in the mouse brain. We successfully
405 immunoprecipitated endogenous ORF1p from whole brain lysates (Figure 6A) and identified a
406 total of 424 potential protein interactors associated with ORF1p in 5 independent experiments
407 (n=5 mice, TableS1). Using Gene Ontology (GO) analysis, we identified several interacting
408 proteins belonging to GO terms related to known functions of the ORF1p protein in RNA
409 binding, preferentially⁵⁰ but not exclusively *in cis*⁵¹, for instance RNA decapping and mRNA
410 catabolic process, or related to the known presence of ORF1p in ribonucleotide particles^{52,53}
411 (GO: cytoplasmic ribonucleotide granule) or the presence of ORF1p in p-bodies⁵¹ and as shown
412 in Figure 6B and listed in TableS2. Other GO terms that emerged, to our knowledge not
413 previously associated with ORF1p, were related to cGMP-mediated signaling (GO: cGMP-
414 mediated signaling and 3'-5' phosphodiesterase activity: i.e. PDE4A, PDE4B, PDE4DIP) and
415 the cytoskeleton (GO: microtubule depolymerization, cytoskeleton organization, microtubule
416 and tubulin binding, cytoskeletal motor activity and protein binding). cGMP signaling is
417 regulated by 3'-5' phosphodiesterases (PDEs) which degrade 3',5'-cyclic guanosine
418 monophosphate (cGMP) and 3',5'-cyclic adenosine monophosphate (cAMP), an activity
419 essential for cell physiology for the integration of extra- and intracellular signals including
420 neuronal excitability, synaptic transmission and neuroplasticity^{54,55}. Several ORF1p interacting
421 proteins were constituents of the mating-type switching/sucrose nonfermenting complex
422 (SWI/SNF complex), i.e. ARID1A, ARID1B, SMARCA2, SMARCB1, SMARCC2), an ATP-
423 dependent chromatin remodeler complex disrupting nucleosome/DNA contacts to facilitate
424 DNA/chromatin accessibility by shifting, removing or exchanging nucleosomes along DNA
425^{56,57}. Finally, we also observed proteins belonging to the GO term “neuronal cell body”,

426 corroborating with the neuron-specific presence of ORF1p in the brain. A comparative analysis
427 with previous mass spectrometry studies^{53,58-63} aimed at identifying ORF1p interacting proteins
428 unveiled significantly more common proteins than expected by chance (Overrepresentation
429 test; representation factor 2.6, $p < 5.4e-08$; Figure 6C), including LARP1, STAU2, ATXN2,
430 RALY, TARBP2 or DDX21 (for a full list see TableS3). The presence of a significant number
431 of overlapping ORF1p interactors in different non-neuronal human cells (HEK^{53,58,59}, HeLa⁶⁰,
432 human breast and ovarian tumors⁶³ and hESCs⁶¹) and mouse neurons (our study), suggest
433 conserved key interactors between both species and between cell types, with a subset of these
434 protein regulating RNA degradation and translation potentially relevant for the LINE-1
435 lifecycle itself. ORF1p interactors found in mouse spermatocytes⁶² were also present in our
436 analysis including CNOT10, CNOT11, PRKRA and FXR2 among others (TableS3). To unravel
437 the physical interactions between the identified interactors of endogenous ORF1p within the
438 mouse brain, we used the STRING database (Search Tool for Recurring Instances of
439 Neighboring Genes, <https://string-db.org/>). This analysis generated a network representation,
440 where physical interactions are represented by edges (Figure 6D). In analogue with the GO term
441 analysis, ORF1p displayed interactions with various clusters, including well-known RNA
442 decapping complexes directed against LINE-1 RNA, which also encompassed DCP2 and
443 DCP1A which had not previously been identified as interacting with ORF1p⁶⁴. Furthermore,
444 ORF1p exhibited interactions with the SWI/SNF complex (highlighted in red) as well as
445 subunits of the RNA polymerase II complex suggesting a direct or indirect association with
446 accessible chromatin, a hitherto unknown interaction of ORF1p with chromatin compartments
447 within the nucleus. Notably, a multitude of novel interactors belonged to the “neuronal cell
448 body” and “neuron projections” clusters, proposing potential neuron-specific partners of
449 ORF1p such as Grm2/5, Bai1, Epha4, Kcnn2, Grik2 and Dmd among others. A last cluster,
450 formed by Ncoa5 (Nuclear Receptor Coactivator 5), Nxf1 (Nuclear RNA Export Factor 1),

451 Ranbp2 and Nup133 (both nucleoporins), might imply a role for these interactions in L1-RNA
452 nuclear export and/or a mechanism for the LINE-1 RNP to gain access to the nucleus in post-
453 mitotic neurons, a process we described recently in human neurons ²⁸. Altogether, the
454 identification of known and novel interactors of ORF1p in the mouse brain suggests roles of
455 ORF1p in the LINE-1 life cycle (RNA binding and metabolism, RNP formation, nuclear access)
456 but also suggests potential novel physiological roles of ORF1p in the brain related to
457 cytoskeleton organization, cGMP signaling, neuron-specific functions (i.e. synaptic signaling,
458 TableS2) and chromatin organization and/or transcription regulation.

459

460

461 **Discussion**

462 While LINE-1 derepression in aging has been extensively explored in peripheral tissues and
463 various pathologies, including cancer, our understanding of LINE-1, particularly ORF1p
464 expression, in the central nervous system within this context remains limited ^{18,65,66}. Recent *in*
465 *silico* mass spectrometry analyses spanning 29 different tissues hinted at the presence of ORF1p
466 in the brain, albeit at levels seemingly below detection thresholds ¹⁸. In contrast, cutting-edge
467 RNA-seq analysis rank the brain at the forefront regarding coding LINE-1 expression amongst
468 all analyzed organs ⁶⁷. Only a few studies explored ORF1p encoded LINE-1 protein expression
469 in the brain, most focusing on a specific region (in mice ^{16,32} in rats ⁶⁸ and in human post-mortem
470 brain ¹⁷), but it remained unclear if ORF1p is expressed throughout the entire brain, exhibits
471 cell-type specificity, and most intriguingly, if its expression is influenced by the aging process.
472 Here, we demonstrate that ORF1p is expressed throughout the entire mouse brain and in at least
473 three regions of the human post-mortem brain at steady-state. Leveraging a comprehensive
474 workflow that incorporates brain atlas registration and machine learning algorithms, we
475 quantified ORF1p intensity in tens of thousands of ORF1p-positive cells, enabling a profound

476 analysis of their proportions, cell identities, densities and ORF1p expression levels across the
477 entire brain. Surprisingly, more than one-fifth of detected cells expressed ORF1p. Strikingly,
478 regional variations in ORF1p expression levels were observed, with each region exhibiting
479 distinct proportions, cell density, and signal intensity of ORF1p-positive cells. In a non-
480 neurologically diseased human brain, ORF1p is expressed in all three regions examined, that is
481 the cingulate gyrus, the frontal cortex and the cerebellum. This is in accordance to an earlier
482 study using histological stainings, which found ORF1p expression in the human frontal cortex,
483 the hippocampus, in basal ganglia, thalamus, midbrain and spinal cord ¹⁷. This suggests,
484 similarly to the mouse brain, a pervasive and generalized expression across the human brain.
485 On the transcriptomic level using long-read sequencing of GTEx tissues, brain and liver were
486 highlighted as the organs displaying the highest expression of putatively active, full-length
487 LINE-1 elements ⁶⁷. However, when the authors looked at sub-regions, they found transcript
488 expression in cerebellar hemispheres and the putamen, but not in the caudate and the anterior
489 cingulate gyrus and frontal cortex ⁶⁷. This is in contrast to our data and the data from Sur et al,
490 where ORF1p was found to be expressed in the latter two regions using two different
491 antibodies. We used the anti-human L1Orf1p antibody clone 4H1, a well characterized antibody
492 ^{66,69}. While the sample size of human post-mortem stainings certainly needs to be increased in
493 order to draw quantitative conclusions, the presence of the protein in two independent studies
494 does point to a steady-state expression of ORF1p in the human brain.

495 In the mouse brain, we find ORF1p to be expressed predominantly if not exclusively in neurons
496 using immunofluorescence and fluorescence-activated cell sorting (FACS). This result is
497 consistent with previous studies, such as the identification of ORF1p in excitatory neurons
498 within the mouse frontal cortex ⁷⁰, its presence in neurons in the ventral midbrain ¹⁶ and the
499 recognition of morphological similarities between stained neurons and ORF1p-positive cells in
500 a post-mortem hippocampus sample of a healthy individual ¹⁷. We also detected ORF1p in

501 Purkinje cells, both in the mouse (Fig1B, panel 10) and in human cerebellum (data not shown).
502 Neuronal specificity or preference of LINE-1 expression was also shown on the transcriptomic
503 level in a recent study investigating L1 expression in the mouse hippocampus, where neuronal
504 L1 expression exceeded that of astrocytes and microglia by approximately twofold¹⁸ and
505 single-nuclei RNA-seq data from the mouse hippocampus and frontal cortex which confirmed
506 globally that repetitive elements including LINE-1 are more active in neurons than in glial cells
507⁷⁰. While ORF1p expression is suggested to be expressed in microglia under experimental
508 autoimmune encephalomyelitis conditions in the spinal cord⁷¹, no evidence of such expression
509 was observed in non-neuronal cells under non-pathological condition. On average, throughout
510 the mouse brain, the majority of neurons were positive for ORF1p and in some regions (i.e. the
511 thalamus) around 80% of neurons expressed ORF1p. Comparing the results of both imaging
512 approaches, the percentages of neurons expressing ORF1p in the ventral midbrain and frontal
513 cortex were roughly similar (around 70% of neurons expressed ORF1p as quantified by
514 confocal imaging and about 60% of neurons were identified as ORF1p+ using the slide scanner
515 approach). It is possible that these percentages are underestimated due to technical issues
516 inherent to the machine-learning based algorithm for cell detection as our observations often
517 indicated a positive signal in neurons which were classified as negative due to a particular shape
518 or our stringent intensity threshold. A question which arises based on these findings is whether
519 specific features distinguish ORF1p+ and ORF1p- neurons. While we cannot conclude on this
520 question, our results permit to exclude certain possibilities. There is no specific and clustered
521 ORF1p expression in anatomically defined brain nuclei which are known to share a specific
522 neurotransmitter (i.e. dopaminergic neurons in the substantia nigra) which suggests that ORF1p
523 expression does not seem to be strictly neuronal subtype-dependent. However, there is some
524 degree of cell-type specificity as mouse dopaminergic neurons in the *substantia nigra pars*
525 *compacta* express higher levels of ORF1p compared to surrounding, non-dopaminergic neurons

526 ¹⁶ (Fig1B, panel 8). Further, we observe ORF1p staining in Purkinje cells but not in the
527 surrounding granular and molecular layer neurons of the cerebellum. Purkinje cells are
528 inhibitory neurons just as some neurons in the granular layer (i.e. golgi and unipolar brush cells)
529 which are ORF1p-negative, so the decisive feature does not appear to be the excitatory or
530 inhibitory nature of a neuron neither. Another possibility is a cell-type specific chromatin
531 organization permissive for the expression of LINE-1 and future single-cell studies in the mouse
532 and human brain might reveal those differences.

533

534

535 Because transposable elements are known to become active in somatic tissues during aging
536 ^{14,15,26,72,73}, we aimed to investigate whether there was a corresponding increase at the protein
537 level. In aged mice, ORF1p expression significantly increased throughout the mouse brain
538 consistent with a previously documented increase in ORF1p outside the central nervous system
539 in aged rats ^{68,74} and aged mice ⁷². By quantifying the mean intensity of ORF1p in over 70 000
540 cells identified as ORF1p-positive, we were able to characterize the extent of this increase in
541 each anatomical sub-region. Remarkably, apart from the isocortex which did not show any
542 change, ORF1p expression increased in all other brain regions by 7% to 27%, indicating a
543 generalized increase of ORF1p expression in neurons throughout the brain (13%). We did not
544 detect any change in cell identity of ORF1p expressing cells, that is, ORF1p expression
545 remained predominantly if not exclusively neuronal. Intriguingly, we observed a loss of NeuN+
546 cells, particularly those expressing ORF1p throughout the brain which was more pronounced
547 in specific regions (ventral midbrain) than in others (isocortex). The loss of NeuN+ cells could
548 either be due to a loss of neuronal identity (= loss of NeuN expression), as described recently
549 in the context of neuronal aging ⁷⁵ and in the context of Alzheimer's Disease and related
550 tauopathies ⁷⁶, to a neurodegenerative process *per se* or to gliosis related to the aging process ⁷⁷

551 (as we observe a slight increase of ORF1p-/NeuN- cells per mm²).
552 Interestingly, a region with a strong increase in ORF1p expression with aging (ventral midbrain)
553 also had a significant loss of NeuN⁺ cells while a region with no change in ORF1p expression
554 with aging (isocortex, frontal cortex) did not lose NeuN⁺ cells. However, further investigations
555 are necessary to validate a correlation and to investigate an underlying mechanism. An increase
556 of ORF1p might have several direct or indirect consequences on a cell or here, on a neuron. As
557 ORF1p is translated from a polycistronic LINE-1 RNA together with ORF2p, albeit in much
558 higher amounts (the estimated ratio ORF1p to ORF2p is 240:1)⁷⁸, it can be expected that a
559 LINE-1 ribonucleotide particles are formed and ORF2-dependent cell toxicity in form of
560 genomic instability^{16,19} and single-stranded cytoplasmic DNA triggered inflammation^{25,26,72}
561 might result. This has been shown in mouse dopaminergic neurons where oxidative stress
562 induced LINE-1 causally contributed to neurodegeneration¹⁶. Neurodegeneration was partially
563 prevented by anti-LINE-1 strategies among which nucleoside reverse transcriptase inhibitors¹⁶
564 and similar LINE-1 protein-dependent neuronal toxicity has been shown in drosophila^{30,31} and
565 mouse cerebellum³². Recently, ORF1p has been evoked as a destabilizer of the nuclear
566 envelope with negative consequences on nucleocytoplasmic transport and chromatin
567 organization, independently on the known endonuclease or reverse transcriptase-dependent
568 toxic properties of ORF2p²⁸.

569

570 In order to test whether an increase in LINE-1 is a feature of human brain aging, we turned to
571 a unique RNA-seq dataset of human laser-captured dopaminergic neurons of 41 individuals
572 ranging from 38 to 99 years⁴⁰. In accordance with our focus on LINE-1 sequences which are
573 full-length and coding, we developed a rationale to interrogate LINE-1 families with
574 representatives that are coding (L1HS, L1PA2, multimappers; RepeatMasker) and to
575 specifically investigate full-length LINE-1 elements that have intact open reading frames for

576 ORF1p and ORF2p (unique reads; L1Basev2³). Indeed, we find an increase in L1HS and
577 L1PA2 elements in individuals ≥ 65 y as well as an increase in specific full-length LINE-1
578 elements but only a trend for increase of all full-length LINE-1 in sum in the elderly. This
579 analysis has technical limitations inherent to transcriptomic analysis of repeat elements
580 especially as it is based on short-read sequences. Nevertheless, we tried to rule out several biases
581 by demonstrating that mappability did not correlate with expression and that the expression of
582 intronic full-length LINE-1 elements is not correlated with the expression of their “hosting”
583 gene. Interestingly, dysregulated full-length LINE-1 elements in aged dopaminergic neurons
584 did not correspond to those identified in bladder cancer⁷⁹ indicating the intricate nature of this
585 expression across tissues and pathological conditions.

586 Overall, a slight net sum increase of UID transcripts/cell might be sufficient for the production
587 of “above steady-state” levels ORF1p and ORF2p. Further, a dissociation of LINE-1 transcript
588 and protein levels in aging has been observed recently in excitatory neurons of the mouse
589 cortex. In the absence of transcriptional changes of LINE-1, protein levels of ORF1p were
590 increased⁷⁰.

591 We can only speculate about the reason for an increase in ORF1p in the aged brain. A recent
592 single-cell epigenome analysis of the mouse brain suggested a specific decay of
593 heterochromatin in excitatory neurons of the mouse brain with age which was paralleled by an
594 increase in ORF1p, albeit equally in excitatory and inhibitory neurons, again not indicating any
595 dependency of ORF1p regulation on the excitatory or inhibitory nature of neurons⁷⁰. Chromatin
596 and particularly heterochromatin disorganization are a primary hallmark of aging⁷³ but other
597 repressive cellular pathways which control the LINE-1 life cycle might also fail with aging¹².

598 Another possibility is a loss of accessibility of repressive factors to the LINE-1 promoter or an
599 age-dependent decrease in their expression. Matrix correlation analysis of several known LINE-
600 1 regulators, both positive and negative, revealed possible regulators of young LINE-1

601 sequences in human dopaminergic neurons. Despite known and most probable cell-type
602 unspecific repressive factors like the heterochromatin binding protein CBX5/HP1⁴⁴ or the DNA
603 repair proteins XRCC5 and XRCC6⁴², we identified the homeoprotein Engrailed as negatively
604 correlated with young LINE-1 elements including L1HS and L1PA2. Engrailed is an essential
605 protein for mouse dopaminergic neuronal survival⁴³ and binds, in its properties as a
606 transcription factor, to the promoter of LINE-1¹⁶. As Engrailed is specifically expressed in
607 dopaminergic neurons in the ventral midbrain, our findings suggests that Engrailed controls
608 LINE-1 expression in human dopaminergic neurons as well and serves as an example for a
609 neuronal sub-type specific regulation of LINE-1.

610 The heterogenous, brain-wide presence of ORF1p expression at steady-state is intriguing. In
611 cancer cell lines or mouse spermatocytes, ORF1p interacts with several “host” proteins, some
612 if not most of which are related to the LINE-1 life cycle. However, a profile of endogenous
613 ORF1p interactors in the mouse brain might inform on possible other and organ-type specific
614 functions besides its binding to the LINE-1 RNA in “cis”⁶². Among the total 424 potential
615 interactors of endogenous ORF1p in the mouse brain, 38 partners had been previously identified
616 by mass spectrometry in human cancers, cancerous cell lines and mouse spermatocytes^{53,58–63}
617 (TableS2). Further, GO term analysis contained expected categories like “P-body”, mRNA
618 metabolism related categories and “ribonucleoprotein granule”. We also identified NXF1 as a
619 protein partner of ORF1p, a protein found to interact with LINE-1 RNA related to its nuclear
620 export⁸⁰. This suggests the conservation of key interactors probably essential for completing
621 or repressing the LINE-1 life cycle in both species, despite the divergence of mouse and human
622 ORF1p protein sequences⁸¹. Along these lines, several ORF1p protein partners we identified
623 might complete the list of post-transcriptional regulators implicated in LINE-1 silencing.
624 Recent work conducted on human cancerous cell lines has demonstrated that MOV10
625 orchestrates the recruitment of DCP2 for LINE-1 RNA decapping⁶⁴. In our analysis, we

626 identified DCP2 along with DCP1A, known to enhance the decapping activity of DCP2⁸², and
627 DCP1b, a pivotal component of the mRNA decapping complex⁸³. Intriguingly, MOV10 was
628 not detected in our mass spectrometry analysis, despite its established role in recruiting DCP2
629 and forming a complex with L1-RNP to mediate LINE-1 RNA decapping, as reported by Liu
630 et al. However, we found two enhancers of mRNA decapping, EDC3 and EDC4, both core
631 components of P-bodies, a membrane-less organelle known to contain L1-RNP⁵¹. Multiple
632 ubiquitin-ligase proteins were found although not appearing as a significantly enriched GO
633 term. These results complete the picture of the post-transcriptional and translational control of
634 ORF1p and suggest that these mechanisms, despite a steady-state expression, are operational in
635 neurons.

636 However, several neuron-specific interactors were identified belonging to GO term categories
637 “neuron projection” (75 proteins) and “neuronal cell body” (5 proteins), again pointing to the
638 neuron-predominant expression of ORF1p in the mouse brain. Other interesting aspects were
639 raised from this analysis. Among significantly enriched GO terms, several were related to the
640 cytoskeleton, the functional consequences of which need to be determined in future studies.
641 Our screen also identified PDE10A as an interactor of ORF1p in the mouse brain, a PDE almost
642 exclusively expressed in medium spiny neurons of the striatum and a target for treatment of
643 neurological diseases related to basal ganglia function like Huntington’s Disease, schizophrenia
644 and Tourette syndrome⁸⁴. Interestingly, PDE10A inhibition is related to beta-catenin signaling,
645 another GO term which emerged from our screen⁸⁵. Finally, we found components of RNA
646 polymerase II and the SWI/SNF complex as partners of ORF1p. Besides suggesting that ORF1p
647 has access to the nucleus in mouse brain neurons as described for other cells^{86,87} and recently
648 in human dopaminergic neurons *in vitro*²⁸, this also indicates that ORF1p might have access to
649 chromatin. These findings give rise to intriguing questions concerning the potential function of
650 ORF1p as ORF1p is widely distributed throughout the brain under normal physiological

651 conditions and interacts with a variety of proteins which might not directly relate to the LINE-
652 1 life cycle. Moreover, ORF1p exhibits a prominent neuronal presence, with some neurons
653 expressing up to eight times more ORF1p than others and neurons that do not express ORF1p
654 at all. Future loss-of-function studies should help to shed light on the necessity of ORF1p for
655 neuronal functions if they exist. Our data spurs the idea of a possible “physiological” function
656 of ORF1p as an integrative protein with expected function in neuronal homeostasis and a loss of
657 restriction in the aged brain limiting LINE-1 expression to steady-state levels.

658

659 **Materials & Methods**

660 **Animals**

661 Swiss OF1 wild-type mice (Janvier) were housed on a 12h light/dark cycle with free access to
662 water and food. Mice were sacrificed at 3-month or 16-month. Animal experiments were
663 performed according to the EU directive 2010/63/EU.

664

665 **Mouse tissue dissection and protein extraction**

666 Tissues were extracted from 3-month-old and 16-month-old Swiss/OF1 mice. Briefly, the two
667 hemispheres were separated in ice cold PBS *-/-*. For each mouse, one hemisphere was rinsed
668 and fixed in 4% PFA for 1h followed by 24h of incubation in 30% sucrose and then washed for
669 10 min with PBS 1X 3 times. Hemispheres were kept at -20°C until being sliced on a freezing
670 microtome (Eprelia, HM 450) with a 20µm thickness. The other hemisphere was dissected in
671 ice cold PBS *-/-* 1X and 6 brain regions were rinsed, cut in small pieces and dissociated
672 separately using a large (21G) to small gauge (27G) needle in RIPA lysis buffer for 5 min.
673 Lysates were kept on ice for 25 min, were sonicated for 15 min and supernatants were collected
674 after a 30 min centrifugation at 4°C at 14 000 rpm. Proteins were quantified and Laemmli buffer
675 was added before boiling for 10min at 95°C to be used for Western Blot.

676

677 **Human Samples:**

678 Cerebellum, frontal cortex and cingulate gyrus human samples were provided by Neuro-CEB
679 biobank from a 78-year-old healthy male individual and conserved at -80°C.

680

681 **Human Samples pulverization and protein extraction**

682 We used the dry pulverizer Cryoprep (Covaris) for pulverization of tissue blocs. Each sample
683 was disposed in a liquid-nitrogen precooled Tissue-tube bag and dry cryo-pulverized with one
684 impact at the maximum level. The pulverized brain sample was then weighed and resuspended
685 in lysis buffer (mg/v) (0.32M sucrose, 5mM CaCl₂, 3mM Mg(CH₃COOH)₂, 0.1mM EDTA,
686 10mM Tris-HCL pH8, 1mM DTT, 0.1% TritonX-100 and Protease Inhibitors), kept on ice for
687 30 min with gentle up-and-down pipetting until homogenization. We added 2X RIPA buffer
688 (v/v) to totals fractions for 30 min on ice. We then sonicated samples 2 times for 15 min.
689 Atlasupernatants were collected after a 30 min centrifugation at 14 000 rpm at 4°C, proteins
690 were quantified and Laemmli buffer was added to be used for Western Blot. All samples were
691 boiled 10 min at 95°C to be used for Western Blot.

692

693 **Western-Blot:**

694 We used 1.5mm NuPAGE 4-12% Bis-Tris-Gel (Invitrogen™). Proteins samples were loaded
695 and gel migration was performed with NuPAGE™ MES SDS Running Buffer (Invitrogen™)
696 for 45 minutes at 200mV. Gels were transferred onto a methanol activated PVDF membrane
697 (Immobilon) in a buffer containing: Tris 25 mM, pH=8,3 and Glycine 192 mM, during 1h30 at
698 400 mA. Membranes were blocked 30 min with 5% milk in TBST (0,2% Tween 20, 150 mM
699 NaCl, 10 mM Tris pH:8). Primary antibodies were diluted in 5% milk in TBST, and membranes
700 were incubated o/n at 4 C°. After 3 x 10 min washing in TBST, membranes were incubated for

701 1h30 with the respective secondary antibodies diluted at a concentration of 1/2000 in 5% milk
702 TBST. Membranes were washed 3 x 10 min in TBST and were revealed by the LAS-4000
703 Fujifilm system using Clarity Western ECL Substrate (Bio Rad) or Maxi Clarity Western ECL
704 Substrate (Bio Rad).

705

706 **Immunostaining:**

707 Sagittal mouse brains slices were fixed for 10min in PFA 4% and rinsed 3 times for 10min in
708 PBS -/-. Slices were then incubated 20 min in glycine 100mM, washed 3 times for 5min in PBS
709 and immersed in 10mM citrate pH 6 at 62°C during 45min for antigen retrieval. Slices were
710 then immersed 3 times in PBS with Triton X-100 0.2% and incubated in blocking buffer for 1,5
711 h (PBS with Triton X-100 0.2% and FBS (10%) previously inactivated 20min at 56°C (Gibeco,
712 16141061). Primary antibodies (ORF1p antibody: abcam ab216324; NeuN antibody: GeneTex
713 GTX00837) were diluted (1/200 and 1/500 respectively) in blocking buffer and incubated with
714 slices overnight at 4°C and then washed 3 times for 10 min with PBS. For validation, in-house
715 ORF1p antibody was used (09)(Guinea-Pig, 1/200). Suitable secondary antibodies and Hoechst
716 (Invitrogen, 15586276) were incubated for 1,5h at 1/2000 in PBS with inactivated FBS (10%)
717 and washed 3 times 10 min in PBS. To quench tissue autofluorescence, especially lipofuscin,
718 TrueBlack Plus (Biotium) in PBS was used during 10min. Slices were rinsed 3 times in PBS
719 and mounted with Fluoromount (Invitrogen™). For human cingulate gyrus stainings, the same
720 protocol was performed, with the difference that a human ORF1p antibody (Abcam 245249)
721 was used. Mouse and human brain slices were imaged by the Axioscan 7 Digital Slide Scanner
722 (Zeiss) or a Spinning Disk W1 (Yogogawa).

723

724

725

726

727 **Blocked peptide**

728 The ORF1p antibody (abcam ab216324) was incubated 2h on a turning wheel with excess
729 (4:1) of mouse ORF1p recombinant protein as in ¹⁶ before the blocked antibody was used in
730 the above-described immunofluorescence protocol.

731

732 **Quantification of confocal acquisitions**

733 Analysis was performed with a custom-written plugin ⁸⁸ developed for the Fiji software ⁸⁹, using
734 Bio-Formats ⁹⁰ and 3D Image Suite ⁹¹ libraries. Nuclei were detected using Hoechst channel
735 with the 2D-stitched version of Cellpose ⁹² (model = 'cyto', diameter = 30, flow threshold =
736 0.4, cell probability threshold = 0.0, stitching threshold = 0.75). Z-stack images were rescaled
737 to obtain 3D nuclei that are filtered by volume to avoid false positive detections. NeuN and
738 ORF1p-positive cells were detected in their respective channel in the same manner as nuclei,
739 but with different Cellpose settings (model = 'cyto2', diameter = 40, flow threshold = 0.4, cell
740 probability threshold = 0.0, stitching threshold = 0.75). Then, each cell was associated with a
741 nucleus having at least half of its volume in contact with it. Cells without any associated nucleus
742 were filtered out. Each nucleus was thus labeled according to NeuN and/or ORF1p positivity.

743

744 **ABBA Registration and Qupath analysis**

745 We registered each sagittal brain section with the Allen Mouse Brain Atlas (CCFv3 ⁹³), using
746 the Aligning Big Brains & Atlases plugin ⁹⁴ in Fiji. Registration brain regions and subregions
747 were imported into QuPath software ⁹⁵ for downstream processing.

748 In each brain subregion, cell analysis was done with custom Groovy scripts ⁸⁸ developed for
749 QuPath. In brief, Hoechst nuclei were detected with StarDist 2D [10], applying the DSB 2018
750 pretrained model with the following parameters: percentile normalization = [1 - 99], probability

751 threshold = 0.75, overlap threshold = 0.25. Cells in NeuN and ORF1p channels were detected
752 with Cellpose 2D (percentile normalization = [1 - 99], model = 'cyto2', diameter = 30, flow
753 threshold = 0.4, cell probability threshold = 0.0). Nuclei and cells were then filtered by area and
754 intensity mean in their respective channel, once again to avoid false positive detections.
755 Minimum intensity threshold was based on the channel background noise. This noise was
756 estimated for each subregion as the mean intensity of pixels not belonging to any nucleus or
757 cell detected in the corresponding channel. Finally, each cell was associated with a nucleus
758 having its centroid located inside the cell mask. Cells without any associated nucleus were
759 filtered out. Each cell containing a nucleus was thus identified as NeuN-positive or negative
760 and ORF1p-positive or negative. Intensity means values were normalized by subtracting the
761 background noise computed in the corresponding channel and subregion. As a last step,
762 subregional results were merged into regional ones and data were analyzed using the Pandas
763 Python library ⁹⁶.

764

765 **FACS**

766 Mouse brains were dissociated with Adult Brain Dissociation kit (Miltenyi Biotec, 130-107-
767 677) and incubated with the coupled antibody NeuN Alexa 647 (Abcam, ab190565) or the
768 control isotype IgG Alexa 647 (Abcam, ab199093). Stained cells were filtered a last time with
769 a 40 μ m filter before FACS sorting (FACS ARIA II). Neuronal and non-neuronal cells were
770 collected in RIPA for protein extraction in an appropriate volume in order to achieve equal
771 cell concentrations (10 000 cells/ μ l).

772

773 **RNA-seq analysis**

774 The RNA-seq dataset from Dong et al ⁴⁰ was downloaded from dbGAP (phs001556.v1.p1) and
775 contains unstranded paired-end 50bp and 75bp reads from pooled laser-capture micro-dissected

776 dopaminergic neurons from human post-mortem brain (107 samples) from 93 individuals w/o
777 brain disease. RNA-seq had been done on total and linearly amplified RNA. We focused our
778 analysis on data obtained with 50bp reads, in order to avoid mappability bias, while still
779 regrouping all age categories (n=41; with ages ranging from 38 to 97 (mean age: 79.88 (SD
780 ± 12.07); n=6 ≤ 65 y; n=35 > 65 y; mean PMI: 7.07 (SD ± 7.84), mean RIN: 7.09 (± 0.94)). Read
781 alignment, quality control and mapping were done by Nicolas Servant (Bioinformatics
782 platform, Curie Institute, Paris, France). Sequencing reads were aligned on the r print(org)
783 reference genome (r print(build)) using the STAR mapper (v2.7.0a) ³ and two different sets of
784 parameters. Genome-wide individual repeat quantification was performed using uniquely
785 mapped reads and the following STAR parameters: --outFilterMultimapNmax 1 --
786 alignEndsType EndToEnd --outFilterMismatchNmax 999 --outFilterMismatchNoverLmax
787 0.06. Repeats class, family and name quantification was performed using a random mapping
788 procedure and the following parameters : --outFilterMultimapNmax 5000 --outSAMmultNmax
789 1 --alignEndsType EndToEnd --outFilterMismatchNmax 999 --outFilterMismatchNoverLmax
790 0.06 --outSAMprimaryFlag OneBestScore --outMultimapperOrder Random.
791 Repeats annotations were downloaded from the UCSC Table Browser (repeatMasker database:
792 <https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgTables>) and coordinates of LINE-1 full length and coding
793 elements were downloaded from the L1base database ² (<http://l1base.charite.de/l1base.php>; ³)
794 selecting LINE-1 full length elements containing two predicted complete open reading frames
795 for ORF1 and ORF2 (UID= Unique Identifier) from the LINE-1 database
796 (<http://l1base.charite.de/l1base.php>) and corrected genomic intervals with the repeat masker
797 annotation of the corresponding genomic locus. Repeat quantification from the aligned data
798 was done using a gtf file (r print(gencode)) composed of all genes and all individual repeat
799 elements. This strategy was used to avoid overestimation of repeat elements due to overlaps
800 with expressed genes. For individual repeat quantification of the full length L1 elements

801 (L1base), we therefore used a gtf of all genes and all L1base entries, and ran the FeatureCounts
802 tool ⁹⁷ with the following parameters: -g gene_id -s 0 -p. In the context of the family-based
803 analysis, we used a gtf with all genes and all annotated repeats elements and ran FeatureCounts
804 with -g gene_family -s 0 -p -M. Before DeSeq2 analysis, we remove all genes and repeat
805 elements with less than 10 reads in a minimum of n individuals, n being the number of
806 individuals in the condition containing the fewest individuals (“young” condition: n=6, 38-65y,
807 mean 57.5 years). We use the same conditions with genes and UIDs with less than 3 reads in a
808 minimum of n individuals. Finally, we calculated the scaling factors using DeSeq2 on all genes
809 + all repeat elements or all gene + UID according to the quantification method and then applied
810 these scaling factors to the corresponding counts tables.

811 In order to test for the mappability of each UID (= full-length and coding LINE-1), we extracted
812 the bed track « main on human:umap50 (genome hg38) from the UCSC genome browser (≈
813 7Mio regions) directly into Galaxy (usegalaxy.org) and joined genomic intervals with a
814 minimum overlap of 45bp of this dataset with a dataset containing the annotation of UIDs
815 extracted from L1Basev2 ³ corrected in length with repeat masker and completed with
816 information on whether the UID is intra- or intergenic and, if intragenic, in which gene
817 (NM_ID, chr, strand, start, end, gene length, number of exons, gene symbol) the fl-LINE-1 is
818 located, which resulted in 1266 regions. We then used the “group on data and group by”
819 function in Galaxy and counted the number of overlapping 50kmers with all 146 UIDs
820 (=mappability score). Correlation analysis (non-parametric Spearman) was then done between
821 the mappability score and the normalized read counts.

822

823 **Immunoprecipitation of ORF1p from the mouse brain**

824 For immunoprecipitation, we used ORF1p (abcam, ab245122) and IgG rabbit (abcam,
825 ab172730) antibodies. The antibodies were coupled to magnetic beads using the Dynabeads®

826 Antibody Coupling Kit (Invitrogen, 14311D) according to the manufacturer's recommendations.
827 We used 5 μ g of antibody for 1 mg of beads and used 1.5mg of beads for IP. Individual mouse
828 brain lysates (n=5), homogenized using dounce and sonicated, were incubated with ORF1p or
829 IgG-control coupled beads and a small fraction was kept as input. Each of these two tubes
830 containing coupled beads and brain lysates were diluted in 5 ml buffer (10 mM Tris HCl, 150
831 mM NaCl, protease inhibitor). The samples were then incubated overnight on a wheel at 4°C.
832 Samples were then washed 3 times with 1 ml buffer (10 mM Tris HCl pH 8, 150 mM NaCl)
833 using a magnet and then resuspended in the same buffer. The samples were boiled in Laemmli
834 buffer (95°C, 10 min) and 20 μ l of each sample were deposited on a 4-12% Nupage gel
835 (Invitrogen, NP0336) to be revealed by WB. For samples used in Mass Spectrometry study,
836 beads were washed with buffer (10 mM Tris HCl pH 8, 150 mM NaCl) using a magnet. After
837 3 washes with 1ml buffer the beads were washed twice with 100 μ L of 25 mM NH₄HCO₃
838 (ABC buffer). Finally, beads were resuspended in 100 μ l of 25mM ABC buffer and digested
839 by adding 0.20 μ g of trypsin/LysC (Promega) for 1 hour at 37 °C. A second round of digestion
840 was applied simultaneously on the beads by adding 100 μ L of 25 mM ABC buffer and to the
841 previous digest by adding 0.20 μ g of trypsin/LysC for 1 hour at 37 °C. Samples were then
842 loaded into homemade C18 StageTips packed by stacking three AttractSPE® disk (#SPE-
843 Disks-Bio-C18-100.47.20 Affinisep) into a 200 μ L micropipette tip for desalting. Peptides were
844 eluted using a ratio of 40:60 CH₃CN:H₂O + 0.1% formic acid and vacuum concentrated to
845 dryness with a SpeedVac device. Peptides were reconstituted in 10 μ L of injection buffer in
846 0.3% trifluoroacetic acid (TFA) before liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-
847 MS/MS) analysis.

848

849

850

851 **Mass Spectrometry**

852 Online chromatography was performed with an RSLCnano system (Ultimate 3000, Thermo
853 Scientific) coupled to a Q Exactive HF-X with a Nanospray Flex ion source (Thermo Scientific).
854 Peptides were first trapped on a C18 column (75 μm inner diameter \times 2 cm; nanoViper Acclaim
855 PepMapTM 100, Thermo Scientific) with buffer A (2/98 MeCN/H₂O in 0.1% formic acid) at
856 a flow rate of 2.5 $\mu\text{L}/\text{min}$ over 4 min. Separation was then performed on a 50 cm \times 75 μm C18
857 column (nanoViper Acclaim PepMapTM RSLC, 2 μm , 100 \AA , Thermo Scientific) regulated to
858 a temperature of 50 $^{\circ}\text{C}$ with a linear gradient of 2% to 30% buffer B (100% MeCN in 0.1%
859 formic acid) at a flow rate of 300 nL/min over 91 min. MS full scans were performed in the
860 ultrahigh-field Orbitrap mass analyzer in ranges m/z 375–1500 with a resolution of 120 000 at
861 m/z 200. The top 20 intense ions were subjected to Orbitrap for further fragmentation via high
862 energy collision dissociation (HCD) activation and a resolution of 15 000 with the intensity
863 threshold kept at 1.3×10^5 . We selected ions with charge state from 2⁺ to 6⁺ for screening.
864 Normalized collision energy (NCE) was set at 27 and the dynamic exclusion of 40s. For
865 identification, the data were searched against the Mus Musculus (UP000000589_10090
866 012019) Uniprot database using Sequest HT through proteome discoverer (version 2.4).
867 Enzyme specificity was set to trypsin and a maximum of two-missed cleavage sites were
868 allowed. Oxidized methionine, Met-loss, Met-loss-Acetyl and N-terminal acetylation were set
869 as variable modifications. Maximum allowed mass deviation was set to 10 ppm for
870 monoisotopic precursor ions and 0.02 Da for MS/MS peaks. The resulting files were further
871 processed using myProMS97 v3.10.0. FDR calculation used Percolator and was set to 1% at
872 the peptide level for the whole study. The label free quantification was performed by peptide
873 Extracted Ion Chromatograms (XICs), reextracted by conditions and computed with
874 MassChroQ version 2.2.21⁹⁸. For protein quantification, XICs from proteotypic peptides
875 shared between compared conditions (TopN matching) with missed cleavages were used.

876 Median and scale normalization at peptide level was applied on the total signal to correct the
877 XICs for each biological replicate (n=5). To estimate the significance of the change in protein
878 abundance, a linear model (adjusted on peptides and biological replicates) was performed, and
879 p-values were adjusted using the Benjamini–Hochberg FDR procedure. Proteins with at least
880 three peptides, identified in each biological replicates of ORF1p condition, a 10-fold enrichment
881 and an adjusted p-value ≤ 0.05 were considered significantly enriched in sample comparisons.
882 Unique proteins were considered with at least three peptides in all replicates. Protein selected
883 with these criteria were used for Gene Ontology enrichment analysis and string network
884 analysis.
885 The mass spectrometry proteomics data have been deposited to the ProteomeXchange Consorti-
886 um (<http://proteomecentral.proteomexchange.org>) via the PRIDE partner repository ⁹⁹ with the
887 dataset identifier PXD047160.

888

889 **Go term and string network analysis**

890 Gene Ontology analysis was performed using GO PANTHER (PANTHER: Making genome-
891 scale phylogenetics accessible to allPaul D. Thomas, Dustin Albou and Huaiyu MiProtein
892 Society. 2022;31(1):8-22. doi:10.1002/pro.4218) and String network physical interactions were
893 retrieved using the STRING database v11.5 (<https://string-db.org/>) and then implemented in
894 Cytoscape software ¹⁰⁰.

895

896 **Statistical analyses**

897 In column comparisons, data in each column were tested for normality using two normality and
898 lognormality tests (Shapiro-Wilk test and Kolmogorov-Smirnov test). Data which passed the
899 normality tests were analyzed subsequently by a parametric test, data which did not pass the
900 normality tests were analyzed by a non-parametric statistical test as indicated in the figure

901 legends. The significance threshold was defined as $p < 0.05$. Statistical analyses were done with
902 PRISM software (v10).

903

904

905 **Acknowledgments**

906 This work was supported by the Fondation de France (00086320, to J.F.), the Fondation du
907 Collège de France (to J.F. and T.B.), the Fondation NRJ/Institut de France (to J.F.) and the
908 National French Agency for Research (ANR-20-CE16-0022 NEURAGE). We gratefully
909 acknowledge the Collège de France Orion imaging facility (IMACHEM-IBiSA), member of
910 the French National Research Infrastructure France-BioImaging (ANR-10-INBS-04), which
911 received support from the program «Investissements d’Avenir» ANR-10-LABX-54
912 MEMOLIFE. We also thank the Fondation Bettencourt Schueller for their support.

913

914 **Contributions**

915 J.F. and R.L.J. conceived the project. T.B. carried out most of the experimental work and
916 analyzed the data. T.B., S.S. and J.F. analyzed the transcriptomic data. O.M.B. contributed to
917 the experimental work. T.B. and J.F. wrote the manuscript. T.B., P.M. and H.M. developed the
918 image analysis pipeline. B.L. carried out the MS experimental work and D.L. supervised MS
919 and performed data analysis with T.B..

920

921 **Competing interests**

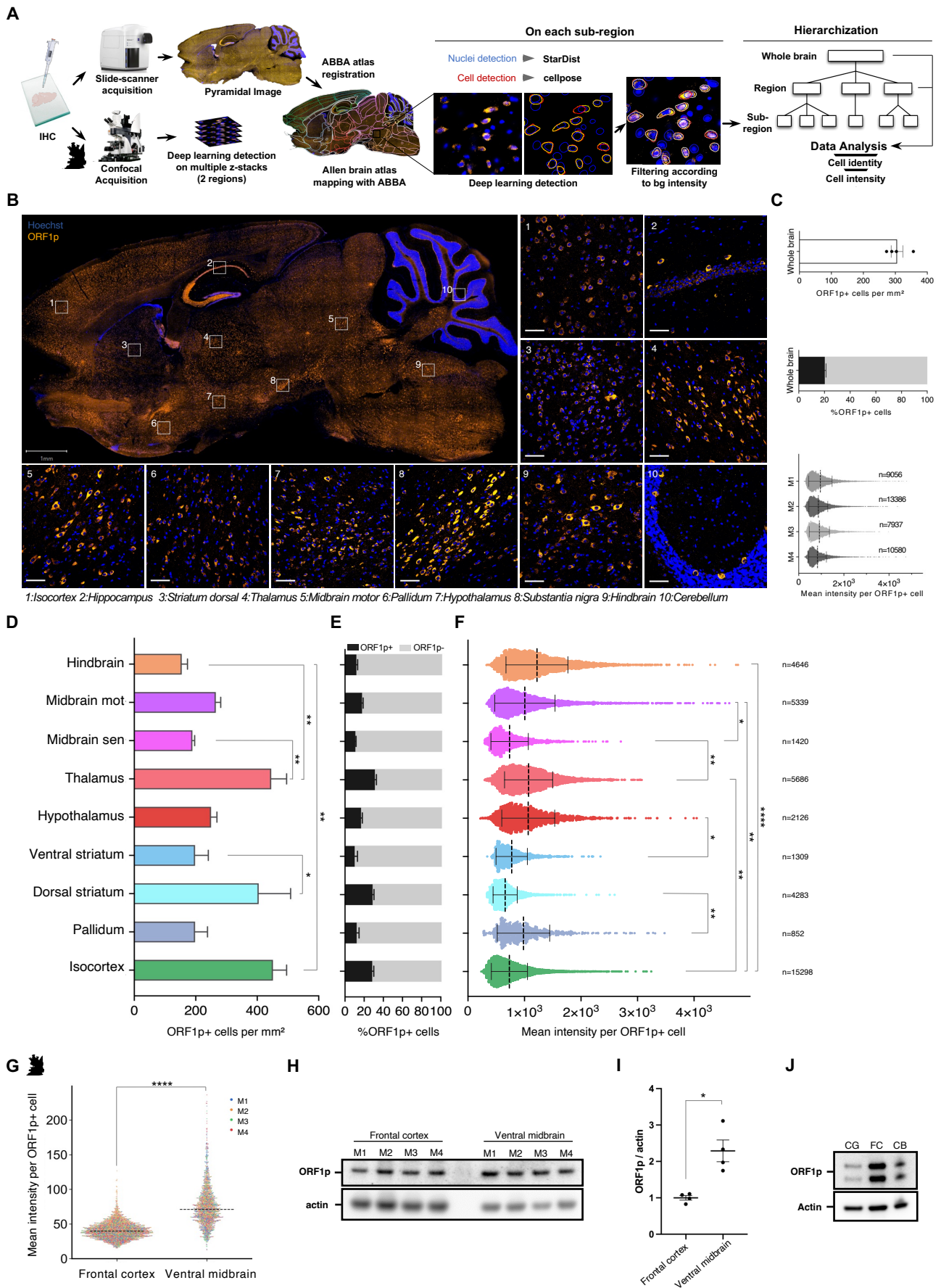
922 The authors declare no competing interests.

923

924

925

Figure 1:



951 **Figure 1: Widespread and heterogenous expression of ORF1p protein in the mouse brain**

952 (A) Schematic representation of the unbiased cell detection pipeline on large scale and confocal
953 images. Immunofluorescent images on sagittal mouse brain slices were either acquired on a
954 digital pathology slide-scanner (DNA stain: Hoechst, neuronal marker; NeuN, protein of
955 interest: ORF1p). Pyramidal images aquired with the slide scanner were then aligned with the
956 hierarchical anatomical annotation of the Allen Brain Atlas using ABBA. Once the regions
957 defined, a deep-learning based detection of cell nuclei (Hoechst staining, Stardist) and cell
958 cytoplasm (NeuN staining, Cellpose) was performed on each sub-region of the atlas. Objects
959 were filtered according to the background intensity measured in each sub-region for each
960 channel (NeuN and ORF1p). The identity and intensity measures were analyzed at the regional
961 and whole brain level. In parallel, confocal images (multiple z-stacks) of two selected regions
962 (frontal cortex and ventral midbrain) were also acquired and identity and intensity were
963 quantified using Cellpose and Stardist.

964 (B) Widespread and heterogenous expression of the LINE-1 encoded protein ORF1p in the
965 mouse brain. Representative image of ORF1p immunostaining (orange) of a sagittal section of
966 the brain of a young (three months-old) mouse acquired on a slide scanner. Scale bar = 1mm.
967 (1-10) Representative images of immunostainings showing ORF1p expression (orange) in 10
968 different regions of the mouse brain acquired on a confocal microscope. Nuclei are represented
969 in blue (Hoechst), scale bar = 50 μ m. (1) Isocortex, (2) Hippocampus, (3) Striatum dorsal, (4)
970 Thalamus, (5) Midbrain motor, (6) Pallidum, (7) Hypothalamus, (8) Substantia nigra pars
971 compacta, (9) Hindbrain, (10) Cerebellum.

972 (C) ORF1p expression profile in the mouse brain. The entire mouse brain with the exception of
973 the olfactory bulb and the cerebellum were analyzed according to the pipeline on large-scale
974 images described in (A). Bar plot showing the total number of ORF1p+ cells per mm² in the
975 mouse brain. Data is represented as mean \pm SEM, n=4 mice (top). Bar plot indicating the

976 proportion of ORF1p+ cells compared to all cells detected. Data is represented as mean \pm SEM,
977 n=4 mice, 202001 total cells analyzed (middle). Scatter plot showing the mean intensity of
978 ORF1p per ORF1p+ cell. Data is represented as mean \pm SD, n=4 mice, 40999 ORF1p+ cells
979 analyzed (bottom).

980 (D-F) ORF1p expression profile (density, proportion and expression) in defined anatomical
981 regions of the mouse brain. Nine anatomical regions as defined by the Allen Brain Atlas and
982 mapped onto sagittal brain slices with ABBA were analyzed using the pipeline on large scale
983 images described in (A). (D) ORF1p+ cell density in 9 different regions. Bar plot showing the
984 number of ORF1p+ cells per mm². Data is represented as mean \pm SEM; *p<0.05; **p<0.01;
985 adjusted p-value, one-way ANOVA followed by a Benjamin-Hochberg test. (E) Proportion of
986 ORF1p positive cells in 9 different regions. Bar plot showing the proportion of ORF1p+ cells
987 among all cells detected per region. Data is represented as mean \pm SEM. (F) Mean ORF1p
988 expression per cell in 9 different regions. plot showing the mean intensity of ORF1p signal per
989 ORF1p+ cell in 9 different regions. Data is represented as mean \pm SD. The number of analyzed
990 cells per region is indicated in the figure. *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001; ****p<0.0001;
991 adjusted p-value, nested one-way ANOVA followed by Sidak' multiple comparison test.

992 (G) ORF1p expression in the frontal cortex and ventral midbrain. Confocal images with
993 multiple z-stacks were analyzed using Cellpose and Stardist. Dot plot representing the mean
994 expression of ORF1p per ORF1p+ cells. Individual (four three-month-old Swiss/ OF1) mice
995 are represented each by a different color, the scattered line represents the median.
996 ****p<0.0001, nested one-way ANOVA. Total cells analyzed = 4645.

997 (H-I) ORF1p expression in the frontal cortex and the ventral midbrain. (H) Western blots
998 showing ORF1p (top) and actin expression (bottom) in four individual mice per region which
999 were quantified in (I) using actin as a reference control. The signal intensity is plotted as the

1000 fold change of ORF1p expression in the ventral midbrain to ORF1p expression in the frontal
1001 cortex. *p<0.05 ob; two-sided, unpaired student's-test.

1002

1003

1004

1005

1006

1007

1008

1009

1010

1011

1012

1013

1014

1015

1016

1017

1018

1019

1020

1021

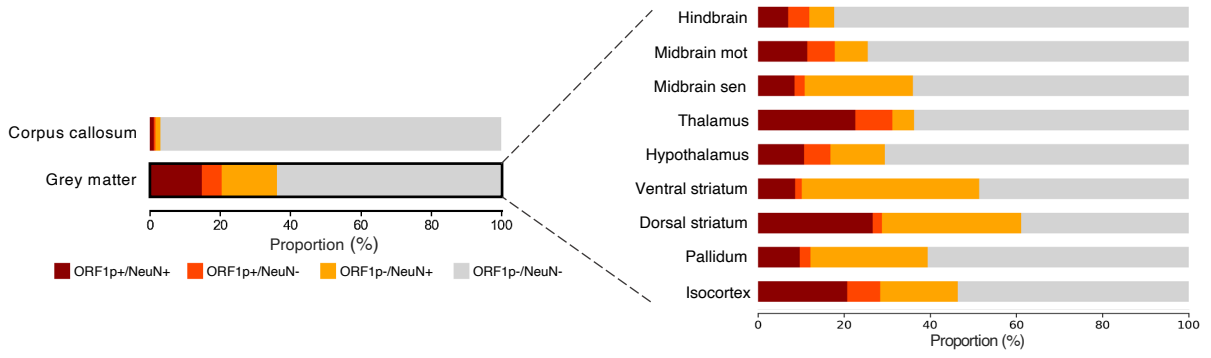
1022

1023

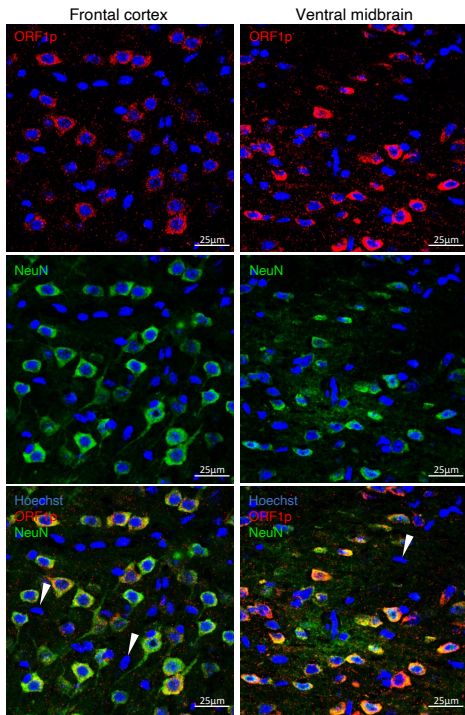
1024

Figure 2:

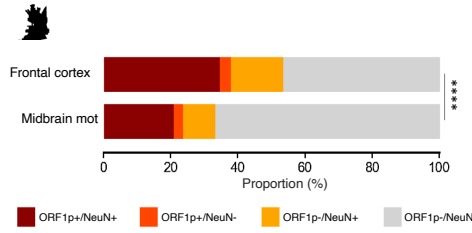
A



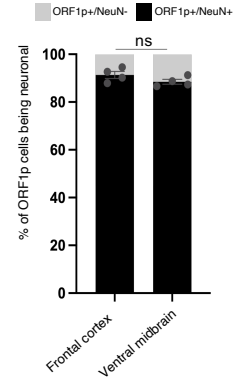
B



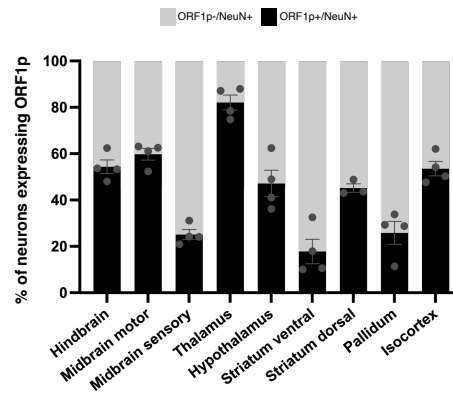
C



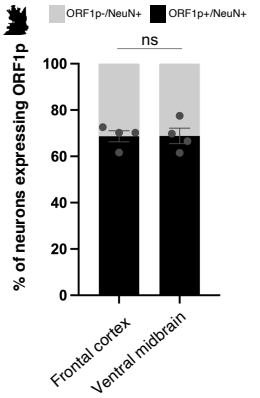
D



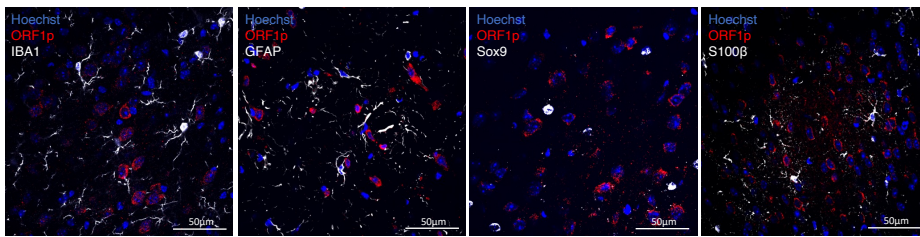
E



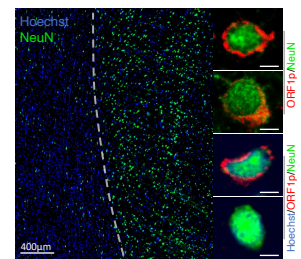
F



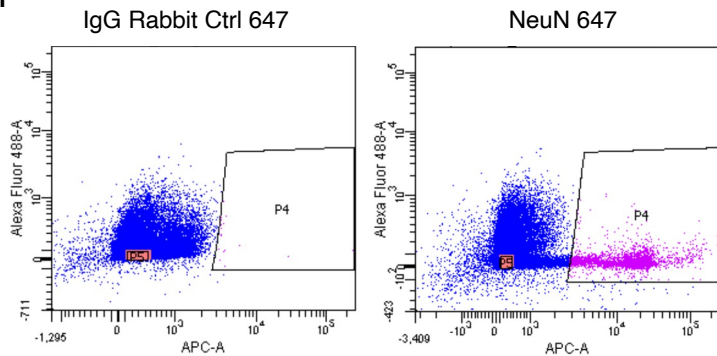
G



H



I



J

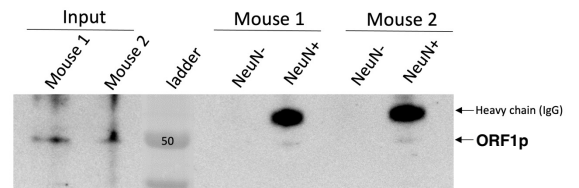
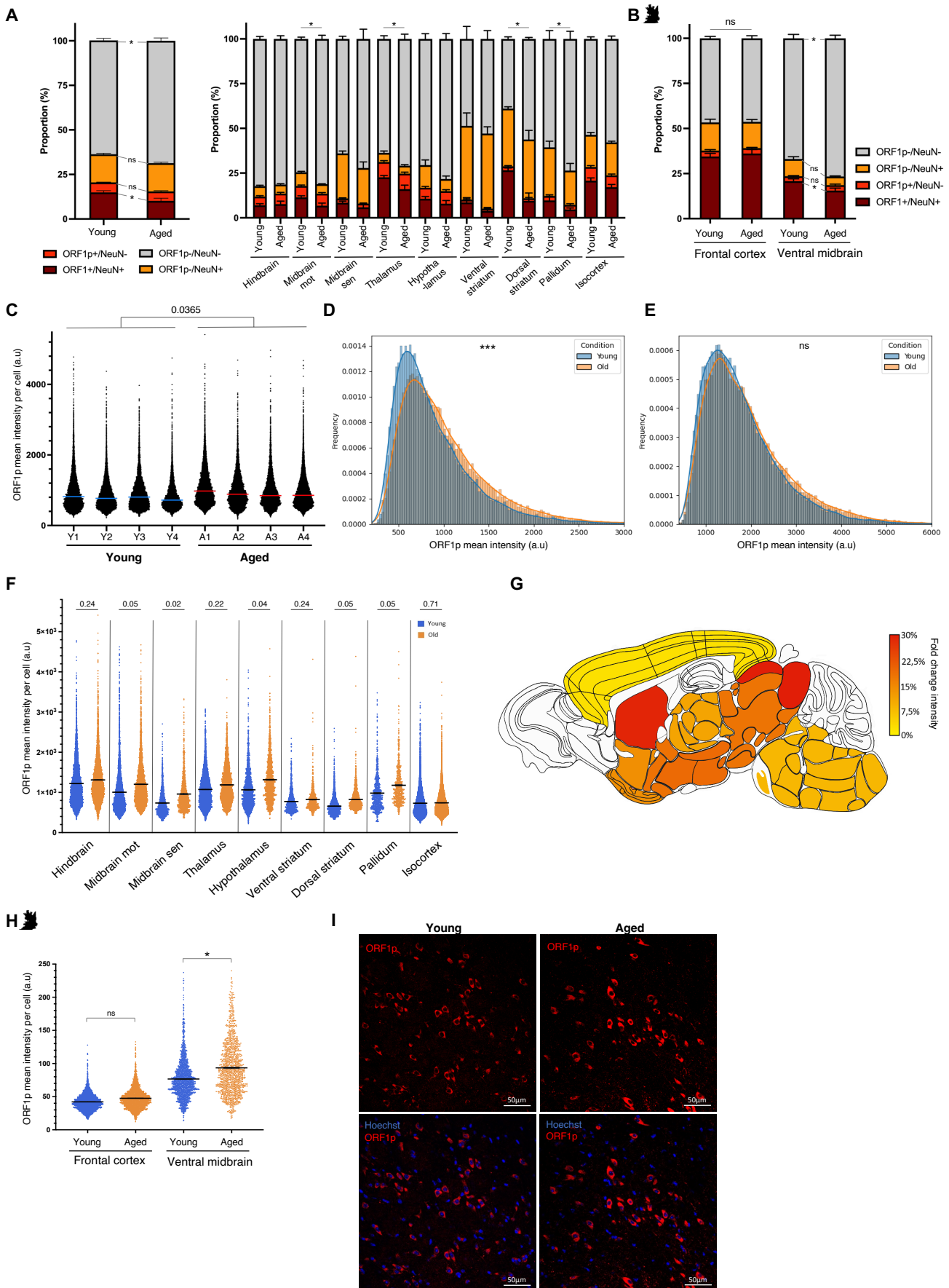


Figure 3:



1075 **Figure 2: ORF1p is predominantly expressed in neurons in the mouse brain**

1076 (A) ORF1p expression is absent in the white matter (corpus callosum) and predominantly
1077 expressed in neurons. Proportion of ORF1p⁺/NeuN⁺, ORF1p⁺/NeuN⁻, ORF1p⁻/NeuN⁺ and
1078 ORF1p⁻/NeuN⁻ cells in the white matter (corpus callosum) and the grey matter (left) and in
1079 nine different regions (right) analyzed by the cell detection pipeline on large scale images
1080 presented in *Figure 1A*. Exact values can be found in *Suppl. Table 1*.

1081 (B) Representative confocal microscopy images showing ORF1p (red) and NeuN expression
1082 (green) in two different regions of the mouse brain. The bottom images show the merge of the
1083 two stainings, an overlap of both markers is represented in orange. z-projections; scalebar =
1084 25 μ m

1085 (C) ORF1p is predominantly expressed in neurons. Proportion of ORF1p⁺/NeuN⁺,
1086 ORF1p⁺/NeuN⁺, ORF1p⁺/NeuN⁻, ORF1p⁻/NeuN⁺ and ORF1p⁻/NeuN⁻ cells, ****p<0.0001;
1087 calculated using chi-square test on the cell number of the four different cell-types analyzed by
1088 confocal microscopy on multiple z-stacks (p2).

1089 (D) Proportion of ORF1p⁺ cells identified as NeuN⁺ or NeuN⁻ in two different regions,
1090 analyzed by confocal microscopy on multiple z-stacks (p2). ns: non-significant; chi-square test,
1091 n=4 mice.

1092 (E) Proportion of neurons (NeuN⁺) expressing ORF1p in different regions of the mouse brain
1093 as quantified using the cell detection pipeline on large scale images (p1).

1094 (F) Proportion of neurons expressing ORF1p in the frontal cortex and ventral midbrain
1095 quantified on confocal images using confocal approach. ns: non-significant; chi-square test on
1096 the cell number of the different cell-types analyzed; n=4 mice, data is represented as mean \pm
1097 SEM.

1098 (G) ORF1p does not colocalize with glial or microglial cell markers. Representative confocal
1099 microscopy images showing ORF1p staining (red) and three different glial cell (GFAP, Sox9,
1100 S100b) or microglial (Iba1) markers (white). z-projections, scalebar = 50 μ m.

1101 (H) Representative acquisition showing NeuN positives cells (green) In grey (right) but not in
1102 white matter (left) in a cingular gyrus in healthy human brain acquire on slide scanner; scale
1103 bar = 400 μ m (left) and zoom on grey matter with a confocale showing ORF1p in red;
1104 representative image scale bar = 5 μ m (right).

1105 (I-J) Isolation of neuronal cells by FACS confirms predominant neuronal expression of ORF1p.

1106 (I) Neuronal (NeuN+) cells isolated by fluorescent activated cell sorting (FACS). Dot plots
1107 showing autofluorescence versus an appropriate control antibody (IgG rabbit 647; left) and an
1108 antibody against NeuN (name of the AB 657, right). The P4 window represents isolated NeuN+
1109 cells (pink) and the P5 fraction NeuN- cells (orange) containing the same number of cells as
1110 sorted in P4 for comparison, others NeuN- are represented in blue. (J) Western blot. ORF1p
1111 expression (top), in NeuN- and NeuN+ FACS-sorted cells stemming from I.

1112

1113 **Figure 3: ORF1p expression is increased throughout the whole mouse brain in the context**
1114 **of aging**

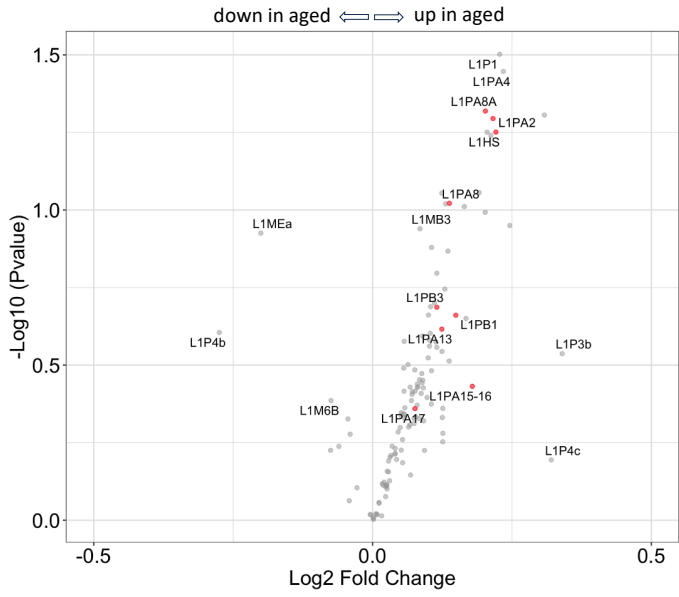
1115 (A) Proportion of ORF1p+/NeuN+, ORF1p+/NeuN+, ORF1p+/NeuN-, ORF1p-/NeuN+ and
1116 ORF1p-/NeuN- cell-type in the whole brain (left) and the different analyzed regions (right) of
1117 young (three-month aged, n=4) and aged (16-month-old, n=4) mice using the cell detection
1118 pipeline on large scale images presented in Figure 1A (p1), data is represented as mean \pm SEM.

1119 (B) Proportion of ORF1p+/NeuN+, ORF1p+/NeuN+, ORF1p+/NeuN-, ORF1p-/NeuN+ and
1120 ORF1p-/NeuN- cell-type in two different regions of young and aged mice, analyzed on multiple
1121 z-stack confocal images (p2). ns: non-significant; *p<0.05 calculated using two-way ANOVA
1122 with sidak's multiple comparisons test on the cell number of the different cell-types analyzed;

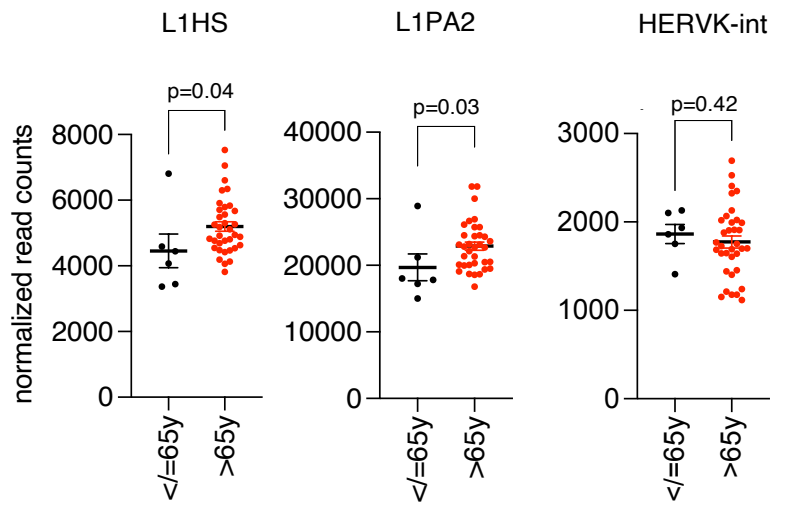
1123 data is represented as mean \pm SEM.
1124 (C) ORF1p mean expression per ORF1p+ cell in the brain analyzed on large-scale images (p1).
1125 Plot showing the ORF1p mean expression per ORF1p+ cell in young (n=4) and aged (n=4)
1126 mice in the whole brain (except cerebellum and olfactory bulb). 74985 total cells were analyzed;
1127 * $p < 0.05$, two-way ANOVA with sidak's multiple comparisons; data is represented as mean \pm
1128 SEM.
1129 (D) Frequency distribution of ORF1p mean intensity in ORF1p+ cells. *** $p < 0.001$,
1130 Kolmogorov-Smirnov test.
1131 (E) Frequency distribution of Hoechst mean intensity in the nuclei of ORF1p+ cells. ns: non-
1132 significant, Kolmogorov-Smirnov test.
1133 (F) Mean ORF1p expression per ORF1p+ cell in nine different anatomical regions. Plot
1134 showing the ORF1p mean expression per ORF1p positive cell (n=74985). Adjusted p-value are
1135 represented, two-tailed nested t-test followed by a Benjamin, Krieger and Yukutieli test; n=4
1136 young and n=4 aged mice per region, data is represented as mean \pm SEM.
1137 (G) Color-coded representation of fold-changes of ORF1p expression changes with aging.
1138 Represented is the fold-change in percent (aged vs young) of the "mean of the mean" ORF1p
1139 expression per ORF1p+ cell quantified mapped onto the nine different regions analyzed as
1140 shown in (F).
1141 (H) ORF1p expression is increased in the ventral midbrain of aged mice. Dot plot representing
1142 ORF1p expression in two different regions of young and aged mice analyzed on confocal
1143 images with multiple z-stacks; total cells analyzed = 8381 ns: non-significant * $p < 0.05$, two-
1144 tailed one-way ANOVA; dashed lines represent the medians.
1145 (I) Representative confocal microscopy acquisition showing increased ORF1p expression (red)
1146 in the ventral midbrain region of aged mice (one z plan is shown). Cell nuclei are shown in blue
1147 (Hoechst staining). Scalebar = 50 μ m.

Figure 4:

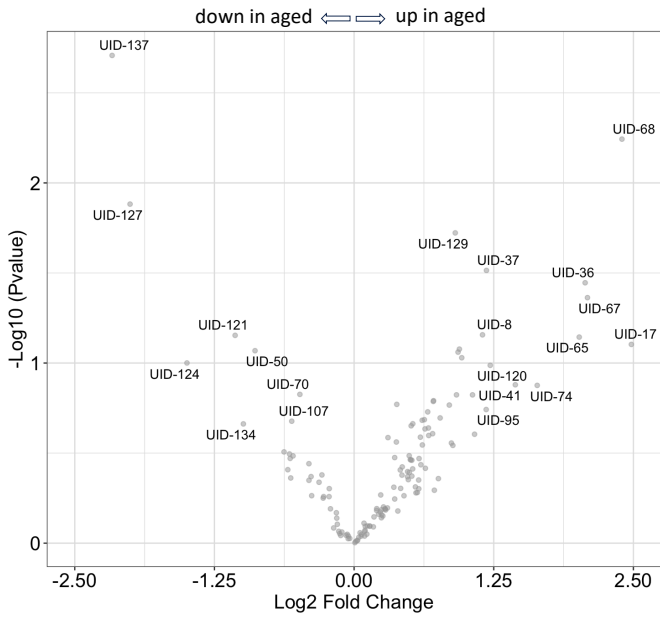
A



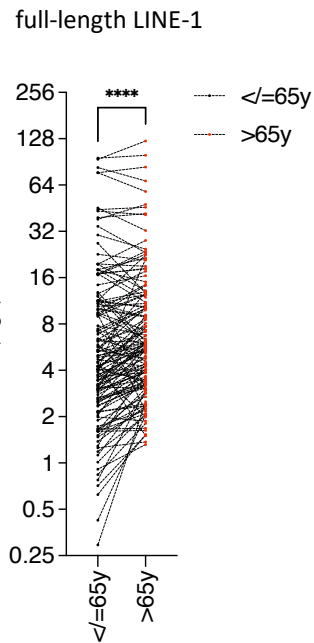
B



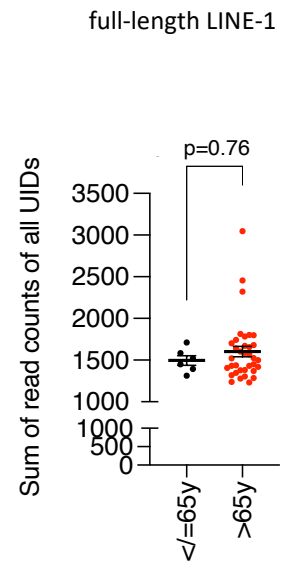
C



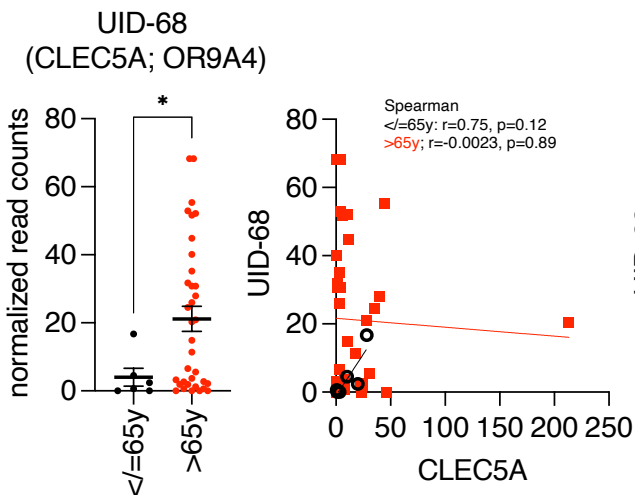
D



E



F



G

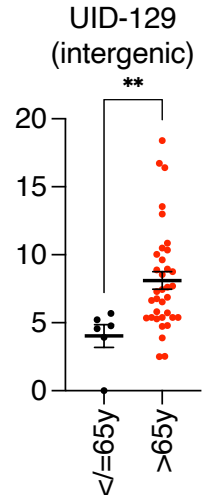
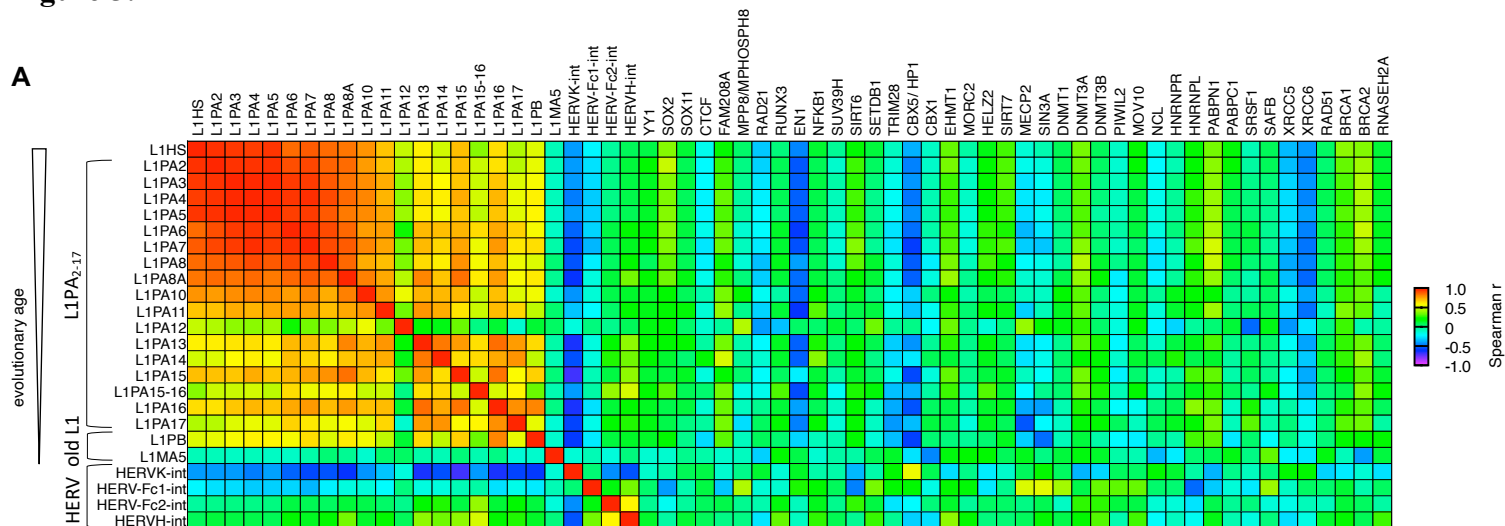


Figure 5:

A



1198 **Figure 4: Young LINE-1 elements are increased in aged human dopaminergic neurons**

1199 TE transcript expression in RNA-seq data of laser-captured micro-dissected post-mortem
1200 human dopaminergic neurons of brain-healthy individuals was analyzed using RepeatMasker
1201 (multimappers) or the L1Base (unique reads).

1202 (A) Volcano plot of differential analysis of LINE-1 expression using DESeq2 comparing young
1203 (≤ 65 y, n=6) or aged (> 65 y, n=35) human dopaminergic neurons at the “name” level of
1204 RepeatMasker. Young LINE-1 elements, including the two families L1HS and L1PA2 that have
1205 coding copies, are highlighted in red.

1206 (B) Scatter plots of normalized read counts (“name” level) of the young L1HS and L1PA2
1207 families as well as the human endogenous virus family HERVK-int, another TE family with
1208 coding potential comparing young (≤ 65 y, n=6) or aged (> 65 y, n=35) human dopaminergic
1209 neurons. Mann-Whitney test, $p < 0.05$.

1210 (C) Volcano plot of differential expression analysis of TE expression using DEseq2 comparing
1211 young (≤ 65 y, n=6) and aged (> 65 y, n=35) human dopaminergic neurons at the locus-level of
1212 specific full-length LINE-1 elements (140 of 146 “UID’s” as annotated in L1Base; threshold
1213 > 3 reads in at least 6 individuals).

1214 (D) Pairwise comparison of the expression of 140 out of 146 full-length LINE-1 elements
1215 comparing young (≤ 65 y, n=6) and aged (> 65 y, n=35) human dopaminergic neurons.
1216 Wilcoxon matched signed rank test, $p < 0.0001$ (left panel).

1217 (E) The sum of read counts of all UIDs per individual were plotted comparing young (≤ 65 y,
1218 n=6) and aged (> 65 y, n=35) human dopaminergic neurons.

1219 (F-G) Dysregulated locus-specific full-length LINE-1 elements (UID-68 and UID-129) are
1220 plotted as scatter plots comparing young (≤ 65 y, n=6) and aged (> 65 y, n=35) human
1221 dopaminergic neurons. (F) UID-68 is located adjacent to the genes CLEC5A and OR9A4 (left).
1222 Spearman correlation analysis of the expression of UID-68 and CLEC5A (middle) or OR9A4

1223 (right) in young (≤ 65 y, n=6, black dots) or aged (> 65 y, n=35, red squares) human
1224 dopaminergic neurons. (G) UID-129 is intergenic.

1225

1226 **Figure 5: Potential regulators of LINE-1 expression in human dopaminergic neurons**

1227 Correlation of the expression of evolutionary related and distant LINE-1 elements with known
1228 regulators in human dopaminergic neurons

1229 (A) Spearman correlation of evolutionary close (L1HS, L1PA2-17) and distant LINE-1 (L1PB
1230 and L1MA5) as well as HERV elements with coding potential (HERV-Kint, HERV-Fc1,
1231 HERV-Fc2 and HERV-H-int) with known regulators of their expression. HERV-W and
1232 TREX1 did not pass the normalized read count threshold of >3 reads in >6 individuals.

1233

1234

1235

1236

1237

1238

1239

1240

1241

1242

1243

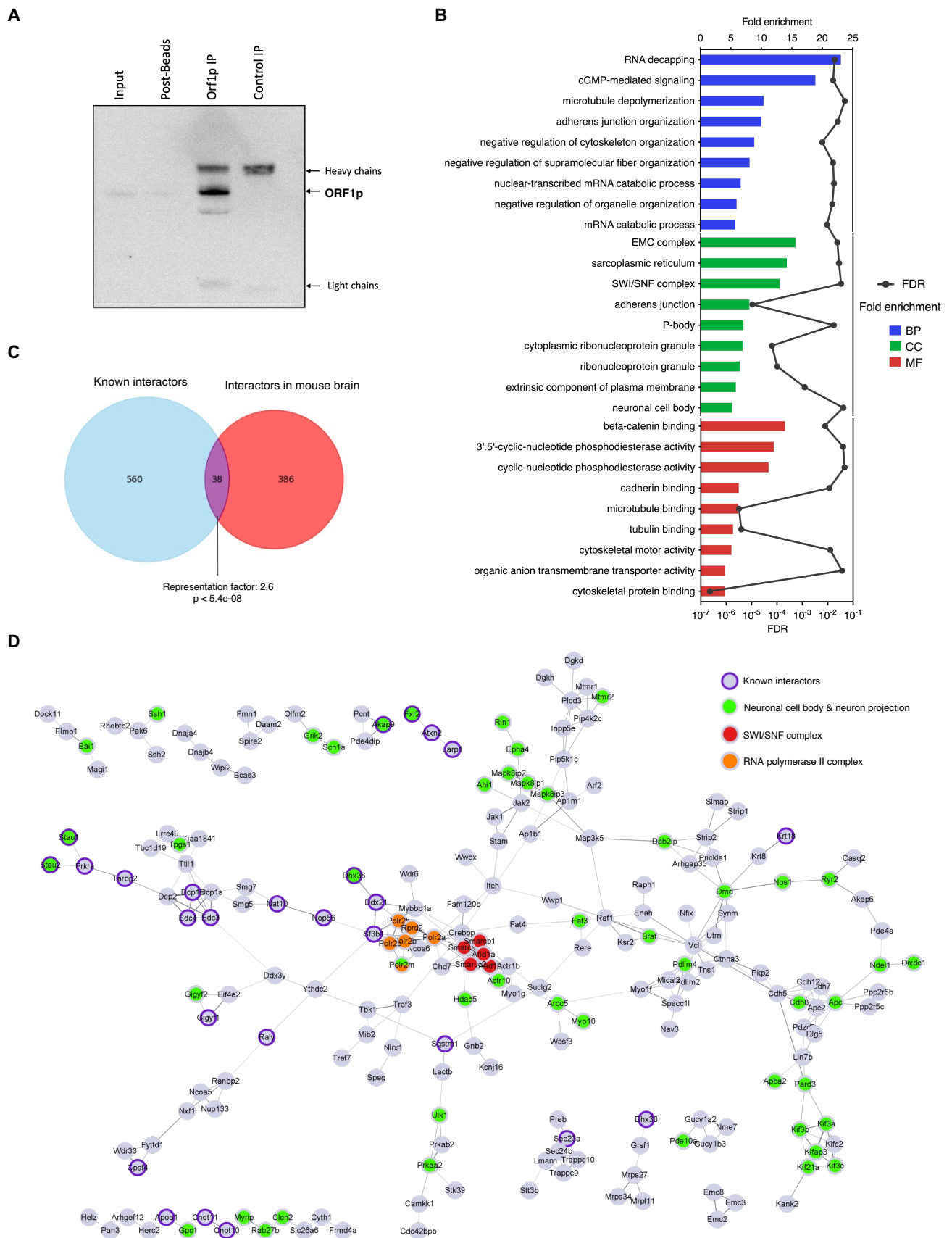
1244

1245

1246

1247

Figure 6:



1273 **Figure 6: Endogenous ORF1p interactors in the mouse brain**

1274 Immunoprecipitation (IP) of endogenous ORF1p from the mouse brain. WB against ORF1p
1275 showing ORF1p enrichment after IP but no signal in the IgG control. Five independent samples
1276 were then prepared for proteomic analysis by mass spectrometry (LC-MS/MS).

1277 (B) GO slim enrichment analysis of proteins identified as endogenous ORF1p protein partners
1278 in the mouse brain by LC/MS-MS. ORF1p-immunoprecipitated proteins were categorized into
1279 GO slim terms. The nine GO slim term with the highest fold-change are plotted. Fold
1280 enrichment is depicted on the upper axis and displayed as bars, the FDR value appears on the
1281 lower axis and is represented by the black points. BP: Biological Process, CC: Cellular
1282 Component, MF: Molecular Function.

1283 (C) Venn diagram showing common interactors (purple) between interactors of endogenous
1284 ORF1p in the mouse brain identified in this study (red) and known (published) interactors of
1285 ORF1p (blue). Statistical significance of the overlap between the two groups of proteins was
1286 tested by an overrepresentation test (http://nemates.org/MA/progs/overlap_stats.html).

1287 (D) ORF1p associates with the SWI/SNF complex (red), RNA pol II complex (orange) and
1288 interactors belonging to GO terms related to neuronal cell body & neuron projection (green).
1289 Known interactors previously published ^{53,58-63} are indicated with a purple ring. STRING
1290 network of physical interactions where nodes represent proteins partners identified in (A) and
1291 edges thickness represents the strength of shared physical complexes. Only proteins sharing
1292 physical interactions were represented.

1293

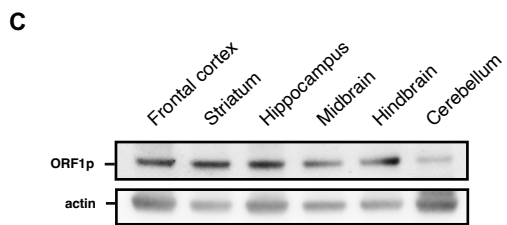
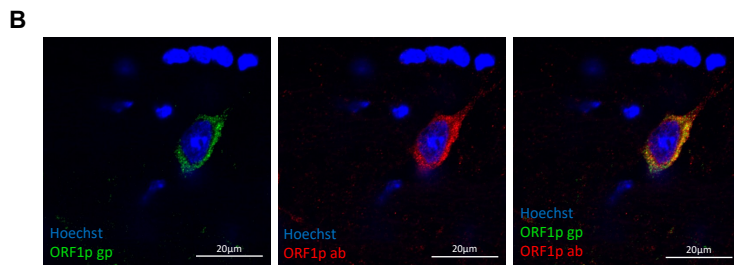
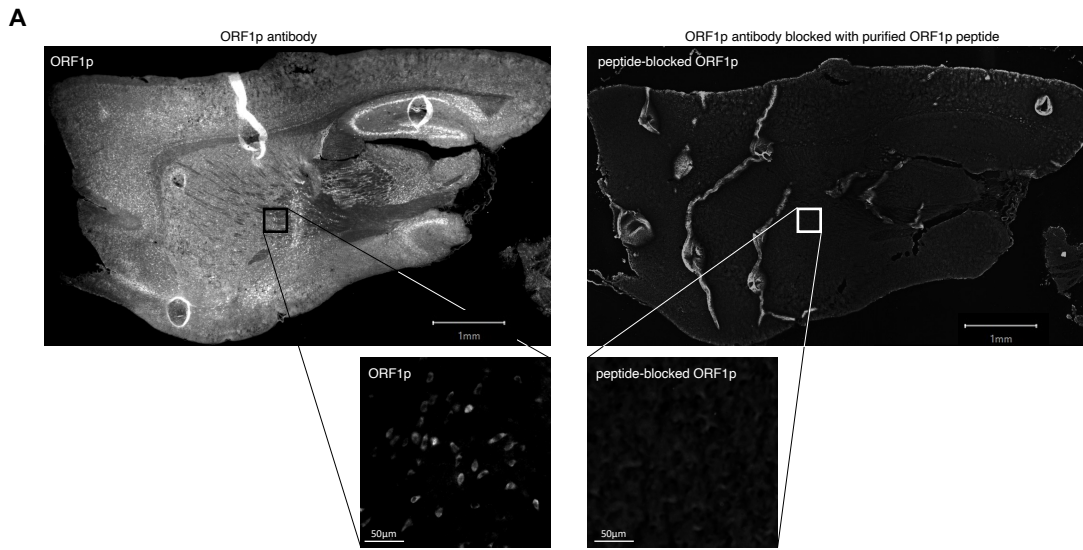
1294

1295

1296

1297

Suppl Figure 1:



1323 Suppl Figure 1

1324 (A) Selective recognition of ORF1p antibody. IHC showing ORF1p positives cells in sagittal
1325 mouse brain slice (left) and abolition of the signal when blocking the antibody with purified
1326 ORF1p (right).

1327 (B) Representative acquisition showing ORF1p obtained with abcam antibody used in this
1328 study (red) or with in-house antibody (green). Scalebar = 20 μ m.

1329 (C) ORF1p is expressed in six different brain regions in the mouse.

1330 Brain regions were micro-dissected from a three-month old mouse brain. Western blot showing
1331 ORF1p expression in 6 brain regions. ORF1p (Top), Actin (bottom).

1332

1333

1334

1335

1336

1337

1338

1339

1340

1341

1342

1343

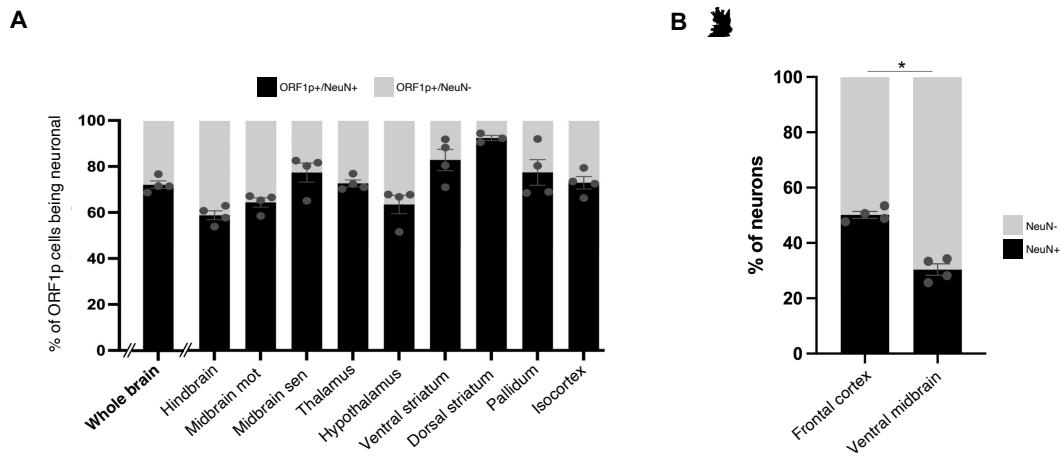
1344

1345

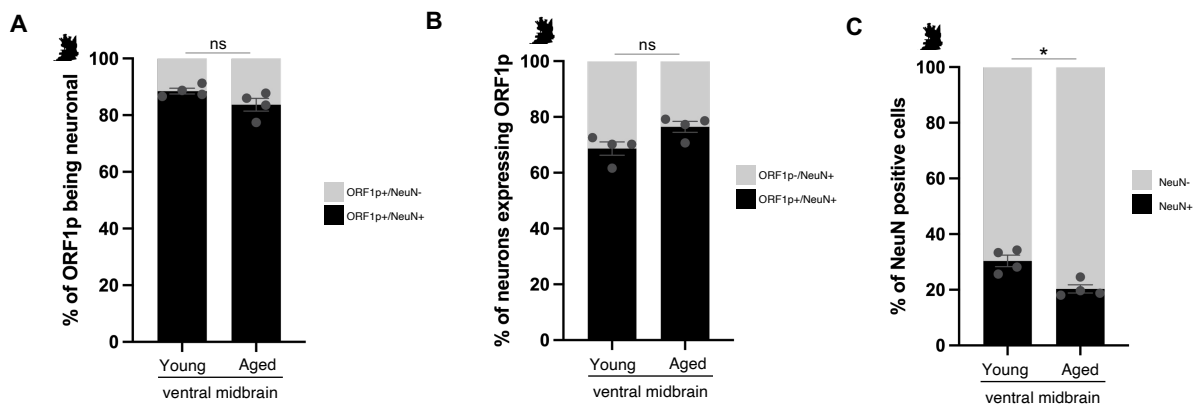
1346

1347

Suppl Figure 2:



Suppl Figure 3:



1373 Suppl Figure 2

1374 (A) ORF1p cell identity. Proportion of ORF1p+ cells identified as NeuN+ (black) or NeuN-
1375 (grey), in the whole brain (left) and in 9 different regions analyzed (right) using the cell
1376 detection pipeline on large scale images presented in Figure 1A; data is represented as mean \pm
1377 SEM, n=4 mice.

1378 (B) Proportion of neurons in the frontal cortex and ventral midbrain quantified using confocal
1379 approach. * $p < 0.05$, chi-square test on the cell number of the different cell-types analyzed; n=4
1380 mice, data is represented as mean \pm SEM.

1381

1382 Suppl Figure 3

1383 (A) Proportion of ORF1p+ cells being neuronal in the ventral midbrain comparing young and
1384 aged mice as quantified using confocal approach. Kolmogorov-Smirnov test; data is
1385 represented as mean \pm SEM.

1386 (B) Proportion of neurons expressing ORF1p in the ventral midbrain comparing young and
1387 aged mice as quantified using confocal approach. Kolmogorov-Smirnov test; data is
1388 represented as mean \pm SEM.

1389 (C) Proportion of neurons in the ventral midbrain comparing young and aged mice as quantified
1390 using confocal approach. Kolmogorov-Smirnov test; data is represented as mean \pm SEM.

1391

1392

1393

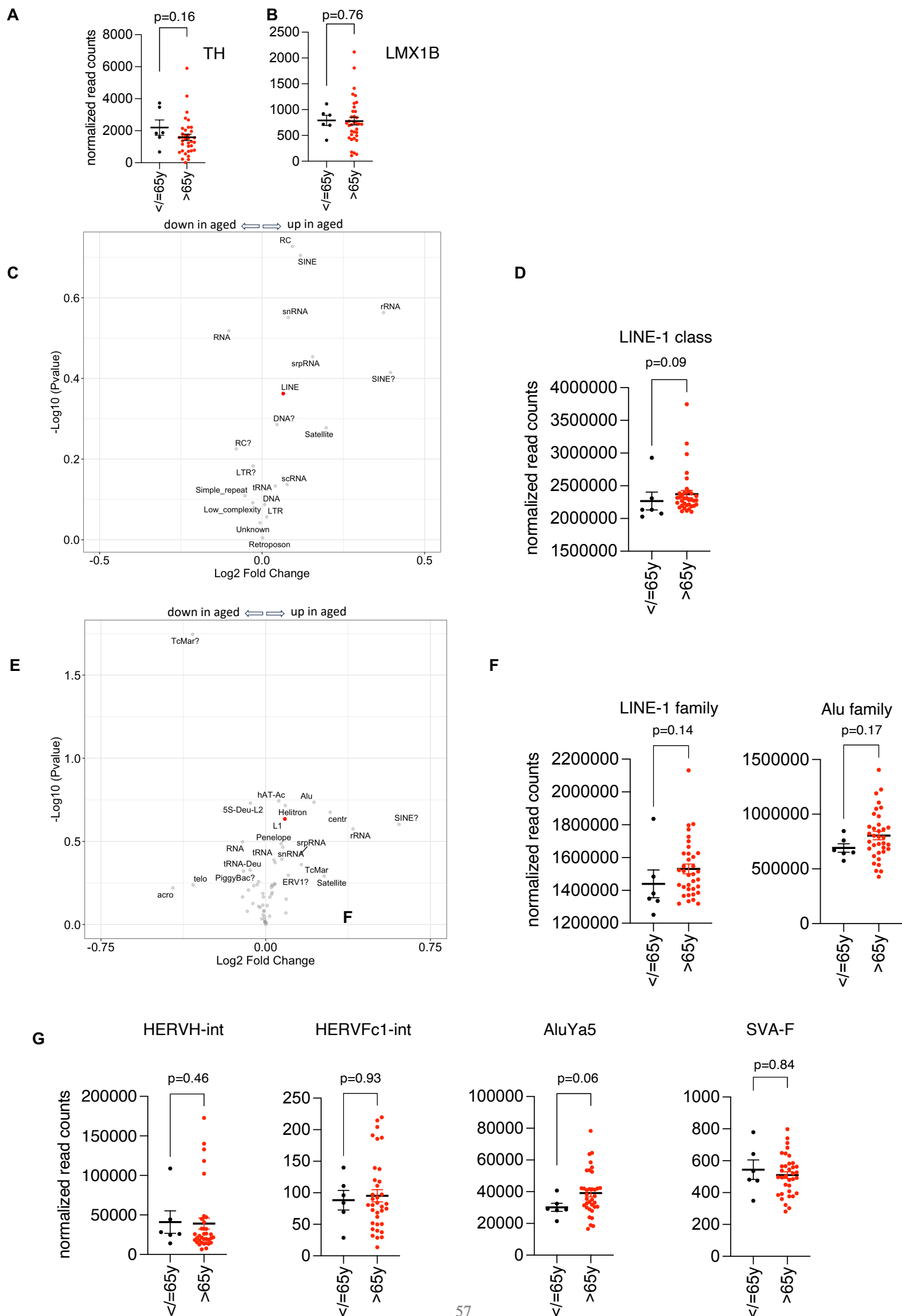
1394

1395

1396

1397

Suppl Figure 4:



1423 Suppl Fig4

1424 (A-B) Comparison of the expression of dopaminergic markers tyrosine hydroxylase (TH, A)
1425 and LMX1B (B) between young (≤ 65 y, n=6) and aged (> 65 y, n=35) human dopaminergic
1426 neurons. Mann Whitney test.

1427 (C, E) Volcano plot of differential expression analysis of TE expression using DEseq2
1428 comparing young (≤ 65 y, n=6) and aged (> 65 y, n=35) human dopaminergic neurons at the
1429 “class” (C) and “family” (E) level of RepeatMasker.

1430 (D) Scatter plot comparing the expression of LINE at the “class” level between young (≤ 65 y,
1431 n=6) and aged (> 65 y, n=35) human dopaminergic neurons. Mann Whitney test.

1432 (F) Scatter plot comparing the expression of LINE and Alu at the “family” level between young
1433 (≤ 65 y, n=6) and aged (> 65 y, n=35) human dopaminergic neurons. Mann Whitney test.

1434 (G) Scatter plot comparing the expression of HERVH-int, HERV-Fc1 and two non-coding,
1435 non-autonomous but active TEs in the human genome, AluYa5 and SVA-F at the “name” level
1436 between young (≤ 65 y, n=6) and aged (> 65 y, n=35) human dopaminergic neurons. Mann
1437 Whitney test.

1438

1439

1440

1441

1442

1443

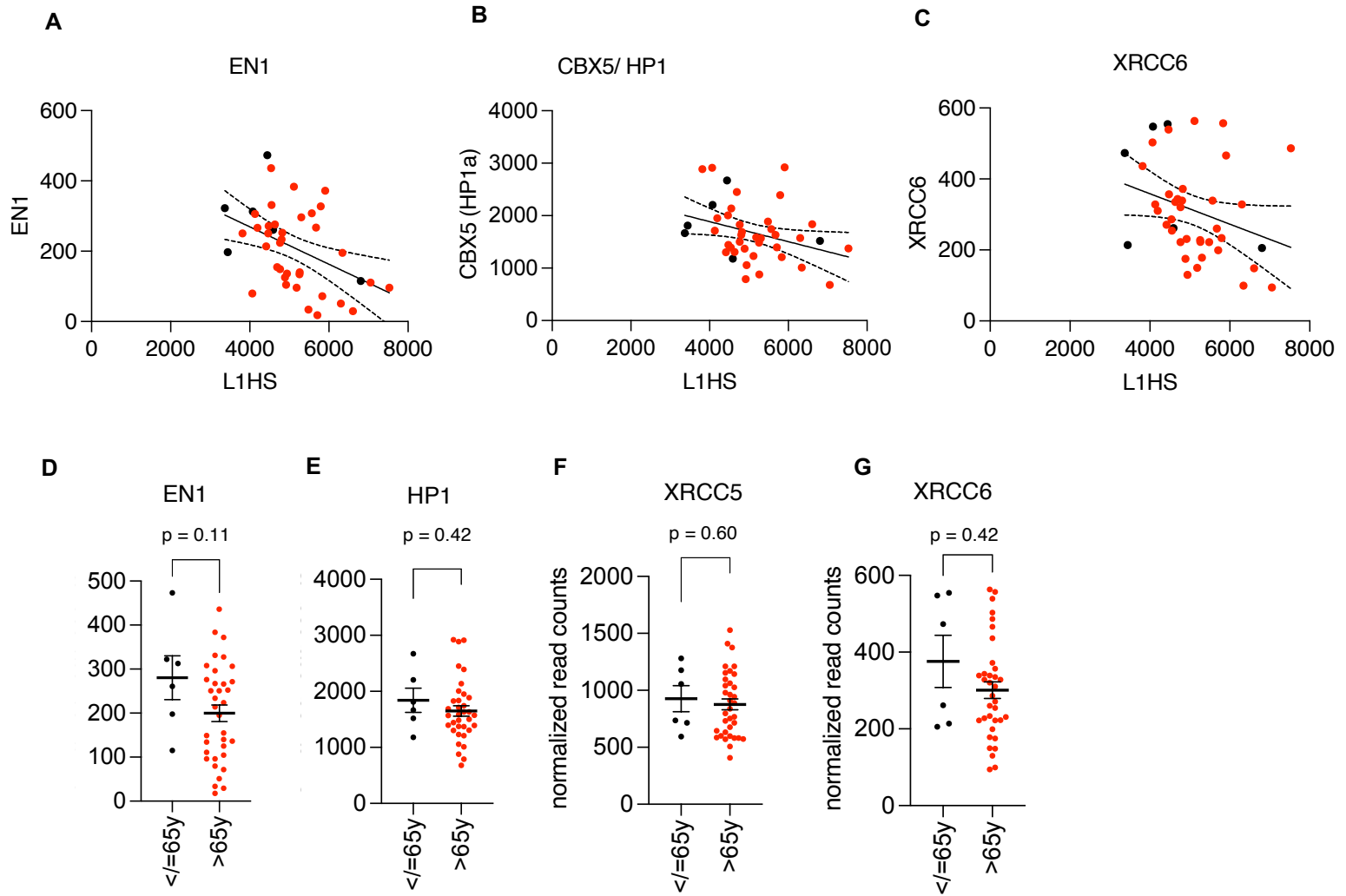
1444

1445

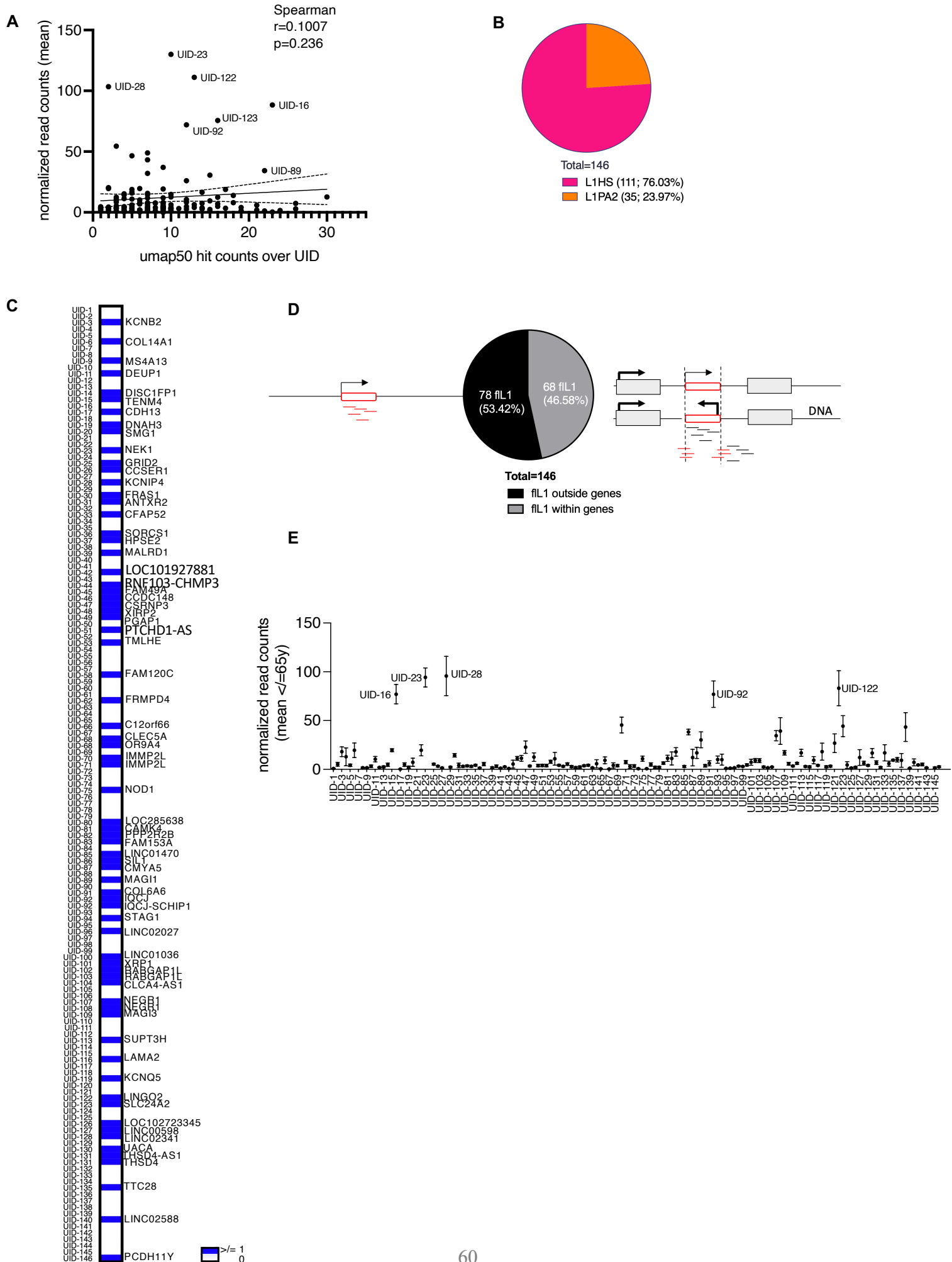
1446

1447

Suppl Figure 5:



Suppl Figure 6:



1498 Suppl Fig5

1499 (A-C) Correlation analyses of L1HS expression with Engrailed 1 (EN1, A, Spearman $r=-0.43$,

1500 $p=0.002$), CBX5/HP1 (B, Spearman $r=-0.35$, $p=0.01$) and XRCC6 expression (C, Spearman $r=$

1501 -0.394 , $p=0.005$)

1502 (D-G) Scatter plots comparing the expression of EN1, CBX5/HP1, XRCC5 and XRCC6

1503 between young ($\leq 65y$, $n=6$) and aged ($>65y$, $n=35$) human dopaminergic neurons. Student's

1504 t-test (EN1) or Mann Whitney test (HP1, XRCC5/6).

1505

1506 Suppl Fig6

1507 (A) Correlation of mappability (UMAP hit counts over UID, see methods) and UID expression

1508 (normalized read counts). Spearman correlation.

1509 (B-D) *In silico* analysis of annotated full-length LINE-1 elements as in L1Basev2 (human

1510 reference genome hg38). (B) Percentage of L1HS and L1PA2 elements among the 146 full-

1511 length elements (UID1-146). (C) Presence (blue, with gene symbol) or absence (white) of a

1512 "hosting" gene among the 146b annotated full-length LINE-1 in the human reference genome

1513 (D) Percentage of full-length LINE-1 elements located inside or outside a gene.

1514 (E) Mean expression of all 146 full-length LINE-1 elements in dopaminergic neurons of all

1515 individuals $\leq 65y$.

1516

1517

1518

1519

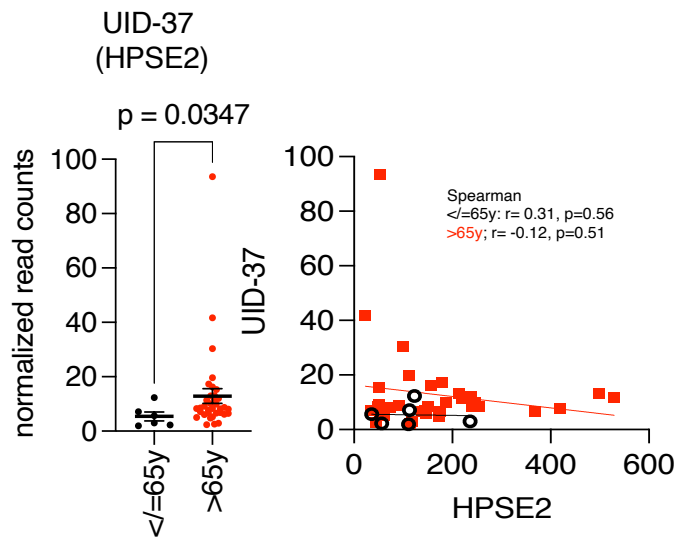
1520

1521

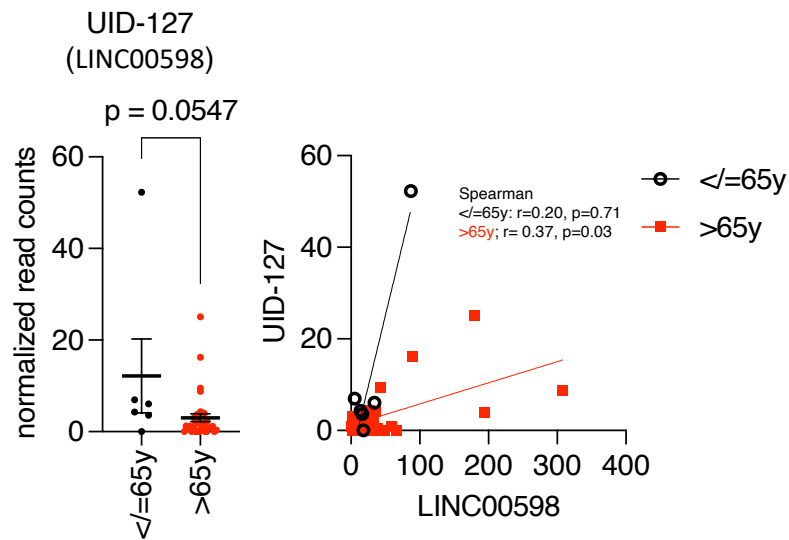
1522

Suppl Figure 7:

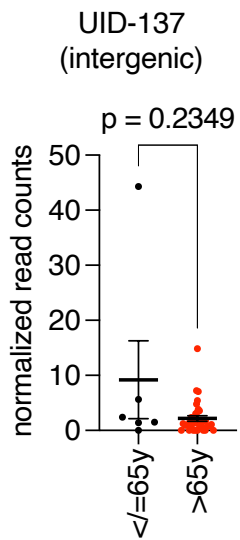
A



B



C



1548 Suppl Fig7

1549 (A-C) Dysregulated locus-specific full-length LINE-1 elements are plotted as scatter plots
1550 comparing young (≤ 65 y, n=6) and aged (> 65 y, n=35) human dopaminergic neurons. (A)
1551 UID-37 is located in an intron of the gene HPSE2 (left). Spearman correlation analysis of the
1552 expression of UID-37 and HPSE2 in young (≤ 65 y, n=6, black dots) and aged (> 65 y, n=35,
1553 red squares) human dopaminergic neurons. (B) UID-127 is located within the 6th intron of the
1554 non-coding RNA LINC00598 (left). Spearman correlation analysis of the expression of UID-
1555 127 and LINC00598 in young (≤ 65 y, n=6, black dots) and aged (> 65 y, n=35, red squares)
1556 human dopaminergic neurons. (C) UID-137 is intergenic.

1557

1558

1559

1560

1561

1562

1563

1564

1565

1566

1567

1568

1569

1570

1571

1572

1573 **References**

1574

- 1575 1. A hidden human proteome encoded by “non-coding” genes - PubMed. Accessed
1576 October 19, 2023. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31340039/>
- 1577 2. Brouha B, Schustak J, Badge RM, et al. Hot L1s account for the bulk of
1578 retrotransposition in the human population. *Proceedings of the National Academy of Sciences*
1579 *of the United States of America*. 2003;100(9):5280-5285. doi:10.1073/pnas.0831042100
- 1580 3. Penzkofer T, Jäger M, Figlerowicz M, et al. L1Base 2: more retrotransposition-active
1581 LINE-1s, more mammalian genomes. *Nucleic Acids Research*. 2017;45(D1):D68-D73.
1582 doi:10.1093/nar/gkw925
- 1583 4. Mao J, Zhang Q, Cong YS. Human endogenous retroviruses in development and
1584 disease. *Computational and Structural Biotechnology Journal*. 2021;19:5978-5986.
1585 doi:10.1016/j.csbj.2021.10.037
- 1586 5. Esnault C, Maestre J, Heidmann T. Human LINE retrotransposons generate processed
1587 pseudogenes. *Nat Genet*. 2000;24(4):363-367. doi:10.1038/74184
- 1588 6. Wei W, Gilbert N, Ooi SL, et al. Human L1 retrotransposition: cis preference versus
1589 trans complementation. *Molecular and Cellular Biology*. 2001;21(4):1429-1439.
1590 doi:10.1128/MCB.21.4.1429-1439.2001
- 1591 7. Mathias SL, Scott AF, Kazazian HH, Boeke JD, Gabriel A. Reverse transcriptase
1592 encoded by a human transposable element. *Science*. 1991;254(5039):1808-1810.
1593 doi:10.1126/science.1722352
- 1594 8. Feng Q, Moran JV, Kazazian HH, Boeke JD. Human L1 retrotransposon encodes a
1595 conserved endonuclease required for retrotransposition. *Cell*. 1996;87(5):905-916.
- 1596 9. Chen L, Dahlstrom JE, Lee SH, Rangasamy D. Naturally occurring endo-siRNA
1597 silences LINE-1 retrotransposons in human cells through DNA methylation. *Epigenetics :*
1598 *official journal of the DNA Methylation Society*. 2012;7(7):758-771. doi:10.4161/epi.20706
- 1599 10. Goodier JL, Cheung LE, Kazazian HH. MOV10 RNA helicase is a potent inhibitor of
1600 retrotransposition in cells. *PLoS Genetics*. 2012;8(10):e1002941.
1601 doi:10.1371/journal.pgen.1002941
- 1602 11. Philippe C, Vargas-Landin DB, Doucet AJ, et al. Activation of individual L1
1603 retrotransposon instances is restricted to cell-type dependent permissive loci. *eLife*. 2016;5.
1604 doi:10.7554/eLife.13926
- 1605 12. Peze-Heidsieck E, Bonnifet T, Znaidi R, et al. Retrotransposons as a Source of DNA
1606 Damage in Neurodegeneration. *Frontiers in aging neuroscience*. 2021;13:786897.
1607 doi:10.3389/fnagi.2021.786897
- 1608 13. Driver CJ, McKechnie SW. Transposable elements as a factor in the aging of
1609 *Drosophila melanogaster*. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1992;673(1):83-91.
1610 doi:10.1111/j.1749-6632.1992.tb27439.x
- 1611 14. Copley KE, Shorter J. Repetitive elements in aging and neurodegeneration. *Trends in*
1612 *Genetics*. Published online March 2023:S0168952523000343. doi:10.1016/j.tig.2023.02.008
- 1613 15. Gorbunova V, Seluanov A, Mita P, et al. The role of retrotransposable elements in
1614 ageing and age-associated diseases. *Nature*. Published online July 2021:1-11.
1615 doi:10.1038/s41586-021-03542-y
- 1616 16. Blaudin de Thé FX, Rekaik H, Peze-Heidsieck E, et al. Engrailed homeoprotein blocks
1617 degeneration in adult dopaminergic neurons through LINE-1 repression. *The EMBO Journal*.
1618 2018;37(15). doi:10.15252/embj.201797374
- 1619 17. Sur D, Kustwar RK, Budania S, et al. Detection of the LINE-1 retrotransposonRNA-
1620 binding protein ORF1p in different anatomical regions of the human brain. *Mobile DNA*.

- 1621 Published online November 2017:1-12. doi:10.1186/s13100-017-0101-4
- 1622 18. McKerrow W, Kagermazova L, Doudican N, et al. LINE-1 retrotransposon expression
1623 in cancerous, epithelial and neuronal cells revealed by 5' single-cell RNA-Seq. *Nucleic Acids*
1624 *Research*. 2023;51(5):2033-2045. doi:10.1093/nar/gkad049
- 1625 19. Gasior SL, Wakeman TP, Xu B, Deininger PL. The human LINE-1 retrotransposon
1626 creates DNA double-strand breaks. *Journal of molecular biology*. 2006;357(5):1383-1393.
1627 doi:10.1016/j.jmb.2006.01.089
- 1628 20. Belgnaoui SM, Gosden RG, Semmes OJ, Haoudi A. Human LINE-1 retrotransposon
1629 induces DNA damage and apoptosis in cancer cells. *Cancer cell international*. 2006;6:13.
1630 doi:10.1186/1475-2867-6-13
- 1631 21. De Cecco M, Criscione SW, Peckham EJ, et al. Genomes of replicatively senescent
1632 cells undergo global epigenetic changes leading to gene silencing and activation of
1633 transposable elements. *Aging Cell*. 2013;12(2):247-256. doi:10.1111/ace1.12047
- 1634 22. Van Meter M, Kashyap M, Rezazadeh S, et al. SIRT6 represses LINE1
1635 retrotransposons by ribosylating KAP1 but this repression fails with stress and age. *Nature*
1636 *communications*. 2014;5:5011. doi:10.1038/ncomms6011
- 1637 23. Sturm Á, Ivics Z, Vellai T. The mechanism of ageing: primary role of transposable
1638 elements in genome disintegration. *Cell Mol Life Sci*. 2015;72(10):1839-1847.
1639 doi:10.1007/s00018-015-1896-0
- 1640 24. Wallace N, Wagstaff BJ, Deininger PL, Roy-Engel AM. LINE-1 ORF1 protein
1641 enhances Alu SINE retrotransposition. *Gene*. 2008;419(1-2):1-6.
1642 doi:10.1016/j.gene.2008.04.007
- 1643 25. Thomas CA, Tejwani L, Trujillo CA, et al. Modeling of TREX1-Dependent
1644 Autoimmune Disease using Human Stem Cells Highlights L1 Accumulation as a Source of
1645 Neuroinflammation. *Cell stem cell*. 2017;21(3):319-331.e8. doi:10.1016/j.stem.2017.07.009
- 1646 26. De Cecco M, Ito T, Petrashen AP, et al. L1 drives IFN in senescent cells and promotes
1647 age-associated inflammation. *Nature*. 2019;566(7742):73-78. doi:10.1038/s41586-018-0784-9
- 1648 27. Luqman-Fatah A, Watanabe Y, Uno K, Ishikawa F, Moran JV, Miyoshi T. The
1649 interferon stimulated gene-encoded protein HELZ2 inhibits human LINE-1 retrotransposition
1650 and LINE-1 RNA-mediated type I interferon induction. *Nat Commun*. 2023;14(1):203.
1651 doi:10.1038/s41467-022-35757-6
- 1652 28. Znaidi R, Massiani-Beaudoin O, Mailly P, Monnet H, Joshi RL, Fuchs J. Nuclear
1653 translocation of LINE-1 encoded ORF1p alters nuclear envelope integrity and disrupts
1654 nucleocytoplasmic transport in neurons. Published online August 14,
1655 2023:2023.08.10.552479. doi:10.1101/2023.08.10.552479
- 1656 29. Gazquez-Gutierrez A, Witteveldt J, R Heras S, Macias S. Sensing of transposable
1657 elements by the antiviral innate immune system. *RNA (New York, NY)*. Published online April
1658 2021. doi:10.1261/rna.078721.121
- 1659 30. Krug L, Chatterjee N, Borges-Monroy R, et al. Retrotransposon activation contributes
1660 to neurodegeneration in a Drosophila TDP-43 model of ALS. *PLoS Genetics*.
1661 2017;13(3):e1006635. doi:10.1371/journal.pgen.1006635
- 1662 31. Casale AM, Liguori F, Ansaloni F, et al. Transposable element activation promotes
1663 neurodegeneration in a Drosophila model of Huntington's disease. *ISCIENCE*.
1664 2022;25(1):103702. doi:10.1016/j.isci.2021.103702
- 1665 32. Takahashi T, Stoiljkovic M, Song E, et al. LINE-1 activation in the cerebellum drives
1666 ataxia. *Neuron*. Published online August 2022:1-19. doi:10.1016/j.neuron.2022.08.011
- 1667 33. Gusel'nikova VV, Korzhevskiy DE. NeuN As a Neuronal Nuclear Antigen and
1668 Neuron Differentiation Marker. *Acta Naturae*. 2015;7(2):42-47. doi:10.32607/20758251-
1669 2015-7-2-42-47
- 1670 34. Cannon JR, Greenamyre JT. NeuN is not a reliable marker of dopamine neurons in rat

- 1671 substantia nigra. *Neuroscience Letters*. 2009;464(1):14-17. doi:10.1016/j.neulet.2009.08.023
1672 35. Sukhorukova EG. Nuclear Protein NeuN in Neurons in the Human Substantia Nigra.
1673 *Neurosci Behav Physi*. 2014;44(5):539-541. doi:10.1007/s11055-014-9947-9
1674 36. Kumar SS, Buckmaster PS. Neuron-specific nuclear antigen NeuN is not detectable in
1675 gerbil substantia nigra pars reticulata. *Brain Res*. 2007;1142:54-60.
1676 doi:10.1016/j.brainres.2007.01.027
1677 37. Keller D, Erö C, Markram H. Cell Densities in the Mouse Brain: A Systematic
1678 Review. *Front Neuroanat*. 2018;12:83. doi:10.3389/fnana.2018.00083
1679 38. Sun W, Cornwell A, Li J, et al. SOX9 Is an Astrocyte-Specific Nuclear Marker in the
1680 Adult Brain Outside the Neurogenic Regions. *J Neurosci*. 2017;37(17):4493-4507.
1681 doi:10.1523/JNEUROSCI.3199-16.2017
1682 39. Yushkova E, Moskalev A. Transposable elements and their role in aging. *Ageing Res*
1683 *Rev*. 2023;86:101881. doi:10.1016/j.arr.2023.101881
1684 40. Dong X, Liao Z, Gritsch D, et al. Enhancers active in dopamine neurons are a primary
1685 link between genetic variation and neuropsychiatric disease. *Nature Neuroscience*. Published
1686 online September 2018:1-19. doi:10.1038/s41593-018-0223-0
1687 41. Teissandier A, Servant N, Barillot E, Bourc'his D. Tools and best practices for
1688 retrotransposon analysis using high-throughput sequencing data. *Mobile DNA*. 2019;10(1):52.
1689 doi:10.1186/s13100-019-0192-1
1690 42. Liu N, Lee CH, Swigut T, et al. Selective silencing of euchromatic L1s revealed by
1691 genome-wide screens for L1 regulators. *Nature*. 2018;553(7687):228-232.
1692 doi:10.1038/nature25179
1693 43. Rekaik H, Blandin de Thé FX, Prochiantz A, Fuchs J, Joshi RL. Dissecting the role of
1694 Engrailed in adult dopaminergic neurons—Insights into Parkinson disease pathogenesis. *FEBS*
1695 *Letters*. 2015;589(24 Pt A):3786-3794. doi:10.1016/j.febslet.2015.10.002
1696 44. Maeda R, Tachibana M. HP1 maintains protein stability of H3K9 methyltransferases
1697 and demethylases. *EMBO reports*. 2022;23(4):e53581. doi:10.15252/embr.202153581
1698 45. Suzuki J, Yamaguchi K, Kajikawa M, et al. Genetic Evidence That the Non-
1699 Homologous End-Joining Repair Pathway Is Involved in LINE Retrotransposition. *PLoS*
1700 *Genetics*. 2009;5(4):e1000461. doi:10.1371/journal.pgen.1000461.g005
1701 46. Goerner-Potvin P, Bourque G. Computational tools to unmask transposable elements.
1702 *Nature Reviews Genetics*. Published online September 2018:1-17. doi:10.1038/s41576-018-
1703 0050-x
1704 47. Schwarz R, Koch P, Wilbrandt J, Hoffmann S. Locus-specific expression analysis of
1705 transposable elements. *Briefings in Bioinformatics*. 2022;23(1):bbab417.
1706 doi:10.1093/bib/bbab417
1707 48. Faulkner GJ. Elevated L1 expression in ataxia telangiectasia likely explained by an
1708 RNA-seq batch effect. *Neuron*. 2023;111(5):610-611. doi:10.1016/j.neuron.2023.02.007
1709 49. Lanciano S, Cristofari G. Measuring and interpreting transposable element expression.
1710 *Nature Reviews Genetics*. 2020;509:7. doi:10.1038/s41576-020-0251-y
1711 50. Martin SL, Li J, Weisz JA. Deletion analysis defines distinct functional domains for
1712 protein-protein and nucleic acid interactions in the ORF1 protein of mouse LINE-1. *J Mol*
1713 *Biol*. 2000;304(1):11-20. doi:10.1006/jmbi.2000.4182
1714 51. Briggs EM, McKerrow W, Mita P, Boeke JD, Logan SK, Fenyó D. RIP-seq reveals
1715 LINE-1 ORF1p association with p-body enriched mRNAs. Published online February 2021:1-
1716 13. doi:10.1186/s13100-021-00233-3
1717 52. Kulpa DA, Moran JV. Ribonucleoprotein particle formation is necessary but not
1718 sufficient for LINE-1 retrotransposition. *Human Molecular Genetics*. 2005;14(21):3237-3248.
1719 doi:10.1093/hmg/ddi354
1720 53. Taylor MS, Altukhov I, Molloy KR, et al. Dissection of affinity captured LINE-1

1721 macromolecular complexes. *eLife*. 2018;7:210-241. doi:10.7554/eLife.30094

1722 54. Kelly MP, Adamowicz W, Bove S, et al. Select 3',5'-cyclic nucleotide

1723 phosphodiesterases exhibit altered expression in the aged rodent brain. *Cell Signal*.

1724 2014;26(2):383-397. doi:10.1016/j.cellsig.2013.10.007

1725 55. Lakics V, Karran EH, Boess FG. Quantitative comparison of phosphodiesterase

1726 mRNA distribution in human brain and peripheral tissues. *Neuropharmacology*.

1727 2010;59(6):367-374. doi:10.1016/j.neuropharm.2010.05.004

1728 56. Mandel S, Gozes I. Activity-dependent neuroprotective protein constitutes a novel

1729 element in the SWI/SNF chromatin remodeling complex. *J Biol Chem*. 2007;282(47):34448-

1730 34456. doi:10.1074/jbc.M704756200

1731 57. Singh A, Modak SB, Chaturvedi MM, Purohit JS. SWI/SNF Chromatin Remodelers:

1732 Structural, Functional and Mechanistic Implications. *Cell Biochem Biophys*. 2023;81(2):167-

1733 187. doi:10.1007/s12013-023-01140-5

1734 58. Goodier JL, Cheung LE, Kazazian HH. Mapping the LINE1 ORF1 protein

1735 interactome reveals associated inhibitors of human retrotransposition. *Nucleic Acids*

1736 *Research*. 2013;41(15):7401-7419. doi:10.1093/nar/gkt512

1737 59. Taylor MS, LaCava J, Mita P, et al. Affinity proteomics reveals human host factors

1738 implicated in discrete stages of LINE-1 retrotransposition. *Cell*. 2013;155(5):1034-1048.

1739 doi:10.1016/j.cell.2013.10.021

1740 60. Moldovan JB, Moran JV. The Zinc-Finger Antiviral Protein ZAP Inhibits LINE and

1741 Alu Retrotransposition. *PLoS Genetics*. 2015;11(5):e1005121.

1742 doi:10.1371/journal.pgen.1005121

1743 61. Vuong LM, Pan S, Donovan PJ. Proteome Profile of Endogenous Retrotransposon-

1744 Associated Complexes in Human Embryonic Stem Cells. *Proteomics*. 2019;19(15):e1900169.

1745 doi:10.1002/pmic.201900169

1746 62. De Luca C, Gupta A, Bortvin A. *Ribonucleoprotein Condensation Driven by*

1747 *Retrotransposon LINE-1 Sustains RNA Integrity and Translation in Mouse Spermatocytes*.

1748 *Molecular Biology*; 2023. doi:10.1101/2023.01.09.523313

1749 63. Ardeljan D, Wang X, Oghbaie M, et al. LINE-1 ORF2p expression is nearly

1750 imperceptible in human cancers. *Mobile DNA*. 2020;11(1):1. doi:10.1186/s13100-019-0191-2

1751 64. Liu Q, Yi D, Ding J, et al. MOV10 recruits DCP2 to decap human LINE-1 RNA by

1752 forming large cytoplasmic granules with phase separation properties. *EMBO reports*.

1753 2023;24(9):e56512. doi:10.15252/embr.202256512

1754 65. McKerrow W, Wang X, Mendez-Dorantes C, et al. LINE-1 expression in cancer

1755 correlates with p53 mutation, copy number alteration, and S phase checkpoint. *Proc Natl*

1756 *Acad Sci U S A*. 2022;119(8):e2115999119. doi:10.1073/pnas.2115999119

1757 66. Rodić N, Sharma R, Sharma R, et al. Long Interspersed Element-1 Protein Expression

1758 Is a Hallmark of Many Human Cancers. *Am J Pathol*. 2014;184(5):1280-1286.

1759 doi:10.1016/j.ajpath.2014.01.007

1760 67. Rybacki K, Xia M, Ahsan MU, Xing J, Wang K. Assessing the Expression of Long

1761 Interspersed Elements (LINEs) via Long-Read Sequencing in Diverse Human Tissues and

1762 Cell Lines. *Genes*. 2023;14(10):1893. doi:10.3390/genes14101893

1763 68. Osburn SC, Mesquita PHC, Neal FK, et al. Long-term voluntary wheel running effects

1764 on markers of long interspersed nuclear element-1 in skeletal muscle, liver, and brain tissue of

1765 female rats. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 2022;323(3):C907-C919.

1766 doi:10.1152/ajpcell.00234.2022

1767 69. Doucet-O'Hare TT, Rodić N, Sharma R, et al. LINE-1 expression and

1768 retrotransposition in Barrett's esophagus and esophageal carcinoma. *Proceedings of the*

1769 *National Academy of Sciences*. 2015;112(35):E4894-E4900. doi:10.1073/pnas.1502474112

1770 70. Zhang Y, Amaral ML, Zhu C, et al. Single-cell epigenome analysis reveals age-

1771 associated decay of heterochromatin domains in excitatory neurons in the mouse brain. *Cell*
1772 *Res.* 2022;32(11):1008-1021. doi:10.1038/s41422-022-00719-6

1773 71. Takahashi F, Zhang C, Hohjoh H, et al. Immune-mediated neurodegenerative trait
1774 provoked by multimodal derepression of long-interspersed nuclear element-1. *iScience.*
1775 2022;25(5):104278. doi:10.1016/j.isci.2022.104278

1776 72. Simon M, Van Meter M, Ablueva J, et al. LINE1 Derepression in Aged Wild-Type
1777 and SIRT6-Deficient Mice Drives Inflammation. *Cell metabolism.* 2019;29(4):871-885.e5.
1778 doi:10.1016/j.cmet.2019.02.014

1779 73. Lopez-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. Hallmarks of aging:
1780 An expanding universe. *Cell.* Published online January 2023:S0092867422013770.
1781 doi:10.1016/j.cell.2022.11.001

1782 74. Mumford PW, Romero MA, Osburn SC, et al. Skeletal muscle LINE-1
1783 retrotransposon activity is upregulated in older versus younger rats. *Am J Physiol Regul Integr*
1784 *Comp Physiol.* 2019;317(3):R397-R406. doi:10.1152/ajpregu.00110.2019

1785 75. Traxler L, Lucciola R, Herdy JR, Jones JR, Mertens J, Gage FH. Neural cell state
1786 shifts and fate loss in ageing and age-related diseases. *Nat Rev Neurol.* 2023;19(7):434-443.
1787 doi:10.1038/s41582-023-00815-0

1788 76. Frost B. Alzheimer's disease and related tauopathies: disorders of disrupted neuronal
1789 identity. *Trends in Neurosciences.* Published online August 2023:S0166223623001662.
1790 doi:10.1016/j.tins.2023.07.006

1791 77. Unger JW. Glial reaction in aging and Alzheimer's disease. *Microsc Res Tech.*
1792 1998;43(1):24-28. doi:10.1002/(SICI)1097-0029(19981001)43:1<24::AID-JEMT4>3.0.CO;2-
1793 P

1794 78. Dai L, LaCava J, Taylor MS, Boeke JD. Expression and detection of LINE-1 ORF-
1795 encoded proteins. *Mobile genetic elements.* 2014;4:e29319. doi:10.4161/mge.29319

1796 79. Whongsiri P, Goering W, Lautwein T, et al. Many Different LINE-1 Retroelements
1797 Are Activated in Bladder Cancer. *International Journal of Molecular Sciences.*
1798 2020;21(24):9433-14. doi:10.3390/ijms21249433

1799 80. Lindtner S, Felber BK, Kjems J. An element in the 3' untranslated region of human
1800 LINE-1 retrotransposon mRNA binds NXF1(TAP) and can function as a nuclear export
1801 element. *RNA.* 2002;8(3):345-356. doi:10.1017/s1355838202027759

1802 81. Naufer MN, Furano AV, Williams MC. Protein-nucleic acid interactions of LINE-1
1803 ORF1p. *Seminars in Cell & Developmental Biology.* 2019;86:140-149.
1804 doi:10.1016/j.semcdb.2018.03.019

1805 82. Garneau NL, Wilusz J, Wilusz CJ. The highways and byways of mRNA decay. *Nat*
1806 *Rev Mol Cell Biol.* 2007;8(2):113-126. doi:10.1038/nrm2104

1807 83. Lykke-Andersen J. Identification of a human decapping complex associated with hUpf
1808 proteins in nonsense-mediated decay. *Mol Cell Biol.* 2002;22(23):8114-8121.
1809 doi:10.1128/MCB.22.23.8114-8121.2002

1810 84. Threlfell S, Sammut S, Menniti FS, Schmidt CJ, West AR. Inhibition of
1811 Phosphodiesterase 10A Increases the Responsiveness of Striatal Projection Neurons to
1812 Cortical Stimulation. *J Pharmacol Exp Ther.* 2009;328(3):785-795.
1813 doi:10.1124/jpet.108.146332

1814 85. Li N, Chen X, Zhu B, et al. Suppression of β -catenin/TCF transcriptional activity and
1815 colon tumor cell growth by dual inhibition of PDE5 and 10. *Oncotarget.* 2015;6(29):27403-
1816 27415. doi:10.18632/oncotarget.4741

1817 86. Pereira GC, Sanchez L, Schaughency PM, et al. Properties of LINE-1 proteins and
1818 repeat element expression in the context of amyotrophic lateral sclerosis. *Mobile DNA.*
1819 2018;9(1):35. doi:10.1186/s13100-018-0138-z

1820 87. Mita P, Wudzinska A, Sun X, et al. LINE-1 protein localization and functional

1821 dynamics during the cell cycle. *eLife*. 2018;7. doi:10.7554/eLife.30058
1822 88. facility I analysis. DAPI_NEUN_ORF1P. Published online June 21, 2023. Accessed
1823 October 20, 2023. https://github.com/orion-cirb/DAPI_NEUN_ORF1P
1824 89. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, et al. Fiji: an open-source platform for
1825 biological-image analysis. *Nature methods*. 2012;9(7):676-682. doi:10.1038/nmeth.2019
1826 90. Linkert M, Rueden CT, Allan C, et al. Metadata matters: access to image data in the
1827 real world. *J Cell Biol*. 2010;189(5):777-782. doi:10.1083/jcb.201004104
1828 91. Ollion J, Cochenne J, Loll F, Escudé C, Boudier T. TANGO: a generic tool for high-
1829 throughput 3D image analysis for studying nuclear organization. *Bioinformatics (Oxford,*
1830 *England)*. 2013;29(14):1840-1841. doi:10.1093/bioinformatics/btt276
1831 92. Stringer C, Wang T, Michaelos M, Pachitariu M. Cellpose: a generalist algorithm for
1832 cellular segmentation. *Nat Methods*. 2021;18(1):100-106. doi:10.1038/s41592-020-01018-x
1833 93. Wang Q, Ding SL, Li Y, et al. The Allen Mouse Brain Common Coordinate
1834 Framework: A 3D Reference Atlas. *Cell*. 2020;181(4):936-953.e20.
1835 doi:10.1016/j.cell.2020.04.007
1836 94. Chiaruttini N, Burri O, Haub P, Guet R, Sordet-Dessimoz J, Seitz A. An Open-Source
1837 Whole Slide Image Registration Workflow at Cellular Precision Using Fiji, QuPath and
1838 Elastix. *Front Comput Sci*. 2022;3:780026. doi:10.3389/fcomp.2021.780026
1839 95. Bankhead P, Loughrey MB, Fernández JA, et al. QuPath: Open source software for
1840 digital pathology image analysis. *Sci Rep*. 2017;7(1):16878. doi:10.1038/s41598-017-17204-5
1841 96. McKinney W. Data Structures for Statistical Computing in Python. In: ; 2010:56-61.
1842 doi:10.25080/Majora-92bf1922-00a
1843 97. Liao Y, Smyth GK, Shi W. The R package Rsubread is easier, faster, cheaper and
1844 better for alignment and quantification of RNA sequencing reads. *Nucleic Acids Res*.
1845 2019;47(8):e47. doi:10.1093/nar/gkz114
1846 98. Valot B, Langella O, Nano E, Zivy M. MassChroQ: a versatile tool for mass
1847 spectrometry quantification. *Proteomics*. 2011;11(17):3572-3577.
1848 doi:10.1002/pmic.201100120
1849 99. Perez-Riverol Y, Bai J, Bandla C, et al. The PRIDE database resources in 2022: a hub
1850 for mass spectrometry-based proteomics evidences. *Nucleic Acids Res*. 2022;50(D1):D543-
1851 D552. doi:10.1093/nar/gkab1038
1852 100. Shannon P, Markiel A, Ozier O, et al. Cytoscape: a software environment for
1853 integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res*. 2003;13(11):2498-
1854 2504. doi:10.1101/gr.1239303
1855

RESULTATS ANNEXES

Resultat Annexe I: Dysregulation of TEs and specific full-length LINE-1 elements and ORF1p expression in Alzheimer's and Parkinson's Disease.

The work presented here is the result of a team effort and will be published completed with ongoing experiments. The bioinformatic analysis has been performed by Nicolas Servant (Curie Institute), Julia Fuchs, Sandra Sinnassamy (who I trained during her M2 internship) and myself. The protein/RNA extraction and specific primers design were performed by Rania Znaidi, Francois Frejacques (M2 student), Sandra and I. The RTqPCR validations were performed by Rania. Western blots and quantifications (cerebellum and cingulate gyrus) were performed by Sandra and myself.

Dysregulation of TEs and specific full-length LINE-1 elements in Alzheimer and Parkinson's Disease.

RNA-seq data from the diseased human brain is rare and most studies omit the analysis of repetitive elements including Transposable Elements (TEs). We re-analyzed a previously published RNA-Seq dataset of post-mortem human ventral midbrain (VM) from individuals affected by Parkinson's Disease (PD, n=14) and controls (n=9) and frontal cortex tissues from individuals with Alzheimer's Disease (n=10) and the respective controls (n=9); (Bennett & Keeney, 2018)), focusing our analysis on the expression of transposable elements. We first analyzed the repeat element expression by performing random read mapping. Then, thanks to Repeat Masker (<https://www.repeatmasker.org/>), a database regrouping TE annotation in the reference genome, we quantified reads belonging to TEs at different levels (Class, Family, Name). These levels are nested, with "class" representing the major groups of TEs and "name" specific groups of TEs inside a specific TE "family". This classification, however, does not allow the quantification of individual TE sequences at a specific genomic locus, called "locus-specific" detection in the following. While TE expression quantification is of major interest, we particularly aimed at quantifying the locus-specific expression of individual, full-length LINE-1 elements as these are, individually and in sum, the source of the LINE-1 derived proteins

ORF1p and ORF2p with potential toxic properties related to neurodegeneration. We therefore used the L1Basev2 database to identify all full-length LINE-1 elements with coding potential (146 in the reference genome, each annotated LINE-1 elements with a Unique Identifier = UID) with the unique read mapping function of STAR (Figure 1A). This strategy has several limitations, stemming from the particularly high sequence similarity of young LINE-1 elements. However, while most reads on a given full-length LINE-1 UID are lost due to unique mapping, the analysis remains possible due to two facts; one, the mappability feature of the UCSC genome browser indicates that each of the 146 reference-genome full-length LINE-1 elements has a umap50 hit count (50bp tracks that mark any region of the genome that is uniquely mappable by at least one *k*-mer) of at least one (see paper presented above), provided that the sequencing depth is sufficient, and second, that we compare two conditions of simultaneously processed RNA-seq data which should have equal profiles of reads mapping on introns or in the intergenic space.

Following the mapping of TEs and attribution to a TE annotation by repeat masker, we defined a threshold of a minimum of 3 reads in at least 9 individuals and pre-filtered the lists accordingly by deleting each annotation below threshold (AD and PD filtering is done independently; *n*= number of individuals in the condition with the lowest number of individual). The effect of this filtering is shown in SupplFigure1A versus Figure 1B (right graph, name level). This allowed the suppression of TEs with high fold changes and low *p*-values but which were governed by a high dispersion explained by only 1 or 2 individuals. The pre-filtering might minimize truly existing inter-individual dispersion and individual profiles of dysregulation but is, to my mind adapted to this kind of analysis.

In the context of AD, we detected multiple differentially expressed transposable elements (DE-TEs; (Figure 1B) and repeat elements. At the “class level”, we identified satellite repeats, which are tandem repeated non-coding sequences organized in long arrays and which are the main constituent of centromeres and telomeres (Thakur et al., 2021), as slightly down-regulated. Interestingly, at the “family level”, it appears that “telo” (=telomere) repeated sequences are up-regulated while “centro” (centromere) repeats are downregulated, which at the “name” level is reflected by the significant upregulation of the Tar1 element, a telomere associated repeat element (W. R. A. Brown et al., 1990). Besides Tar1, several other TEs were significantly dysregulated. Among them, we found HERV-Fc1-int, an intact Human Endogenous Retro Virus

and GSATII, a 216bp long homo sapiens-specific centromeric satellite repeat. Upregulation of HERV-Fc1-int expression in AD (name level) is depicted in Figure 1C. Both have been identified as up-regulated in hepatocellular carcinoma (KARAKÜLAH & YANDIM, 2021). More importantly, an upregulation of Herv-Fc1 had already been identified in two other transcriptome studies in the context of AD ((Grundman et al., 2021): temporal cortex; (Guo et al., 2018): dorsolateral prefrontal cortex). Owing to its coding potential for the *envelope* protein, which has been previously shown to be neurotoxic (Steiner et al., 2022) and represent, together with elements of the Alu family, the only elements independently identified in all three studies looking at TE dysregulation in AD post-mortem brain (SupplFig 2). Altogether, at the name level, more TEs appear to be down- than upregulated (Fig1B, right).

In order to validate these TE expression changes in independent samples, we then performed RTqPCR for LINE-1, SVA, HERV-Fc1 and HERV-K (another family of HERVs of which some elements have retained coding potential for the viral proteins pol, gag or env) starting from pulverized post-mortem frontal cortex tissue obtained from the NeuroCEB biobank (Hopital Pitié-Salpêtrière, Paris, France: 5 controls and 5 AD samples, detailed in table below). We confirmed an increase in SVA and HERV-Fc1 expression in AD frontal cortex (Figure 1D). Of note, HERV-Fc2 was not expressed in frontal cortex tissues. Using primers in the 5'UTR of young LINE-1, we also identified LINE-1 elements as up-regulated in AD (Figure 1D) along with HERV-K gag RNA, but not env and pol.

We then analyzed the expression of full-length LINE-1 elements at the locus level. The Volcano plot in Figure 1E shows the expression difference (\log_2 Fold change) of filtered UIDs (red dots) compared to gene expression differences in the same analysis. We found significant dysregulated UIDs in AD, of which UID-91, UID-133 and UID-80 are separately shown in Figure F. As shown by the volcano plot in Figure 1E, UIDs tend to be rather downregulated. UID-133 (intergenic) and UID-91 (in intron 26 of the gene Col6A6 (collagen type VI alpha 6 chain) both on the + strand) were up-regulated in AD but we detected a significant correlation between UID-91 and Col6A6 expression not allowing us to affirm an autonomous expression of this full-length element (SupplFig1B). UID-80, located in the long non-coding RNA: NR_149040/LOC285638) was down-regulated with no correlation with the expression of the lncRNA indicating that this UID might indeed downregulated and does not merely mirror the expression profile of NR_149040 (SupplFig1C). We designed, where possible, specific primers

targeting unique sequences at the locus level of selected UIDs for independent analysis by RTqPCR. Thanks to this approach we confirmed the upregulation of UID-91 in the frontal cortex of AD individuals (Figure 1G), but we need to examine the expression of Col6A6 to confirm the autonomous, gene-independent expression. We found UID-14 as up-regulated in the RTqPCR approach but did not find a significant difference in expression of the intergenic UID-133. Altogether, although we detected an up-regulation of young LINE-1 by RTqPCR in the second cohort of AD patients, the limited sample number and the technical limitations associated with the analysis of repetitive elements at the transcriptomic levels does not allow any firm conclusions as to whether full-length LINE-1 elements are dysregulated in the context of AD.

The original study did not only contain frontal cortex samples of AD and control individuals but also ventral midbrain tissue of PD patients and the respective controls (Bennett & Keeney, 2018). We thus applied the same bioinformatic analysis pipeline to the PD dataset allowing us to investigate TE expression changes associated with PD but also to compare these TE expression profiles between these two neurodegenerative diseases. We found similar DE-TEs between the two pathologies such as the down-regulation of satellite repeats (class) at centromeres (centr, family level) (Figure 2A). At the “name” level, several TEs were significantly dysregulated in the context of PD (Figure 2A, right). Among them, we identified SVA_A, SVA_F, L1MEa and HERV3-int as up-regulated in PD (Figure 2B). HERV3-int was previously shown to be up-regulated in hepatocellular carcinoma (KARAKÜLAH & YANDIM, 2021) and in lung adenocarcinoma (Arroyo et al., 2019) while L1MEa was downregulated in the latter study. Specific LTR elements (LTR10G, MER76-int and LTR69) and satellite repeats (ALR/Alpha, ACRO1) were downregulated in PD. At the locus level, we identified several dysregulated UIDs as shown in Figure 2C (marked in blue, genes in black). Among these, 3 UIDs were significantly dysregulated: UID-89 (down-regulated), UID-82 and UID-94 (up-regulated). As all three UIDs are located in introns, we correlated the UID expression with the respective gene expression in both cohorts independently (Figure 2D) in order to evaluate whether the expression of the UID could stem from pervasive transcription or non-spliced RNA of the “hosting” gene in which case UID and “hosting” gene expression would be correlated. Except for UID-89 in control individuals (Pearson, $r^2=0.57$, $p=0.02$), no correlation was found between UID expression and the “hosting” gene (Figure 3D, 3E and 3F). Comparing the expression of full-length LINE-1

elements at the locus level in the context of AD and PD, we identified different dysregulated UIDs possibly indicating a disease-specific UID expression dysregulation but could also reflect brain region-specific expression pattern or a brain-region specific genomic context of the different chromosomal loci which harbor a given UID.

While a locus-level approach is of interest, the sum of the expression of all UIDs will likely at least partially determine the expression level of the encoded proteins, ORF1p and ORF2p. We therefore made use of the existence of well characterized ORF1p antibodies (Millipore: MABC1152; abcam: ab245249) to investigate whether protein levels or protein localization were altered in the human brain in the context of PD.

ORF1p expression in *post-mortem* brain tissues of neurologically healthy and PD-affected individuals.

We analyzed ORF1p expression in the cingulate gyrus, a region affected in PD (Vogt, 2019) and in the cerebellum, a non-affected control region of post-mortem samples from individuals with PD (n=5) and corresponding controls (n=5). We cryo-pulverized each brain sample in order to avoid bias due to the underlying heterogeneity expected to occur during tissue processing. We readily detected ORF1p expression in total protein lysates by Western blot in the cerebellum of both, PD and control individuals (Figure 3A) with no changes in ORF1p expression between controls and PD (Figure 3B). We systematically detected two bands corresponding to ORF1p which were both also present in HEK cells, HeLa cells and iPSCs but not in fibroblasts and differentiated LUHMES human dopaminergic neurons where only the upper band is present (data not shown). As the nature of the lower band at approximately 36kD is not known, we quantified the upper and lower band separately (upper band: left; lower band: right, Figure 3B). In the cingulate gyrus, we observed ORF1p expression in PD samples and controls (Figure 3C) with no difference in expression levels for either the upper (Figure 3B, left), nor the lower ORF1p band (Figure, 3D, right). As total expression remained unchanged, we hypothesized that localization of ORF1p might be altered. To address this hypothesis, we used subcellular fractionation to separate the nucleus from the cytoplasm.

Western blots of proteins with a specific subcellular localization (LaminA/C as a marker for the nuclear compartment and EIF4e (Figure 3E) or KPNB1 (Figure 3H) as a marker for the cytoplasm) indicated that the fractionation had successfully separated both compartments. ORF1p was present predominantly in the cytoplasmic compartment, mostly represented by the lower band. Surprisingly, ORF1p was also present in the nuclear fraction, where mainly the upper band was represented, roughly with equal band intensities as the upper band in the cytoplasmic fraction. This general pattern was observed in both, PD and control samples (Figure 3F). We then analyzed ORF1p intensities in the cytoplasmic and nuclear fractions separately using actin as a reference protein as well as the ratio of ORF1p band intensities between cytoplasm and nucleus under the assumption that cytoplasmic and nuclear bands represent the totality of ORF1p in the tissue. In the cerebellum, we found no differences in ORF1p subcellular localization or total quantities per compartment between PD and control samples. In the cingulate gyrus (Figure 3H), there was a significant increase in the cytoplasm to nucleus ratio (upper band) in PD samples suggesting a delocalization of ORF1p from the nucleus to the cytoplasm in PD (Figure 3J) with no change in overall quantities per compartment (Figure 3I). However, we need to verify whether we lose some of the ORF1p during the extraction procedure, which is why we currently perform an extraction protocol which will also allow to extract insoluble proteins.

Further, we are currently doing confocal imaging on human brain slices of the cingulate gyrus from PD and control individuals. This will allow to evaluate the subcellular localization of ORF1p, its expression levels and quantitatively clarify the cell-identify of ORF1p expressing cells.

Materials & Methods

RNA-seq analysis

Dataset was downloaded from Bennet JP and Keeney PM, J All Dis Rep, 2018. It contains 19 frontal cortex RNA-seq samples from Ctrl and AD and 24 ventral midbrain samples from Ctrl and PD (unstranded paired-end 150bp).

RNA-seq are unstranded paired-end 150bp sequenced and was analyzed separately according to the brain region. Sequencing reads have been aligned on the r print(org) reference genome

(`r print(build)`) using the STAR mapper (v2.7.0a) 3 and two different sets of parameters. Genome-wide individual repeats quantification has been performed using unique mapped reads and the following STAR parameters: `--outFilterMultimapNmax 1 --alignEndsType EndToEnd --outFilterMismatchNmax 999 --outFilterMismatchNoverLmax 0.06`. Repeats family quantification has been performed using a random mapping procedure and the following parameters: `--outFilterMultimapNmax 5000 --outSAMmultNmax 1 --alignEndsType EndToEnd --outFilterMismatchNmax 999 --outFilterMismatchNoverLmax 0.06 --outSAMprimaryFlag OneBestScore --outMultimapperOrder Random`. Repeats annotations have been downloaded from the UCSC Table Browser (repeatMasker database: <https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgTables>) and coordinates of L1 full length elements have been downloaded from the L1base database 2 (Penzkofer et al., 2017) selecting L1 full length elements containing two predicted complete open reading frames for ORF1 and ORF2 (UID= Unique Identifier) from the L1base database (<http://l1base.charite.de/l1base.php>) and corrected genomic intervals with the repeat masker annotation of the corresponding genomic locus. Repeats quantification from the aligned data was done using a gtf file (`r print(gencode)`) composed of all genes and all individual repeats elements. This strategy was used to avoid overestimation of repeats elements due to overlaps with expressed genes. For individual repeats quantification of the full length L1 elements (L1base), we therefore used a gtf of all genes and all L1base entries, and run the FeatureCounts tools (Liao Y, Smyth GK and Shi W (2019)). The R package Rsubread is easier, faster, cheaper and better for alignment and quantification of RNA sequencing reads. Nucleic Acids Research, 47(8):e47.) with the following parameters: `-g gene_id -s 0 -p`. In the context of family-based analysis, we used a gtf with all genes and all annotated repeats elements and run FeatureCounts with `-g gene_family -s 0 -p -M`. Before DeSeq2 analysis, we remove all genes and repeats elements with less than 10 reads in a minimum of n individuals, n being the number of individuals in the condition containing the fewest individual. We use the same removals with genes and UID with less than 3 reads in a minimum of n individuals. Finally, we calculated the scaling factors using DeSeq2 on all genes + all repeats elements and all gene + UID according to the quantification method. We calculated the scaling factors on all genes + all repeats elements and all gene =UID, and then apply these SFs to all repeats counts tables.

For UID mappability, we extracted the bed track « main on human:umap50 (genome hg38) from the UCSC genome browser (\approx 7Mio regions) directly into Galaxy (usegalaxy.org) and joined genomic intervals with a minimum overlap of 45bp of this dataset with a dataset containing the annotation of UIDs extracted from L1Basev2 (Penzkofer et al., 2017) corrected in length with repeat masker and completed in-house with information on whether the UID is intra-or intergenic and if intragenic, in which gene (NM_ID, chr, strand, start, end, gene length, number of exons, gene symbol) the fl-LINE-1 is located which resulted in 1266 regions. We then used the “group on data and group by” function in Galaxy and counted the number of overlapping 50kmers with all 146 UIDs (=mappability score). Correlation analysis (non-parametric Spearman) was then done between the mappability score and the normalized read counts.

Human Samples

Cerebellum, frontal cortex and cingulate gyrus human samples from 5 control and 5 Parkinson and 5 Alzheimer diseased individuals were provided by Neuro-CEB biobank and conserved at -80°C . (see table below for detail).

Sample name on WB and RTqPCR	collection_name	pmd	Sexe	date_death	diagnosis_1	Remarque diagnostic1
A1	Alzheimer	60	F	92	Alzheimer Disease	stade Braak VI
A2	Alzheimer	24	F	83	Alzheimer Disease	stade Braak VI
A3	Alzheimer	nd	F	71	Alzheimer Disease	stade Braak VI
A4	Alzheimer	nd	M	62	Alzheimer Disease	stade Braak VI
A5	Alzheimer	47	F	72	Alzheimer Disease	stade Braak VI
P1	Parkinson	35	M	72	Parkinson Disease	Maladie à corps de Lewy stade diffus
P2	Parkinson	36	M	82	Parkinson Disease	Maladie à corps de Lewy stade diffus
P3	Parkinson	nd	F	62	Parkinson Disease	Maladie à corps de Lewy stade diffus
P4	Parkinson	48	F	94	Parkinson Disease	Maladie à corps de Lewy stade diffus
P5	Parkinson		M	83	Parkinson Disease	Maladie à corps de Lewy stade diffus
C1	Control	23	M	78	Control	Alzheimer lesion Braak II
C2	Control	15	M	84	Control	-
C3	Control	10	M	73	Control	Alzheimer lesion Braak II
C4	Control	21	F	92	Control	Alzheimer lesion Braak I
C5	Control	10	M	85	Control	Alzheimer lesion Braak II

Human Samples pulverization and protein extraction

We used Covaris Dry pulverizer Cryoprep. Each sample was disposed in liquid-nitrogen precooled Tissue-tube bag and dry cryo-pulverized with one impact at the maximum level. Pulverized brain sample were then weighed and resuspended in lysis buffer (mg/v) (0.32M sucrose, 5mM CaCl_2 , 3mM $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COOH})_2$, 0.1mM EDTA, 10mM Tris-HCL pH8, 1mM DTT, 0.1% TritonX-100 and Protease Inhibitors), kept on ice 30 min with gently pipetting corp up and down until homogenization. Lysates were split in two tubes, one for total protein extraction and the other for subcellular fractionations. We added 2X RIPA buffer (v/v) to totals fractions and incubated 30 min on ice. We then sonicated samples 15 min 2 times. Supernatants were

collected after centrifugation 30 min at 4°C 14 000 rpm, proteins were quantified and laemmli buffer was added to be used for Western Blot. For subcellular fractionations, we centrifugate 5 min at 4°C 500rpm. We collected supernatants and add laemmli buffer for WB. The remaining pellets corresponding to nuclear fractions were washed once with lysis buffer and then washed twice with extraction buffer (0.32M sucrose, 3mM Mg(CH₃COOH)₂, 10mM Tris-HCL pH8, 1mM DTT, Protease Inhibitors) with centrifugate 5 min at 4°C 500rpm. Nuclear pellets were resuspended in RIPA 1X (50mM Tris-HCl pH8, 150mM NaCl, 0.5% Sodium Deoxycholate, 1% NP-40, 0.1% SDS), kept on ice 30 min and sonicated 15 min 2 times. Supernatants were then collected after centrifugation 30 min at 4°C 14 000 rpm, proteins were quantified and laemmli buffer was added. Then all sample were boiled 10 min at 95°C to be used for Western Blot.

Western-Blot:

We used 1.5mm NuPAGE 4-12% Bis-Tris-Gel (Invitrogen™). Proteins samples were loaded and gel migration was performed with NuPAGE™ MES SDS Running Buffer (Invitrogen™) for 45 minutes at 200mV. Gels were transferred onto a methanol activated PVDF membrane (Immobilon) in a buffer containing: Tris 25 mM, pH=8,3 and Glycine 192 mM, during 1h30 at 400 mA. Membranes were blocked 30 min with 5% milk in TBST (0,2% Tween 20, 150 mM NaCl, 10 mM Tris pH:8). Primary antibodies were diluted in 5% milk in TBST, and membranes were incubated o/n at 4 C°. After 3 x 10 min washing in TBST, membranes were incubated for 1h30 with the respective secondary antibodies diluted at a concentration of 1/2000 in 5% milk TBST. Membranes were washed 3 x 10 min in TBST and were revealed by the LAS-4000 Fujifilm system using Clarity Western ECL Substrate (Bio Rad, #1705060) or Maxi Clarity Western ECL Substrate (Bio Rad, #1705062).

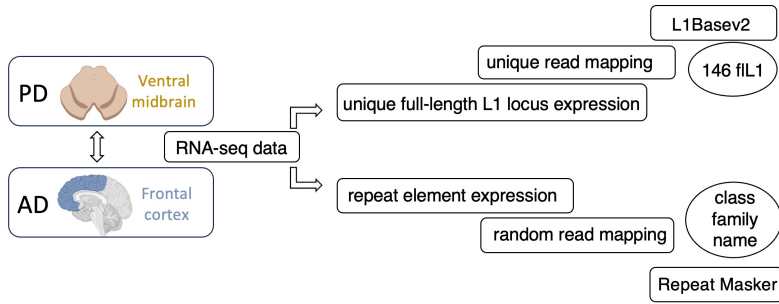
RT-qPCR

Total RNA from 40mg of human pulverized tissue was extracted using RNeasy Plus Micro Kit (Qiagen, 74034) according to the manufacturer's instructions. The removal of contaminating genomic DNA was assessed by using the ezDNase kit (Invitrogen™, 11766051). RNA was reverse transcribed using the All-In-One 5X RT MasterMix kit (Abcam, G592) for first-strand cDNA synthesis. The newly synthesized first-strand cDNA is ready for immediate real-time PCR analysis. Quantitative PCR reactions were carried out in duplicates with SsoAdvanced Universal

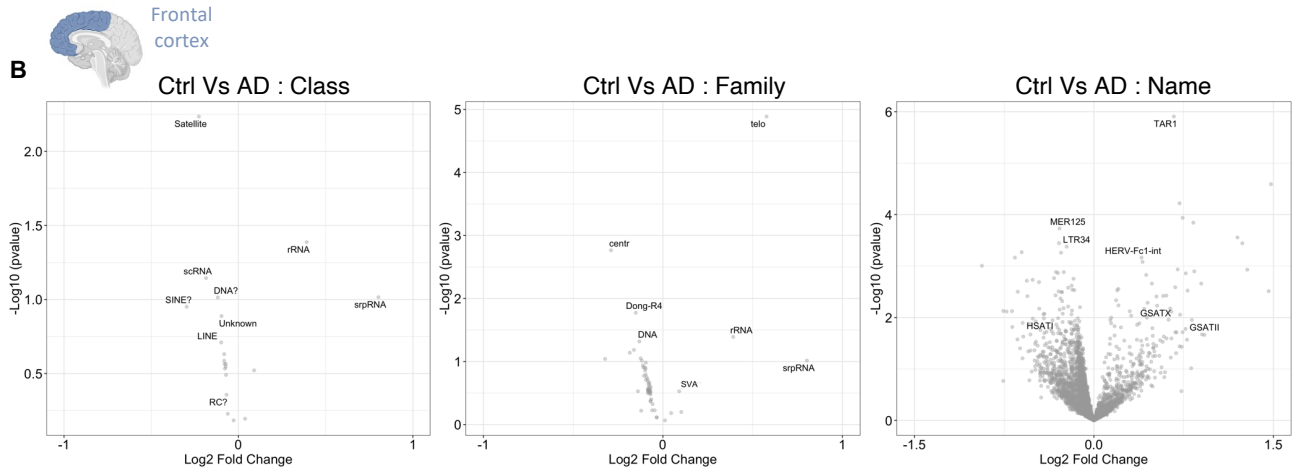
SYBR® Green Supermix (Biorad, 1725274) on a CFX Opus 384 (Bio-Rad, #12011452) with the following program: enzyme activation at 95°C 2 min, primer denaturation at 95°C, annealing at 57°C and primer extension at 72°C for 42 cycles.

Figure 1

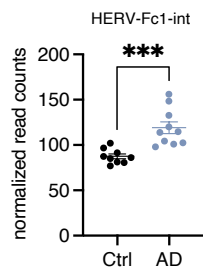
A



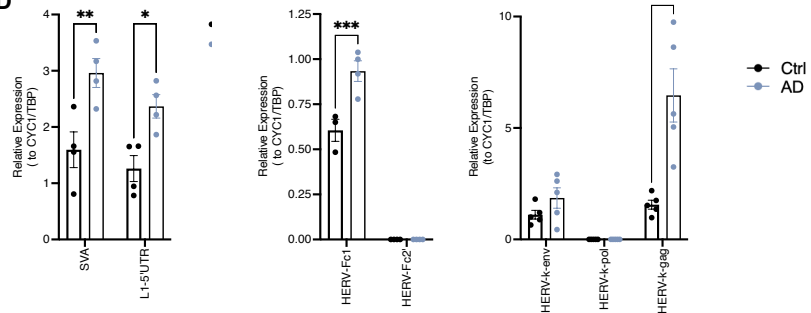
B



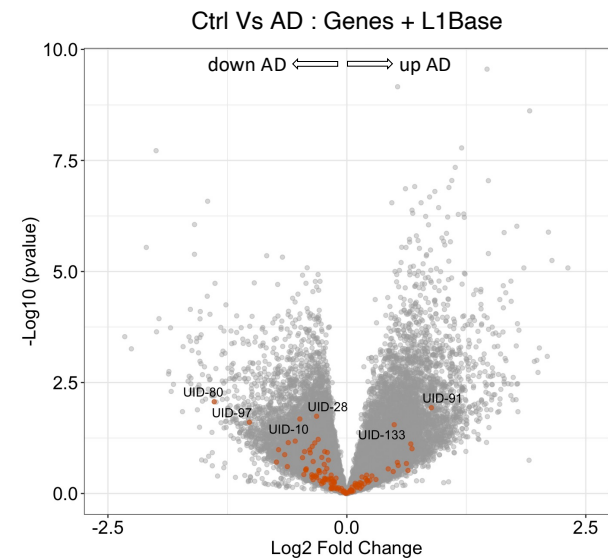
C



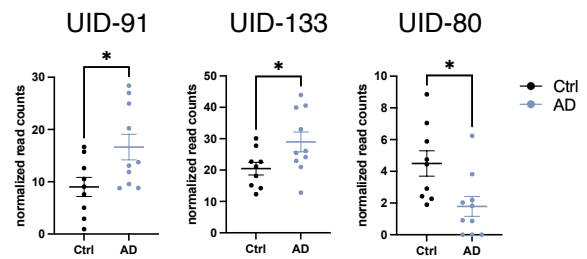
D



E



F



G

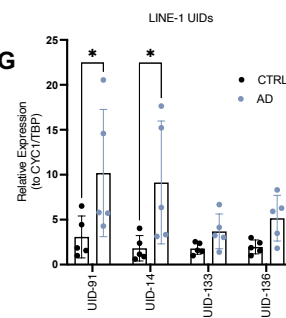


Figure 1: Differentially Expressed Transposable Elements (DE-TEs) and full-length LINE-1 at locus level in Alzheimer’s Disease (AD)

(A) Schematic representation of the RNA-sequencing analysis method to allow detection and quantification of transposable Elements and full-length LINE-1 at the “locus level”, that is a specific genomic locus containing a specific full-length LINE-1 element with coding potential according to the L1Basev2 (Penzkofer et al., 2017). Repeat masker provides a three-level hierarchical annotation (class, family and name) to which regroups TEs at different scales. As even the most specific level (“name”) regroups individual TEs, we used random mapping of reads identified as multimapping. In order to map reads with “locus-level” precision, we used a different strategy consisting of mapping only unique reads to the L1basev2 annotation which allows to identify 146 full-length LINE-1 elements with intact open reading frames for ORF1p and ORF2p.

(B) Vulcano plot showing differentially-expressed TEs (DE-TEs) in Alzheimer’s disease versus control individuals in the human post-mortem frontal cortex. “Class” level is represented on the left side, “family” level in the middle and “name” level on the right side. Up-regulated TEs in AD are represented on the right side of the Vulcano plot, downregulated on the left side.

(C) SVA and HERV-Fc1-int are upregulated in the context of AD. Example of DE-TEs upregulated in AD. SVA (“family” level) is represented on the left side and HERV-Fc1-int (“name” level) on the right). *** $p < 0.001$, unpaired, two-sided t-test.

(D) SVA, LINE-1 and HERV are up-regulated in AD (human post-mortem frontal cortex; each group with $n=5$). CYC1 and TBP were defined as the most stable housekeeping genes and used to normalize TE expression levels. SVA and LINE-1 5’UTR (left), HERV-Fc1 and Fc2 (HERV-H family, middle) and HERV-K gag, env and pol (right) expression in Ctrl and AD are represented (left). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$, 2-way ANOVA followed by Sidaks multiple comparison pair-wise comparison test.

(E) Vulcano plot showing unique full-length LINE-1 elements (UID1-146) in AD frontal cortex (red dots). Genes are represented in grey for comparison.

(F) Example of unique full-length LINE-1 elements found as dysregulated in Alzheimer’s. UID-91 (left) and UID-133 (middle) are up-regulated and UID-80 (right) is down-regulated in AD. * $p < 0.05$, unpaired two-sided t-test.

(G) Expression of selected UIDs in frontal cortex tissues of AD and controls. RTqPCR with specific primers on selected UIDs was performed on 5 AD and 5 control frontal cortex samples. CYC1 and TBP were used as reference genes.

Figure 2: Differentially Expressed Transposable Elements (DE-TEs) and full-length LINE-1 elements in PD

(A) Volcano plot showing DE-TEs in PD versus control individuals in the post-mortem human ventral midbrain. “Class” level is represented on the left side, “family” level in the middle and “name” level on the right side. Up-regulated TE in PD are represented on the right side of the Volcano plot and downregulated on the left side according to their log₂ fold change.

(B) SVA_A, SVA_F, L1MEa and HERV3-int are upregulated in the context of PD at the “name” level. *p<0.05; ** p<0.01, unpaired two-sided t-test.


(C) Volcano plot showing dysregulated unique full-length LINE-1 elements (UID1-146) in PD versus control individuals in the ventral midbrain. UID are represented in blue and genes are represented in grey to allow for direct comparison of expression levels.

(D) Expression of UID-89 in PD. Normalized UID-89 read counts in PD vs controls (left) and correlation plot showing UID-89 normalized read counts (y-axis) and normalized “hosting” gene expression (MAGI1, x-axis) in controls and PD (right). *p<0.05, unpaired two-sided t-test. Correlation was calculated using Pearson (PD: $r^2=0.1$, $p=0.25$; Ctrl: $r^2=0.57$, $p=0.02$).

(E) UID-82 is up-regulated in PD. Normalized UID-82 expression in PD versus control (left) and correlation plot showing UID-82 (y-axis) and normalized “hosting” gene expression (PP2R2B, x-axis) in controls and PD (right). *p<0.05, unpaired two-sided t-test. Correlation was calculated using Pearson (PD: $r^2=0.18$, $p=0.12$; Ctrl: $r^2=0.03$, $p=0.65$).

(F) UID-94 is up-regulated in PD. Normalized UID-94 expression in PD versus controls (left) and correlation plot showing UID-94 (y-axis) and normalized “hosting” gene expression (STAG1, x-axis) in controls and PD (right). *p<0.05, unpaired two-sided t-test. Correlation was calculated using Pearson (PD: $r^2=0.003$, $p=0.84$; Ctrl: $r^2=0.12$, $p=0.36$).

Figure 2

Parkinson's Disease (PD)  Ventral midbrain

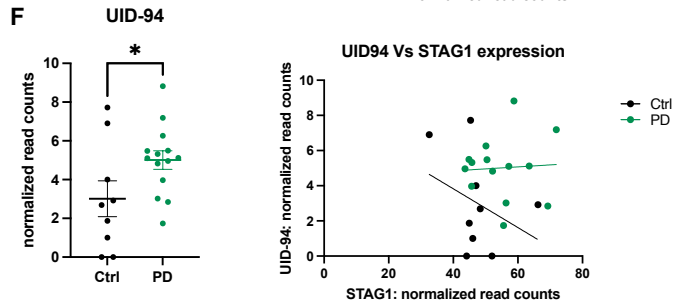
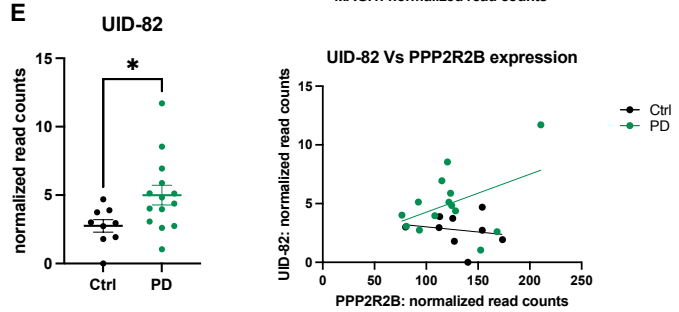
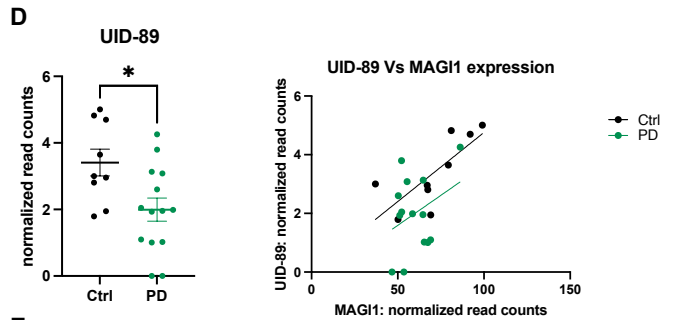
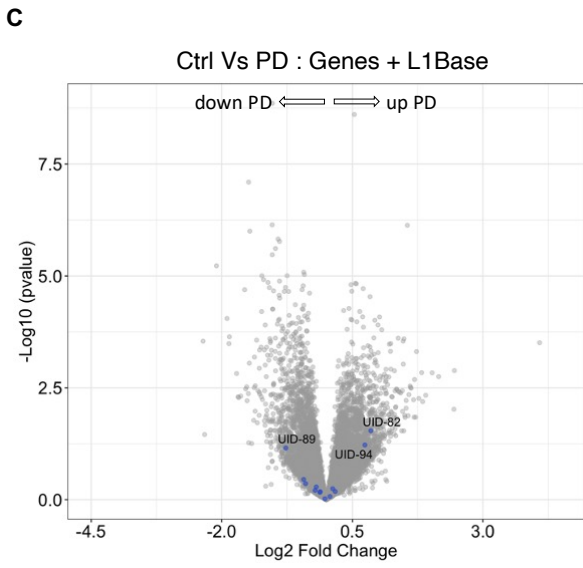
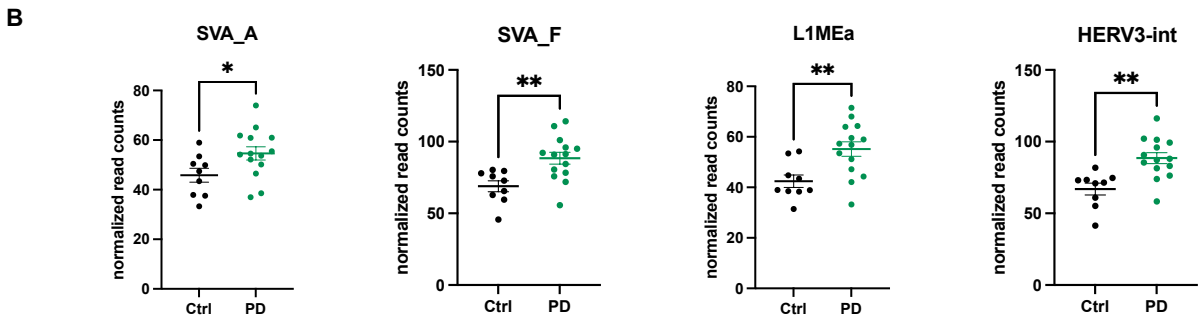
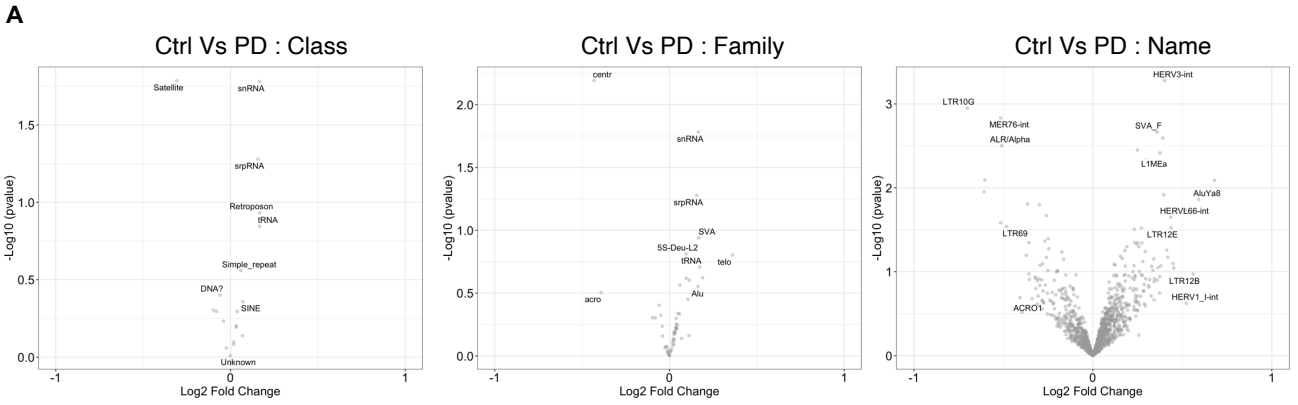


Figure 3: ORF1p expression in cerebellum and cingulate gyrus *post-mortem* brain in neurologically healthy individuals and individuals with PD.

(A) WB showing ORF1p (top) and actin (bottom) expression in 5 individuals with PD and 5 control individuals in the cerebellum. (C1= control individual 1; P1= PD individual 1)

(B) Quantification of ORF1p expression in the cerebellum shown in Figure 3A normalized to actin. Upper (left) and lower (right) bands were quantified. (ns) non-significant $p>0.05$, unpaired two-sided t-test.

(C) WB showing ORF1p (top) and actin (bottom) expression in 5 individuals with PD and 5 control individuals in the cingulate gyrus. (C1= control individual 1; P1= PD individual 1)

(D) Quantification of ORF1p expression in the cingulate gyrus shown in Figure 3C normalized to actin. Upper (left) and lower (right) bands were quantified. (ns) non-significant $p>0.05$, unpaired two-sided t-test.

(E) Representative WB showing ORF1p expression in the cytoplasmic and nuclear fraction of an individual with PD and a control in the cerebellum (C1= control individual 1; P1= Parkinson's individual 1) along markers for subcellular fractionation (EIF4e: cytoplasmic fraction; Lamin A/C nuclear fraction). Actin (bottom) was used as a reference protein for quantifications shown in F.

(F) Quantification of ORF1p expression in the cytoplasmic (left) and nuclear (right) fraction of 5 individuals with PD and 5 control individuals in the cerebellum. The upper band (top) and lower band (bottom) were quantified. (ns) non-significant $p>0.05$, unpaired two-sided t-test. This experiment was repeated twice with similar results.

(G) ORF1p cytoplasmic to nuclear ratio in 5 individuals with PD and 5 controls in the cerebellum. For a same individual and side-by-side, the band intensity of ORF1p in the cytoplasmic fraction was compared to the nuclear fraction under the assumption that the sum of these fractions represents the totality of ORF1p present in the tissue. Upper (top) and lower (bottom) bands were quantified. (ns) non-significant $p>0.05$, unpaired two-sided t-test.

(H) Representative WB showing ORF1p expression in the cytoplasmic and nuclear fraction of an individual with PD and a control in the cingulate gyrus (C1= control individual 1; P1= PD individual 1). Representative WB showing the cytoplasmic protein KPNB1 as being present in the cytoplasmic fraction and the nuclear protein LaminB1 in the nuclear fraction. Actin (bottom) was used as an internal control for quantifications shown in I.

(I) Quantification of ORF1p expression in the cytoplasmic (left) and nuclear (right) fraction of 5 individuals with PD and 5 controls in the cingulate gyrus. Upper bands (top) and lower bands (bottom) were quantified. (ns) non-significant $p > 0.05$, unpaired two-sided t-test. This experiment was repeated twice with similar results.

(J) ORF1p cytoplasmic to nuclear ratio in 5 individuals with PD and 5 controls in the cingulate gyrus. For a same individual and side-by-side, the band intensity of ORF1p in the cytoplasmic fraction was compared to the nuclear fraction under the assumption that the sum of these fractions represents the totality of ORF1p present in the tissue. Upper (top) and lower (bottom) bands were quantified. (ns) non-significant $p > 0.05$, ** $p < 0.01$, unpaired two-sided t-test.

SupplFigure 1:

(A) Importance of pre-filtering data. Vulcano-plot showing DE-TEs in AD versus controls in the frontal cortex at the “name” level of the repeat masker annotation, without pre-filtering.

(B) Correlation plot showing the normalized expression of UID-91 and its “hosting” gene Col6A6 in controls and in AD. Correlations were calculated using Pearson (AD: $r^2 = 0.63$, $p = 0.005$; Ctrl: $r^2 = 0.37$, $p = 0.08$)

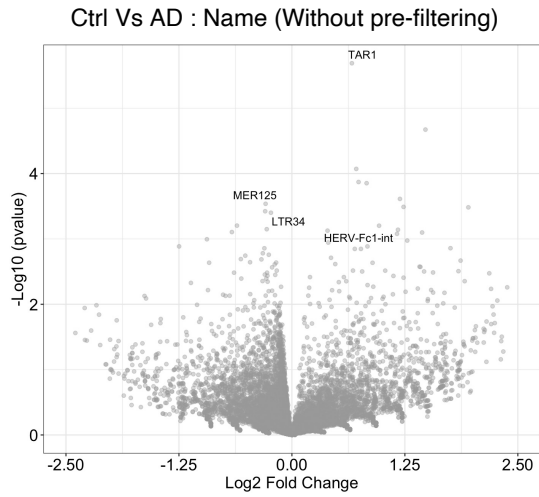
(C) Correlation plot showing the normalized expression of UID-80 and its “hosting” lncRNA (ENSG00000249476) in controls and in AD. Correlations were calculated using Pearson (AD: $r^2 = 0.25$, $p = 0.14$; Ctrl: $r^2 = 0.09$, $p = 0.44$)

SupplFigure 2:

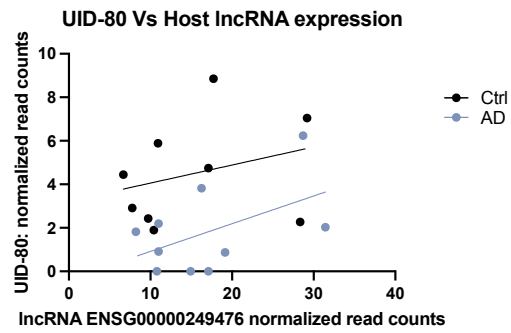
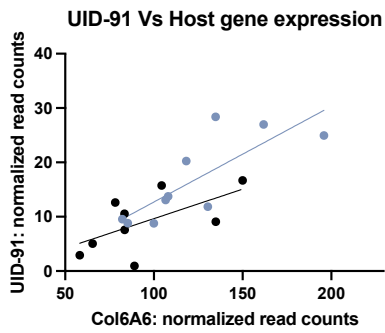
Venn diagram of common dysregulated TEs mainly in AD between 3 independent studies. (Grundman et al, 2021; Guo et al, 2018 and our study presented here)

SupplFigure 1

A

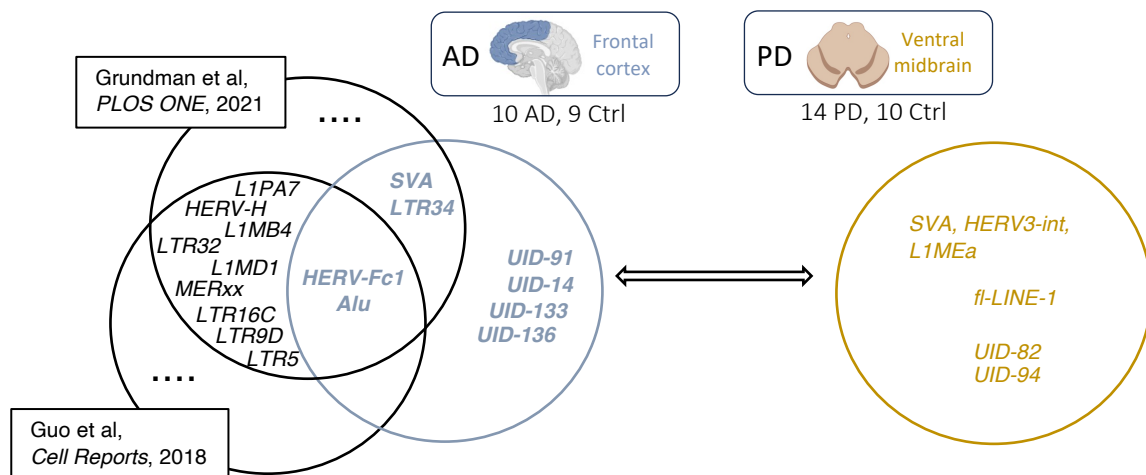


B



SupplFigure 2

A



Résultat Annexe II: Identifying the dynamic interactome of ORF1p at steady-state and under stress in human dopaminergic neurons in vitro

The results presented below are part of a research project currently in preparation for publication. While here, I present the data obtained in human dopaminergic neurons, our group is currently working to complete this analysis with data of ORF1p interacting proteins in mouse dopaminergic neurons (MN9D) by LC-MS/MS. This project is a collaborative project in our group: the cell culture of LUHMES cells was performed by Rania Znaidi (another PhD student in the lab) and Olivia Beaudoin (a research engineer in the lab), the co-IP for mass spectrometry and co-IPs followed by Western blot were done by Olivia Beaudoin, the co-IPs in LUHMES and *post-mortem* human brain sample were done by Sandra Sinnassamy (a 1st year PhD student in the lab, who has also set up the culture of MN9D mouse dopaminergic neurons) and myself (co-IP LUHMES for mass spectrometry and bioinformatic analysis of the data). LC-MS/MS was carried out by the proteomics platform at the Curie Institut: Bérangère Lombard carried out the experimental work and Damarys Loew supervised the experimental work and helped with data analysis.

Note that this work and analysis were performed before a recent publication from this year regarding ORF1p interactors in mouse spermatocytes (De Luca et al., 2023). For this reason, the protein partners identified in this study are not included in the formal analysis but are mentioned in the text.

Participants:

Tom Bonnifet¹, Sandra Sinnassamy¹, Rania Znaidi¹, Olivia Massiani Beaudoin¹, Bérangère Lombard², Damarys Loew², Rajiv L Joshi¹ & Julia Fuchs¹

¹ Center for Interdisciplinary Research in Biology (CIRB),

² Institut Curie, PSL Research University, Centre de Recherche, Laboratoire de Spectrométrie de Masse Protéomique, 26 rue d'Ulm, Paris 75248 Cedex 05, France

Aim of this study:

The overall goal is to identify protein partners of the LINE-1 encoded protein ORF1p in a specific neuronal population, namely dopaminergic neurons *in vitro*, to compare the protein interactome of ORF1p in this specific neuronal population in-between species (human and mouse) and to identify the dynamics of ORF1p protein interactions in conditions of cell stress.

Results:

With the aim to identify endogenous protein partners of ORF1p in a specific neuronal population with endogenous expression of ORF1p at steady-state, we used the LUHMES (Lund human mesencephalic) cell line which can be differentiated into mature post-mitotic neurons with a dopaminergic phenotype (Znaidi et al., 2023). The expression of ORF1p at steady state can be experimentally increased by the addition of an acute oxidative stress using arsenite (Figure 1A). In order to study the dynamic interactome of ORF1p at steady-state and under stress in human dopaminergic neurons, we immunoprecipitated endogenous ORF1p or an isotype IgG control (Figure1B) followed by Liquid Chromatography coupled to tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS) in both conditions in parallel (n=5 per conditions) allowing us to quantitatively analyze ORF1p protein partners in either condition and in comparison.

Quantitative LC-MS/MS identified a total of 378 potential interactors of ORF1p (Fig1C and 1D) with 254 interacting proteins exclusively found in the steady-state condition (Figure 1D, green and yellow), with 109 proteins enriched (Fig1C, middle) and 124 proteins exclusively found in the stress condition (Fig1C, right) and as illustrated in Figure 1D. In order to understand the composition and interrelated functions of these proteins, we performed Gene Ontology Slim analysis (Figure 1E) which revealed the significant enrichment of similar GO terms between the stressed and steady-state condition. This indicates that endogenous ORF1p interacts with proteins belonging to similar protein categories following a short-term exposure to low-dose arsenite (1hr, 50 μ M) in human neurons. Shared protein categories included messenger RNA metabolism-related categories (molecular function: mRNA binding; biological process: mRNA processing) and ribosomal biogenesis related categories (molecular function: rRNA binding, structural constituent of ribosome); cellular component: ribosome; biological process:

ribosome biogenesis, translation) as well as ribonucleoprotein complex assembly (biological process). Indeed, LC-MS/MS revealed that ORF1p interacted with numerous RBPs, implicated in mRNA processing (SRSF2, SRSF4) and ribosome biogenesis (RPLs proteins), representing 55.3% of all identified proteins. Furthermore, these RBPs share known physical interactions (Figure 2B, black donuts) and clustered into two specific categories, mRNA splicing (illustrated by the GO category “mRNA processing” and “ribosomal proteins”) (Figure 2B). As ORF1p is also an RBP (Naufer et al., 2019; Rajagopalan et al., 2017), this was somewhat expected. We also found an enrichment of proteins with “helicase activity” and “DNA binding” characteristics in both, stress and steady-state conditions. Cellular component GO analysis revealed, that proteins associated to the nucleus were enriched among ORF1p interactors (GO terms: nucleus, nucleoplasm, nucleolus), particularly in the stress condition. Indeed, according to the compartment database (<https://compartments.jensenlab.org/>), around 40% of the interactome has a 5/5 ratio for the nuclear compartment, and these nuclear proteins form the core of the physical interaction network (SupplFigure 1), partially explained by the RBPs interacting with ORF1p. Other intriguing GO terms were shared between the steady-state and stress condition, namely cytoskeleton organization, nucleocytoplasmic transport, catabolic process and cell death and cell cycle. Using manual curation, we also noticed that ORF1p interacted with several proteins implicated in the editing or reading of m6A-modified RNAs (Lesbirel et al., 2018) such as RBM15, KHDRBS1, SLTM, SRSF1, YTHDC1 (in both conditions, but enriched in stress) and ZC3H13 (only steady-state). This is of interest, as it has been shown that LINE-1 RNA can be m6A modified, and numerous RBPs binding to m6A modified LINE-1 RNA were present among ORF1p interactors (Xiong et al., 2021).

However, some GO categories were enriched in either condition. At steady-state, cytoskeleton protein binding, ATPase activity and protein binding, bridging (molecular function) as well as anatomical structure development, cell junction organization and mitotic cell cycle) were exclusively enriched, while arsenite treatment specifically revealed ORF1p protein partners related to “transcription factor binding”, “nuclear envelope” and “DNA metabolic process”, indicating a more pronounced nuclear activity including at the nuclear envelope (Figure 1). These findings were then confirmed by Co-IP experiments and the work of Rania Znaidi (Znaidi et al., 2023) indicating the targeting of the nuclear envelope by ORF1p upon stress and a specific and direct binding to nuclear envelope proteins (Nup153) and

nuclear lamina (LaminB1) potentially mediated by an importin-beta involving protein import. Of note, all three proteins, among others related to the latter, were present in the LC-MS/MS analysis with laminB1 and KPNB1 exclusively present in the stress conditions while the association of ORF1p with NUP153 was detected in both.

ORF1p bound to many RBPs at steady-state and upon stress. Interestingly, however, a more detailed analysis of RBP proteins in both conditions using STRING analysis revealed that RBPs population interacting with OFR1p were modified under stress (Figure 2A) suggesting a stress-dependent change in interaction. However, this shift did not dramatically change the underlying subcategories of RBP protein partners in terms of their function in ribosome metabolism (blue cluster) or mRNA splicing (beige cluster; Figure 2B). In addition, while GO terms related to ribosomal constituents and the spliceosome were found in both conditions as the most significant GO terms (Figure 1E: “Structural constituent of ribosome”, “Ribosome” “Ribosome biogenesis”, “mRNA processing”, “protein-containing complex”) and represented the cores of the interactome network (Figure 2B), many proteins within these categories were recruited by ORF1p upon stress (SupplFigure 2A and 2B).

Next, we compared the interactors of endogenous ORF1p in human neurons with previously published exogenous ORF1p interactors stemming from mass spectrometry data from human cancerous cell lines (Dai et al., 2012; Goodier et al., 2007, 2013; Moldovan & Moran, 2015; Peddigari et al., 2013; M. S. Taylor et al., 2013, 2018; Vuong et al., 2019). More than 15% of our proteins (15,6%) have been identified as ORF1p interactors in these studies representing a significant overlap as identified by an overrepresentation test (representation factor 7.4; $p < 1.7e-34$; Figure 3A). This underscores the robustness of our findings and suggests that at least a fraction of ORF1p interactors is conserved between cancerous cells and human dopaminergic neurons while most interactors might be cell-type specific (albeit technical differences or an increased sensitivity of the LC-MS/MS as a reason for the identification of novel interactors cannot be excluded). *Figure 3B* illustrates the close interactions among ORF1p protein partners which form a complex cluster sharing rich physical interaction between them. Of note, overrepresentation analysis revealed that ORF1p interacting proteins are enriched for the category “nucleus” (enrichment factor 1.74, $p = 4.09e-21$), an overrepresentation which increased with stress (enrichment factor 2.04, $p = 1.56e-35$) (Figure 1E). Several protein partners also already known as partners and regulators of ORF1p were

present in our screen (i.e., PABPC4, PABPC1, SRSF1 DHX9 and PARP1; (Liu et al, 2018); orange in Figure 3B). Eleven novel ORF1p interacting proteins (ALDOA, XRCC6, PRRC2A, SAFB, DDX42, MORC2, SLTM, CBX3, CBX5, FANCD2, SMARCA5) had been previously identified as LINE-1 regulators (blue in Figure 3B). Among were both LINE-1 silencers (SAFB, a DNA binding protein with specificity for scaffold attachment region DNA (N. Liu et al., 2018) and MORC2, essential for HUSH-mediated epigenetic silencing (Tunbak et al., 2020) and LINE-1 activators, like XRCC6, an ATP-dependent helicase involved in DNA repair. As known regulators (N. Liu et al., 2018) and stress-specific interactors emerged the two heterochromatin binding proteins, heterochromatin protein 1 alpha (HP1 α or CBX5) and gamma (HP1 γ or CBX3) as well as FANCD2 involved in chromosomal stability/DNA repair and SMARCA5 a chromatin remodeling enzyme. Among potential novel and cell-type specific interactors of ORF1p, shared physical interactions remain, and these novel interactors are implicated in RNA binding (GO:0003723, FDR: 1.57e-72), Anterograde axonal protein transport (GO:0099641, FDR:0.004) and chromatin binding (GO:0003682, FDR:0.03).

We next followed up on the observation that arsenite exposure recruited proteins belonging to the “Transcription factor”, “Nuclear envelope” and “DNA metabolic process” related GO terms to ORF1p with two proteins belonging to all three categories (PARP1 and RAN) and six proteins belonging to at least two categories (CBX5, KPNB1, HMGB1, RUVBL2, DHX9, DMAP1) (Figure 4A). STRING analysis of the interaction network of proteins of these three categories revealed a tight network of interaction (line thickness= strength of data support, medium confidence 0.4, basis interaction sources) with the exception of two proteins (TREX2 and CREG1, Figure 4B) indicating an entire nuclear network of proteins which is susceptible to interact with ORF1p and which is, besides the general GO terms cited above, enriched in more specific GO terms like “Viral penetration into host nucleus” (GO:0075732; FDR:0.0081), “Positive regulation of DNA topoisomerase (ATP-hydrolyzing) activity” (GO:2000373, FDR:0.0108) and “C5-methylcytidine containing RNA binding” (GO:0062153, FDR:0.0087). Of the proteins related to the category “nuclear envelope”, such as Lamin B1, KPNB1, KPNB3, CBX5 (=HP1 α), LEMD2, RAN and NUP133, 10 out of 17 proteins were present only in the stress condition. Out of 17 proteins belonging to the category “DNA metabolic process”, 11 were stress-specific as were 8/14 proteins related to “TF binding”. Co-immunoprecipitation followed

by Western blot on steady-state or arsenite-stressed human dopaminergic neurons confirmed the stress-induced interaction of ORF1p with LaminB1, KPNB1 and HP1 α (Figure 4C). In order to test whether some of these interactions were also present in the human brain, we first immunoprecipitated ORF1p from brain lysates of the cingulate gyrus of a PD patient (Figure 4D, left) confirming the specificity of the antibody used and the expression of ORF1p in the cingulate gyrus. Using co-immunoprecipitation, we then confirmed the interaction of ORF1p with LaminB1, KPNB1 and DDX5, an example of a stress-specific protein of the category “TF binding” (Figure 4D, right). This indicated that several ORF1p protein partners belong to a nuclear network of known interacting proteins associated with several important cellular functions including nucleo-cytoplasmic transport and chromatin regulation and that these partner proteins are protein partners of ORF1p *in vitro* and *in vivo* in the post-mortem human brain.

We then wondered which of the identified ORF1p interacting proteins in human dopaminergic neurons in culture overlapped with proteins identified in the mouse brain (whole brain lysate, adult Swiss/OF1 mice, n=5, LC-MS/MS, *manuscript in preparation*). We found a significantly overrepresented fraction of 24 overlapping proteins (representation factor 2.7; $p < 1.5e-5$; SupplFigure 3A) of which most showed functional and physical evidence of interaction among each other in STRING protein network analysis (SupplFig3B). This highlights a conservation of ORF1p interactors between these two species, probably intrinsically linked to L1 life-cycle. The majority of these mouse/human ORF1p partners are RBPs sharing physical interactions and functional association (Suppl Figure 3B and 3C). Functionally, this network reflected earlier findings of interacting proteins belonging to GO terms like “ribonucleoprotein granule/complex”, “RNA binding” and “mRNA splicing” indicating a conserved interaction network with proteins involved in mRNA metabolism.

Materials & Methods

Immunoprecipitation and Western Blot

For immunoprecipitation, we used ORF1p (Millipore, MABC 1152) and IgG mouse (Thermofisher, #31903) antibodies. The antibodies were coupled to magnetic beads using the

Dynabeads® Antibody Coupling Kit (Invitrogen, 14311D) according to the manufacturer's recommendations. We used 8 µg of antibody for 1 mg of beads. The appropriate volume of buffer was added to the coupled beads to achieve a final concentration of 10 mg/ml. LUHMES cells were plated at a density of 20x10⁶ cells in 2 T75 flasks and grown in differentiation medium for 5 days. One flask was treated with 50 µM Arsenite for 1 h. Control and treated cells were washed with 1X PBS and harvested using 1 ml of lysis buffer (10 mM Tris HCl pH 8, 150 mM NaCl, NP40 0.5% v/v, protease inhibitor 10 µl/ml) per T75 flask. Samples were sonicated for 15 min at 4°C, then centrifuged at 1200 rpm for 15 min at 4°C. The supernatants obtained were transferred to a new microcentrifuge tube and then separated into 3 tubes. One tube containing 50 µl of supernatant (1/10th of the test samples) was stored at 4°C until the samples were analyzed. The other two tubes of the remaining supernatants were used for IP. Mouse IgG beads were added to one tube and ORF1p antibody beads to another. Each of these two tubes was then diluted to 1.5 ml with buffer (10 mM Tris HCl pH8, 150 mM NaCl, 10 µl/ml protease inhibitor) to dilute the NP40. The samples were then incubated overnight on a wheel at 4°C. Samples were then washed 3 times with 1 ml buffer (10 mM Tris HCl pH 8, 150 mM NaCl, 10 µl/ml protease inhibitor) using a magnet and then resuspended in the same buffer. The samples were boiled in Laemmli buffer (95°C, 10 min) and 20 µl of each sample were deposited on a 4-12% Nupage gel (Invitrogen, NP0336). For human brain immunoprecipitation, we used pulverized powder as explained previously following the same procedure (Materials and Methods Resultats Annexe I). Migration was carried out in MES SDS running buffer (Invitrogen, NP0002) for 45 min at 200 V. The gel was then transferred onto a PVDF membrane activated with methanol (Sigma, Immobilon-P 2659478) in glycine buffer (25 mM Tris, 200 mM glycine pH 8,3) for 1 h at 400 mA. The membranes were revealed using the primary antibodies anti-ORF1p rabbit 1:500 (Abcam, ab245249), anti-lamin B1 (Abcam, ab16048), anti-KPNB1 (Cell Signaling, #51186), anti-DDX5 (GeneTex, 54031) or anti-HP1 (CellSignalling, 2616S), the secondary anti-rabbit HRP (Ozyme, 7074S) with the Maxi Clarity Western ECL Substrate kit (BioRad, #1705062).

Mass Spectrometry

Mass spectrometry analyses were performed at Institut Curie. We performed on-beads digestion with 0.6 µg of trypsin/LysC (Promega) for 1 hour in 100 µL of 25 mM NH₄HCO₃. Samples were then loaded onto a homemade C18 StageTips for desalting. Peptides were eluted

using 40/60 MeCN/H₂O + 0.1% formic acid and vacuum concentrated to dryness. Chromatography was performed with an RSLCnano system (Ultimate 3000, Thermo Scientific) coupled online to a Q Exactive HF-X with a Nanospray Flex ion source (Thermo Scientific). Peptides were first trapped on a C18 column (75 µm inner diameter × 2 cm; nanoViper Acclaim PepMapTM 100, Thermo Scientific) with buffer A (2/98 MeCN/H₂O in 0.1% formic acid) at a flow rate of 2.5 µL/min over 4 min. Separation was then performed on a 50 cm x 75 µm C18 column (nanoViper Acclaim PepMapTM RSLC, 2 µm, 100Å, Thermo Scientific) regulated to a temperature of 50°C with a linear gradient of 2% to 30% buffer B (100% MeCN in 0.1% formic acid) at a flow rate of 300 nL/min over 91 min. MS full scans were performed in the ultrahigh-field Orbitrap mass analyzer in ranges m/z 375–1500 with a resolution of 120 000 at m/z 200. The top 20 intense ions were subjected to Orbitrap for further fragmentation via high energy collision dissociation (HCD) activation and a resolution of 15 000 with the intensity threshold kept at 1.3×10^5 . We selected ions with charge state from 2+ to 6+ for screening. Normalized collision energy (NCE) was set at 27 and the dynamic exclusion of 40s. For identification, the data were searched against the Homo sapiens database using Sequest HF through proteome discoverer (version 2.2). Enzyme specificity was set to trypsin and a maximum of two-missed cleavage sites were allowed. Oxidized and loss of methionine and N-terminal acetylation were set as variable modifications. Maximum allowed mass deviation was set to 10 ppm for monoisotopic precursor ions and 0.02 Da for MS/MS peaks. The resulting files were further processed using myProMS (Pouillet et al., 2007)v3.6. FDR calculation used Percolator and was set to 1% at the peptide level for the whole study.

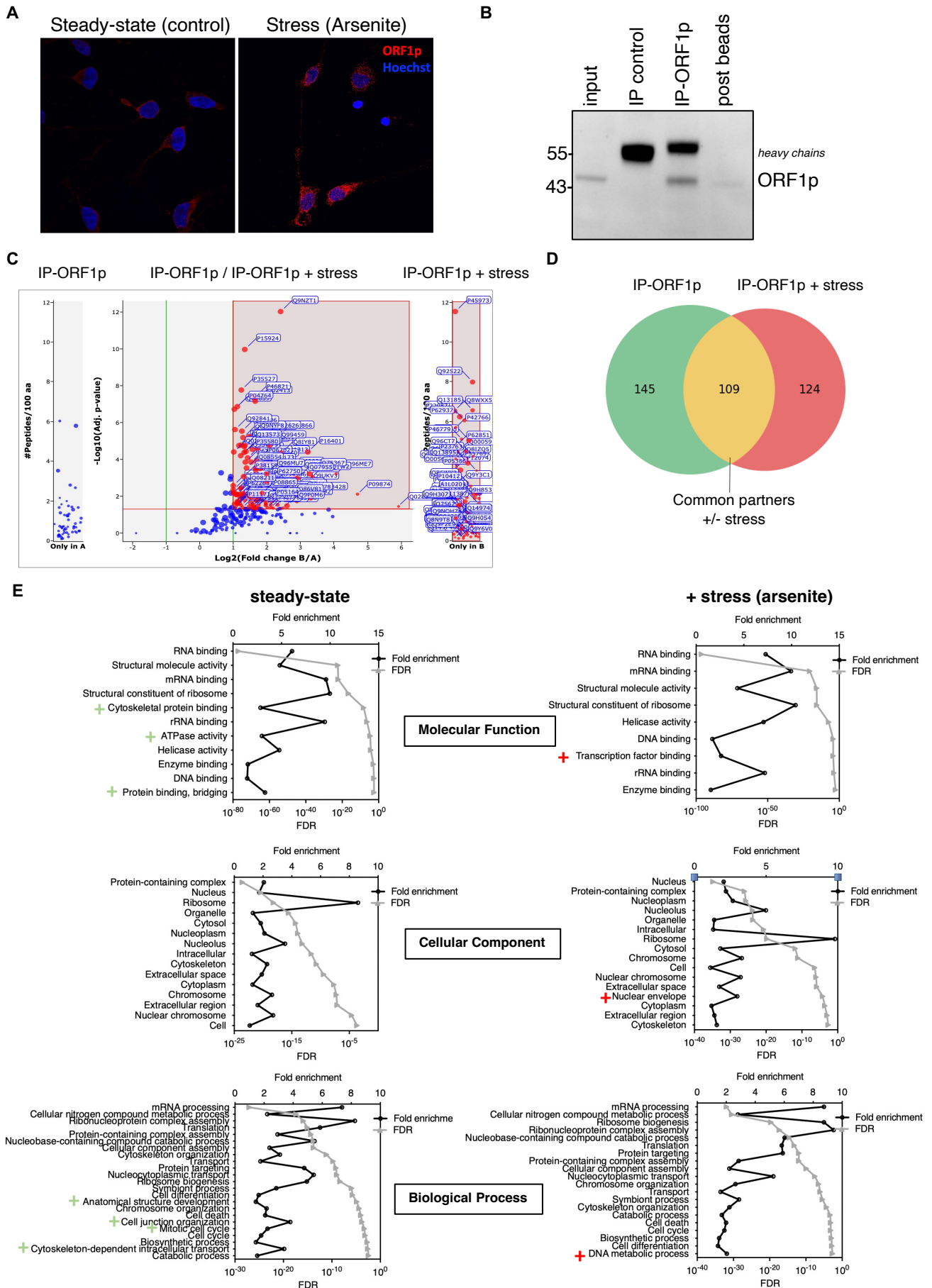
Go term and string network analysis

Gene Ontology analysis were performed using GO PANTHER (PANTHER: Making genome-scale phylogenetics accessible to all Paul D. Thomas, Dustin Albou and Huaiyu Mi Protein Society. 2022;31(1):8-22. doi:10.1002/pro.4218) and for string network physical interactions were retrieved using the STRING database v11.5 (<https://string-db.org/>) and then implemented in Cytoscape software (Shannon P, Markiel A, Ozier O, Baliga NS, Wang JT, Ramage D, Amin N, Schwikowski B, Ideker T. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks Genome Research 2003 Nov; 13(11):2498-504).

ACKNOWLEDGMENTS.

This work was supported by “Région Ile-de-France” and Fondation pour la Recherche Médicale grants (to D.L.)

Figure 1: Interactors of endogenous ORF1p in human dopaminergic neurons *in vitro* ± arsenite stress



Legends to figures:

Figure 1: Interactors of endogenous ORF1p in human dopaminergic neurons *in vitro* ± arsenite stress

(A) ORF1p is increased in differentiated LUHMES cells upon arsenite stress. Immunostaining against ORF1p of differentiated LUHMES cells treated ± arsenite.

(B) Immunoprecipitation of endogenous ORF1p in LUHMES. WB showing immunoprecipitated ORF1p and absent in the control IP.

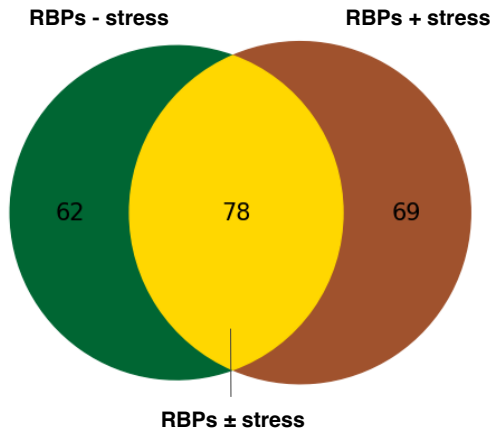
(C) Mass Spectrometry analysis of ORF1p interactors ± arsenite stress in LUHMES. Volcano-plot showing enrichment of ORF1p interactors upon arsenite stress in LUHMES. Interactors found only without or with stress are represented on the left and right side of the volcano and are compared to the number of peptides per 100 amino acids found. The size of each interactors indicates the number of peptides found.

(D) Venn diagram showing ORF1p interactors found with/without or both ± stress. Interactors found only without stress are represented in green, with stress in red and both in orange. n=5 independent immunoprecipitations and were performed for each condition: IP-IgG, IP-ORF1p and IP-ORF1p upon stress. Interactors found by LC/MS-MS were compared to control IP (IgG) and a minimum of 1 proteotypic peptides in 3/5 detections with a fold change > 2 was used as threshold assignation. Statistical significance of the overlap between the two groups of proteins was tested by an overrepresentation test (http://nemates.org/MA/progs/overlap_stats.html).

(E) GO slim enrichment analysis of proteins identified as endogenous ORF1p protein partners in the LUHMES differentiated cells ± arsenite stress. by LC/MS-MS. ORF1p-immunoprecipitated proteins were categorized into GO slim terms. The GO slim terms with the lowest FDR are plotted. Fold enrichment is depicted on the upper axis (black) and FDR value appears on the lower axis and is represented by the grey points. Go terms uniquely found in unstressed condition are marked with a green + and go terms appearing under stress condition are marked with a red +.

Figure 2: The pool of RBPs interacting with ORF1p is drastically shifted under stress

A



B

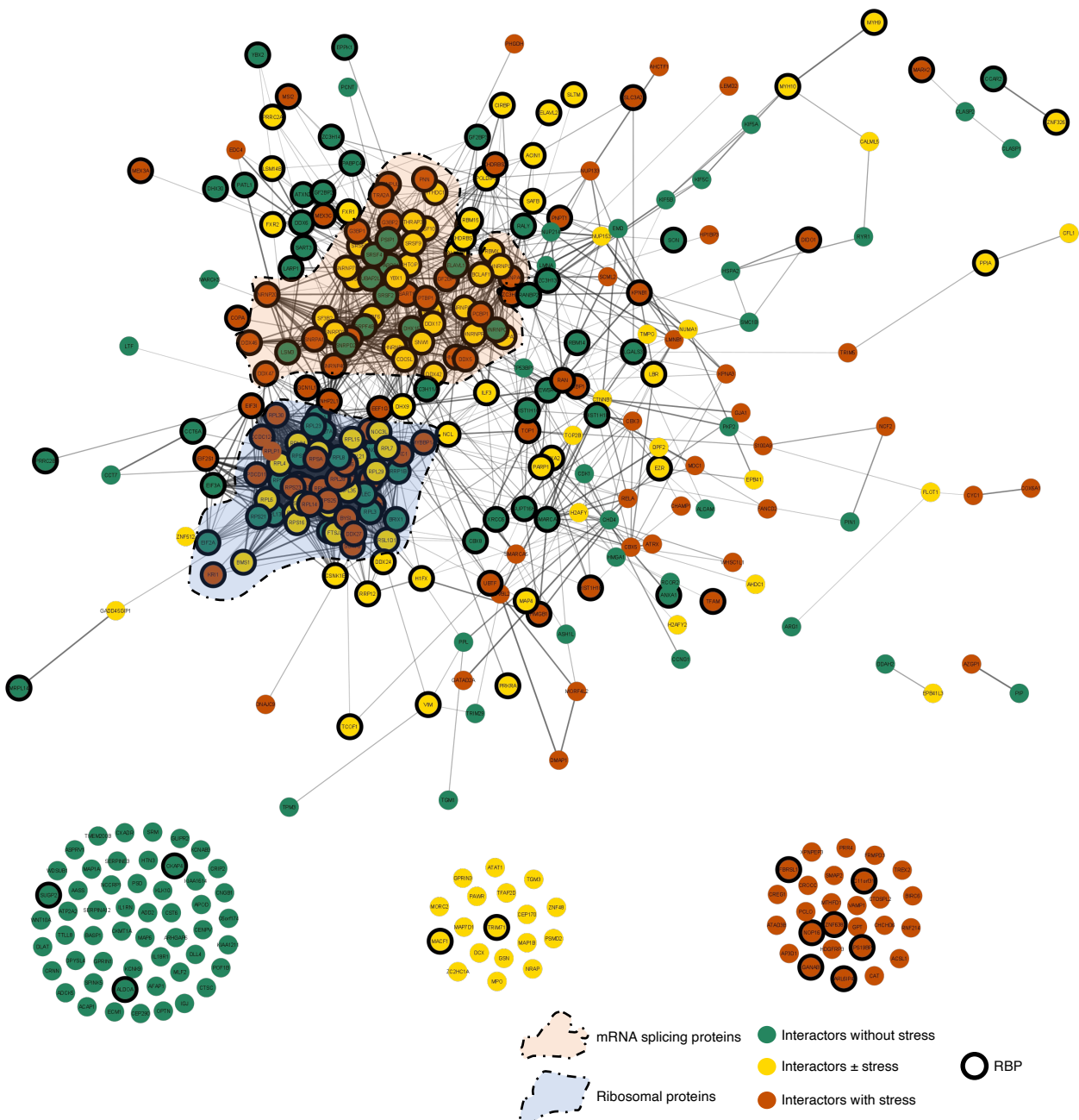
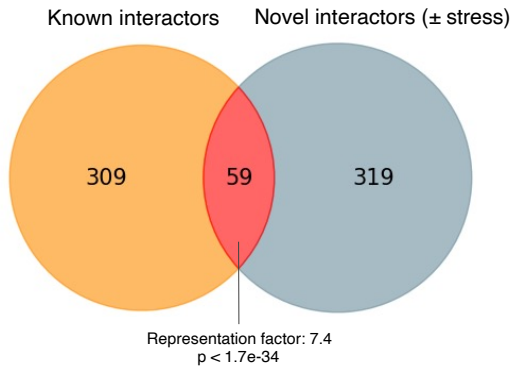


Figure 3: Interactome of the endogenous ORF1p protein in human dopaminergic neurons in vitro in comparison with literature

A



B

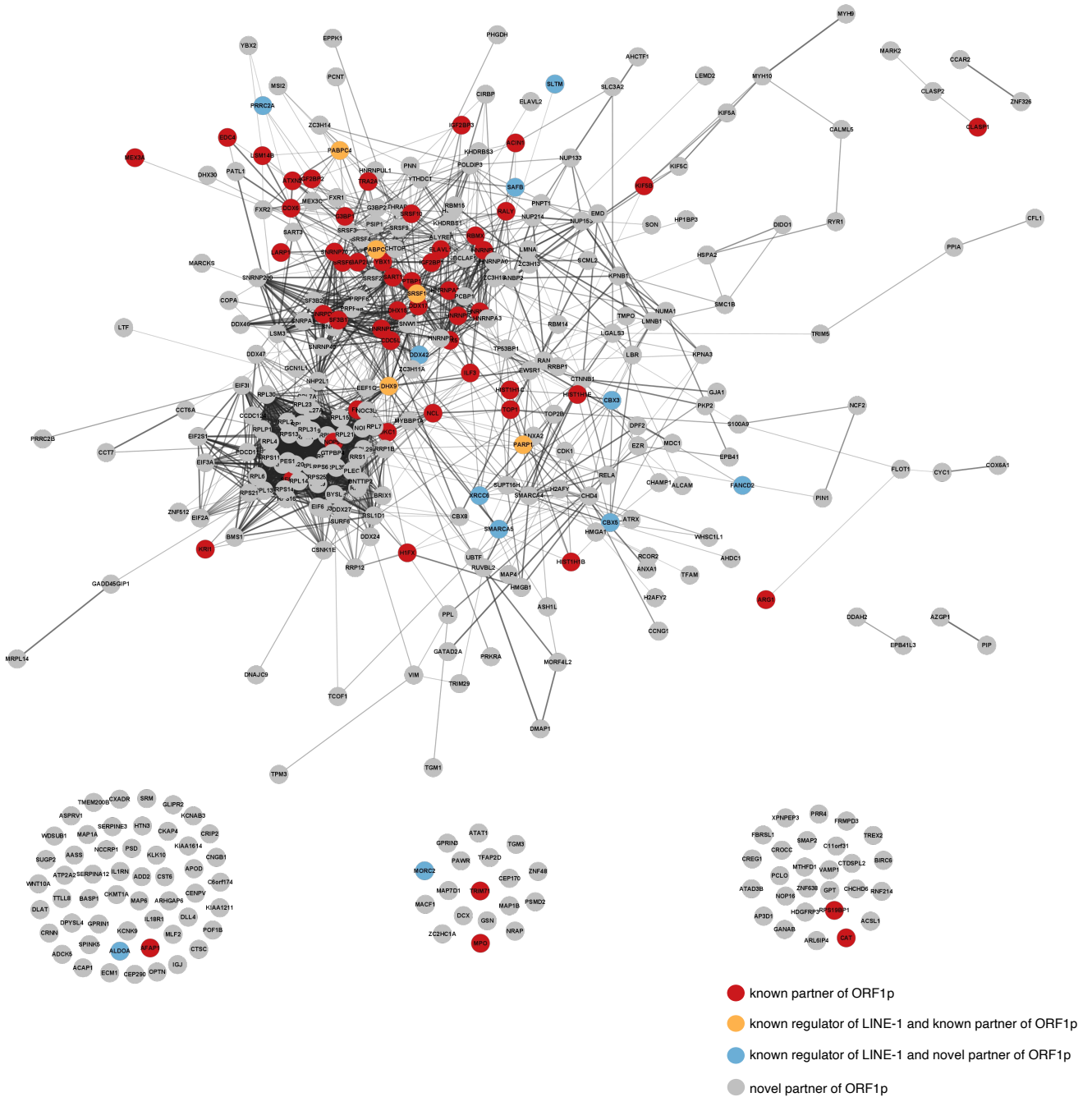


Figure 2: The RBPs ORF1p interactome is drastically shifted under stress

(A) Venn diagram showing the shift of RBPs interacting with ORF1p upon stress. RBPs only found without stress are represented in green, only found with stress in brown and RBPs found in both stressed and unstressed conditions in yellow.

(B) RBPs interacting with ORF1p form physical complex interactions modulated by stress. STRING network of physical interactions where nodes represent proteins partners identified in our study and edges thickness represent the strength of shared physical complexes. Interactors found without stress (green), with stress (brown) and in both conditions (yellow) are shown and RBPs are highlighted (black donut). Networks regrouping mRNA splicing proteins and ribosomal proteins are also delineated in beige and blue respectively.

Figure 3: Interactome of the endogenous ORF1p protein in human dopaminergic neurons in vitro in comparison with literature

(A) Venn diagram showing common interactors (red) between interactors of endogenous ORF1p in LUHMES identified in this study (blue) and known (published) interactors of ORF1p (orange). Statistical significance of the overlap between the two groups of proteins was tested by an overrepresentation test (http://nemates.org/MA/progs/overlap_stats.html).

(B) STRING network of physical interactions where nodes represent proteins partners identified in our study and edges thickness represent the strength of shared physical complexes. Proteins already known as partners of ORF1p were highlighted in red, those known as partners but also regulators of LINE-1 were highlighted in orange and known regulators of ORF1p but found as ORF1p partners for the first time are highlighted in blue. Novel ORF1p partners which are not regulator are represented in grey.

Figure 4: Upon stress, ORF1p interacts with transcription factors and nuclear envelope belonging partners.

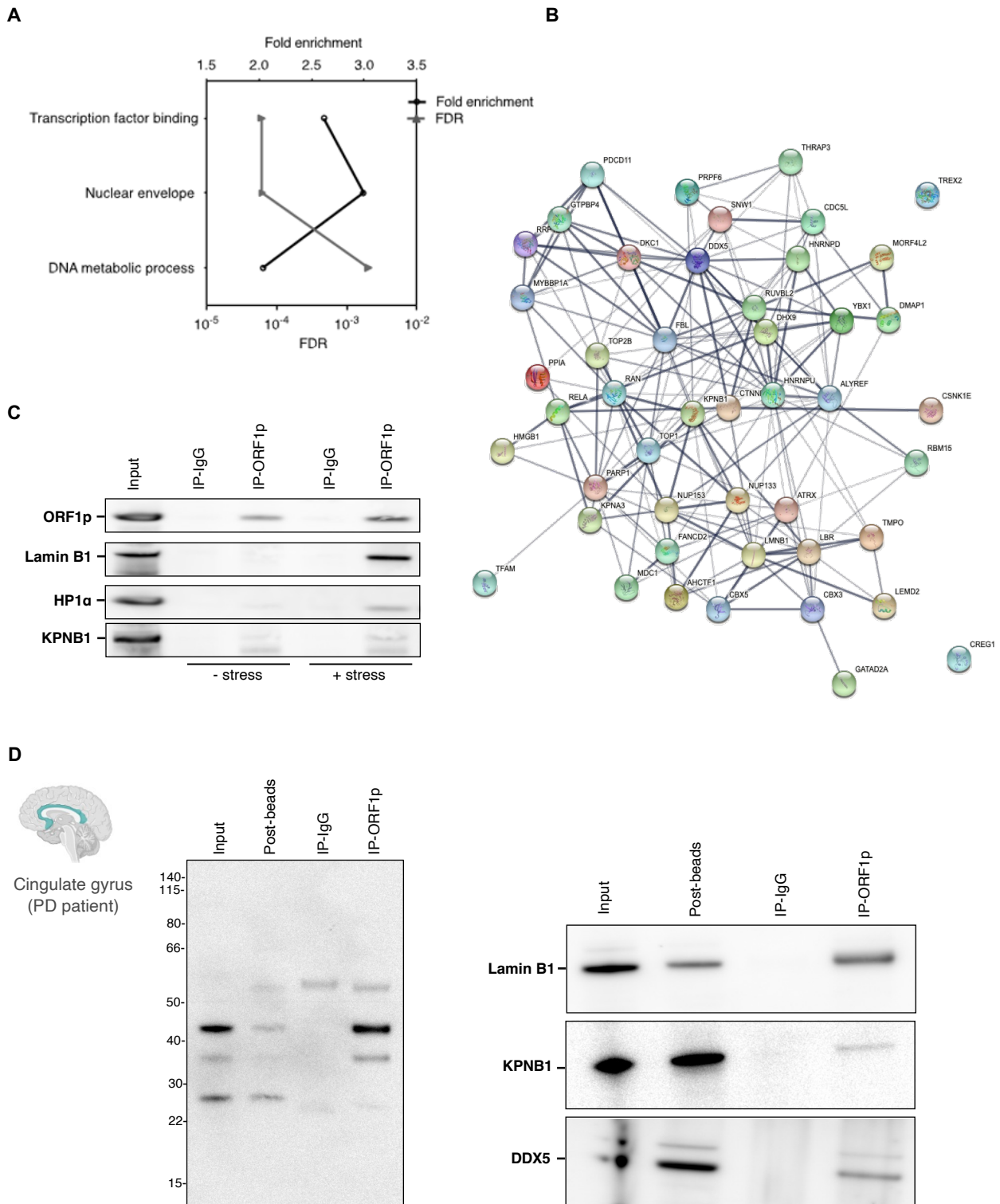


Figure 4: Upon stress, ORF1p interacts with transcription factors and nuclear envelope belonging partners.

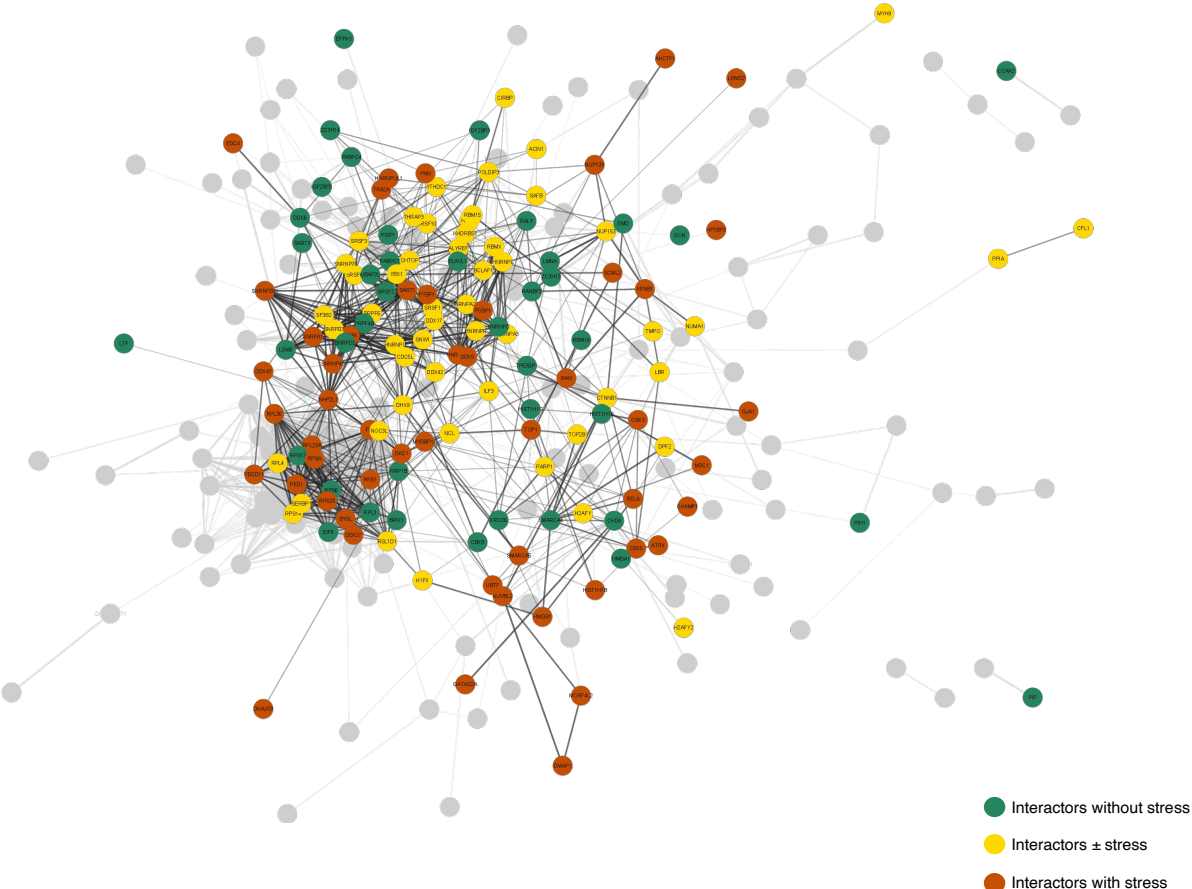
(A) Upon arsenite stress, ORF1p interacts with proteins belonging to Nuclear envelope, DNA metabolic process and Transcription factor binding GO terms. GO slim term found only upon stress. The GO slim terms with the lowest FDR are plotted. Fold enrichment is depicted on the upper axis (black) and FDR value appears on the lower axis and is represented by the grey points.

(B) STRING network of physical interactions where nodes represent proteins partners found in the three go term of Figure 4A that appear under stress and edges thickness represent the strength of shared physical complexes.

(C) HP1 and Lamin B1 interact with ORF1p under stress. Co-Immunoprecipitation showing interaction with ORF1p upon arsenite stress. Without stress LaminB1 is not found as interacting with ORF1p and HP1 is almost no detected.

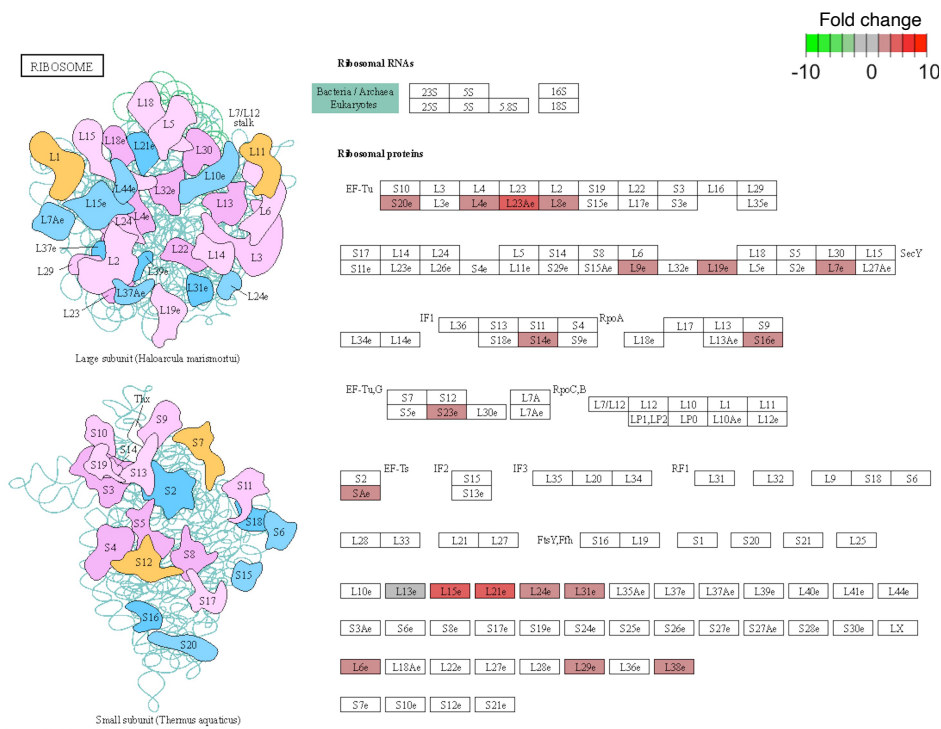
(D) ORF1p interacts with Lamin B1, KPNB1 and DDX5 in a post-mortem Cingular gyrus human brain sample of an individual with Parkinson. Immunoprecipitation of endogenous ORF1p (left) and Co-Immunoprecipitation of Lamin B1, KPNB1 and DDX5 (right) in post-mortem Cingular gyrus human brain sample of an individual with Parkinson.

SuppIFigure1: Nuclear proteins ORF1p interactors belong to the core network.

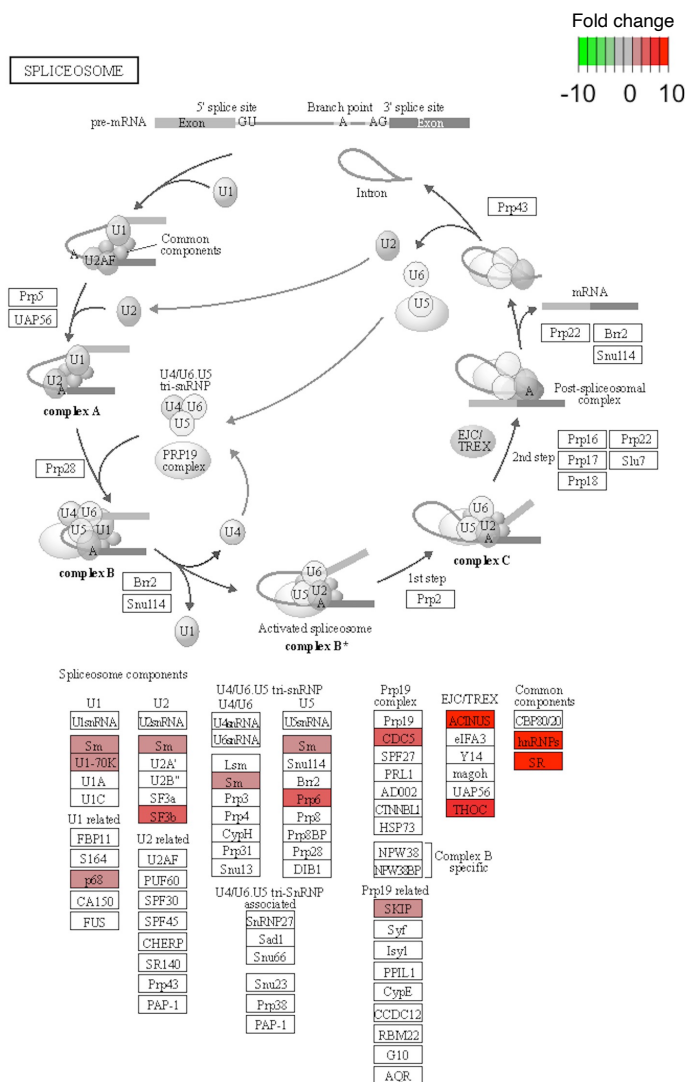


SupplFigure2: Upon stress, Ribosomal proteins and Spliceosomes components interacting with ORF1p are enriched

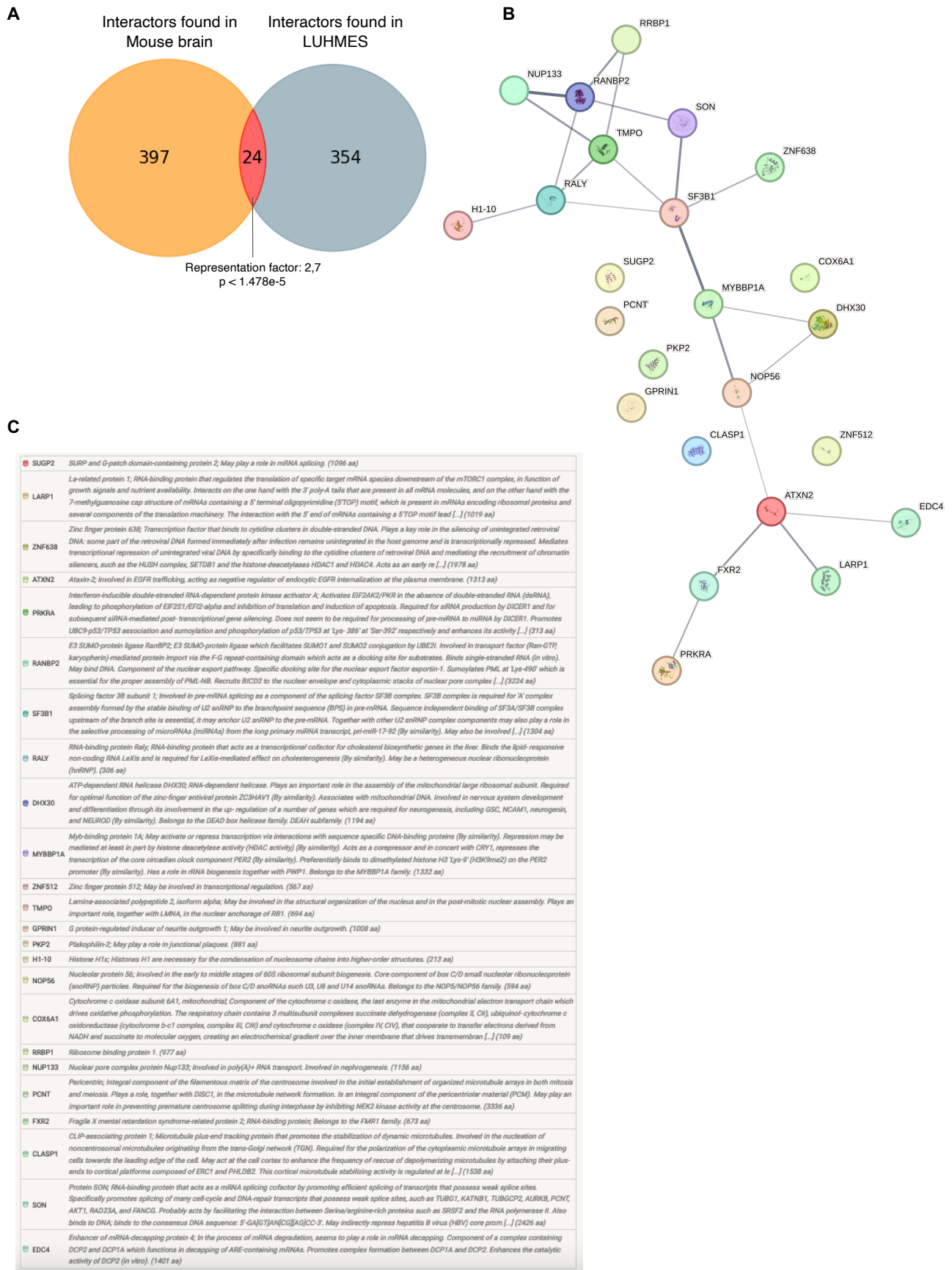
A



B



SupplFigure 3: A conservation of partners interacting with endogenous ORF1p between Mouse and Human neurons .



SupplFigure1: Nuclear proteins ORF1p interactors belong to the core network.

STRING network of physical interactions showing nuclear proteins interactors where nodes represent proteins partners identified in our study and edges thickness represent the strength of shared physical complexes. Nuclear proteins were defined according to Compartment database and protein with a 5/5 ratio for nuclear compartment were shown.

SupplFigure 2: Upon stress, Ribosomal proteins and Spliceosomes components interacting with ORF1p are enriched.

(A) Kegg representation of ribosome with proteins enriched in stress condition (Fold change shown were taken from Figure1C, for this reason no negative fold change was displayed).

(B) Kegg pathway of spliceosome with proteins enriched in stress condition (Fold change were taken from Figure1C, for this reason no negative fold change was displayed).

SupplFigure3: A conservation of partners interacting with endogenous ORF1p between Mouse and Human neurons.

(A)Venn diagram showing ORF1p interactors found in Mouse brain (orange), LUHMES (blue) and both (red). Statistical significance of the overlap between the two groups of proteins was tested by an overrepresentation test (http://nemates.org/MA/progs/overlap_stats.html).

(B) STRING network of physical and functional protein associations of partners identified in both mouse and human study. Nodes represent proteins partners identified in both mouse and human study and edges thickness represent the strength of both functional and physical protein associations

(C) Protein list of partners interacting with endogenous ORF1p between Mouse and Human neurons.

REVUE



Retrotransposons as a Source of DNA Damage in Neurodegeneration

Eugenie Peze-Heidsieck, Tom Bonnifet, Rania Znaidi, Camille Ravel-Godreuil, Olivia Massiani-Beaudoin, Rajiv L. Joshi and Julia Fuchs*

Center for Interdisciplinary Research in Biology (CIRB), CNRS, INSERM, Collège de France, Université PSL, Paris, France

OPEN ACCESS

Edited by:

Christian Neri,
Institut National de la Santé et de la
Recherche Médicale (INSERM),
France

Reviewed by:

Steve Finkbeiner,
University of California,
San Francisco, United States
Didier Trono,
Swiss Federal Institute of Technology
Lausanne, Switzerland

*Correspondence:

Julia Fuchs
Julia.fuchs@college-de-france.fr

Specialty section:

This article was submitted to
Cellular and Molecular Mechanisms
of Brain-aging,
a section of the journal
Frontiers in Aging Neuroscience

Received: 30 September 2021

Accepted: 30 November 2021

Published: 04 January 2022

Citation:

Peze-Heidsieck E, Bonnifet T,
Znaidi R, Ravel-Godreuil C,
Massiani-Beaudoin O, Joshi RL and
Fuchs J (2022) Retrotransposons as
a Source of DNA Damage
in Neurodegeneration.
Front. Aging Neurosci. 13:786897.
doi: 10.3389/fnagi.2021.786897

The etiology of aging-associated neurodegenerative diseases (NDs), such as Parkinson's disease (PD) and Alzheimer's disease (AD), still remains elusive and no curative treatment is available. Age is the major risk factor for PD and AD, but the molecular link between aging and neurodegeneration is not fully understood. Aging is defined by several hallmarks, some of which partially overlap with pathways implicated in NDs. Recent evidence suggests that aging-associated epigenetic alterations can lead to the derepression of the LINE-1 (Long Interspersed Element-1) family of transposable elements (TEs) and that this derepression might have important implications in the pathogenesis of NDs. Almost half of the human DNA is composed of repetitive sequences derived from TEs and TE mobility participated in shaping the mammalian genomes during evolution. Although most TEs are mutated and no longer mobile, more than 100 LINE-1 elements have retained their full coding potential in humans and are thus retrotransposition competent. Uncontrolled activation of TEs has now been reported in various models of neurodegeneration and in diseased human brain tissues. We will discuss in this review the potential contribution of LINE-1 elements in inducing DNA damage and genomic instability, which are emerging pathological features in NDs. TEs might represent an important molecular link between aging and neurodegeneration, and a potential target for urgently needed novel therapeutic disease-modifying interventions.

Keywords: transposable elements (TEs), genomic instability, LINE-1, DNA damage, neurodegenerative diseases, Parkinson's disease, Alzheimer's disease, aging

INTRODUCTION

Age-associated neurodegenerative diseases (NDs) such as Parkinson's disease (PD) and Alzheimer's disease (AD) have become a global burden due to the continued increase in life expectancy with obvious socio-economic implications (Yang et al., 2020). The support and care of people with NDs, for which age is the main known risk factor, poses a major challenge. Unfortunately, currently available treatments only alleviate some of the symptoms and there is still no disease-modifying treatment (Van Bulck et al., 2019).

Abbreviations: AD, Alzheimer's disease; DSBs, DNA double-strand breaks; EN, endonuclease; En1, Engrailed-1; ERV, endogenous retrovirus; HERV, human ERV; IN, integrase; LINE-1, long interspersed element-1; NDs, neurodegenerative diseases; NRTI, nucleoside reverse transcriptase inhibitor; PD, Parkinson's disease; RT, reverse transcriptase; SNpc, *substantia nigra pars compacta*; TEs, transposable elements.

Neurodegenerative diseases are clinically separated into specific syndromes based on typical clinical manifestations. For instance, the loss of dopaminergic neurons in the *substantia nigra pars compacta* (SNpc) leads to the cardinal motor symptoms in PD (Kalia and Lang, 2015), whereas the degeneration of hippocampal and cortical neurons results in memory impairment, cognitive dysfunction, and dementia in AD (Obouiyat et al., 2013). In spite of these clinical differences, NDs present substantial neuropathological and genetic overlap (Naz et al., 2017; Gan et al., 2018; Karch et al., 2018). Pathways altered in various NDs include protein quality control, the autosomal-lysosome pathway, mitochondrial homeostasis, protein seeding, propagation of stress granules, synaptic toxicity, and network dysfunction (Gan et al., 2018). Among genetic and environmental factors, age remains the major risk factor for the development of the most prevalent NDs like PD and AD, as well as for other NDs like amyotrophic lateral sclerosis (ALS), multisystem atrophy (MSA), Lewy body disease (LBD), frontotemporal dementia (FTD), and Huntington's disease (HD) (Kritsilis et al., 2018; Hou et al., 2019).

This review will highlight some striking similarities between the aging process and known pathways involved in the pathogenesis of NDs, discuss how the failure of multiple layers of LINE-1 repression, related to the pathogenesis of NDs, could explain an age-related derepression of TEs and particularly focus on LINE-1 as a source of genomic instability, an emerging pathway triggering neurodegeneration. We will also discuss a hypothetical role of LTR (long terminal repeat) retrotransposons as a possible additional source of DNA damage in the brain. Many other pathogenic mechanisms through which TEs might act as pathogenic drivers in human diseases including neurodegenerative diseases have been extensively reviewed elsewhere (Gorbunova et al., 2021; Ravel-Godreuil et al., 2021b).

PARALLELS BETWEEN NEURODEGENERATIVE DISEASES AND THE AGING PROCESS

To date, despite enormous efforts and a tremendous increase in knowledge about the fundamental nature of NDs, it remains widely unknown how aging and NDs might be linked at the molecular level. Aging is defined as a progressive loss of physiological integrity, leading to impaired functions and increased vulnerability to death (Gilbert, 2000; López-Otín et al., 2013). Aging, as defined by the “disposable theory of aging” put forward by Thomas Kirkwood in 1977, is due to a gradual, life-long accumulation of faults (e.g., DNA damage) in human cells and tissues, leading to organ dysfunction, disease, and ultimately death. So far, nine hallmarks of aging have been defined which comprise genomic instability, telomere attrition, epigenetic alterations, loss of proteostasis, deregulated nutrient sensing, mitochondrial dysfunction, cellular senescence, stem cell exhaustion, and altered intracellular communication (López-Otín et al., 2013). The first four hallmarks are considered causative primary hallmarks, which initiate cellular damage. Since age is the major risk factor for NDs, it is important to

understand whether and how aging-related processes participate in the pathogenesis of NDs. **Table 1** presents a compilation of existing evidence that links NDs with what has been defined as hallmarks of organismal aging. Evidence for the presence of all the nine aging hallmarks has been documented either in brain aging or in the context of NDs (Mattson and Arumugam, 2018; Hou et al., 2019), but we will highlight here the two primary aging hallmarks, namely, genomic instability and epigenetic alterations, as these are most relevant to TE biology.

NEURODEGENERATION, AGING, AND GENOMIC INSTABILITY

It is well documented that aging cells accumulate persistent DNA damage throughout life (Sedelnikova et al., 2004) and DNA repair activity declines in neurons with aging (Lu et al., 2004; Vyjayanti and Rao, 2006). Post-mitotic neurons in the central nervous system are particularly susceptible to this type of damage. This is due mainly to two factors related to the specificities of neuronal cell functioning. First, post-mitotic neurons do not dispose of the full repertoire of DNA repair pathways to repair DNA double-strand breaks (DSBs) (Chow and Herrup, 2015). Indeed, in mammals, there are four main DNA repair pathways, namely, nucleotide excision repair (NER) and base excision repair (BER) to repair single-strand lesions and base alterations, respectively, and homologous recombination (HR) and non-homologous end-joining (NHEJ) to repair DSBs (Chatterjee and Walker, 2017). HR requires DNA replication during cell division. However, neurons are post-mitotic, hence non-dividing and therefore cannot rely on the HR repair pathway but instead exclusively depend on NHEJ known to be more error prone. The second main specificity of neurons is the high metabolic rate which renders them prone to metabolic stress, resulting in elevated oxidative stress through the production of free radicals leading to DNA damage (Ismail and Hendzel, 2008). DNA damage can also be exacerbated by the defective functioning of topoisomerases in the context of NDs. In a physiological context, topoisomerases release torsional stress during DNA transcription, particularly on extremely long genes enriched in neuronal functions (King et al., 2013) and coordinate transcription from the promoter of immediate early genes associated with learning and memory (Madabhushi et al., 2015). These studies suggest that DNA strand breaks, if rapidly repaired at steady-state levels, can participate in physiological neuronal functions. However, when DNA repair becomes altered during aging, the transcription-associated and topoisomerase-linked DNA damage can accumulate and have indeed been reported as elevated in the context of AD (Suberbielle et al., 2013). This illustrates the importance of endogenous sources of genomic instability. The particular vulnerability of neurons to DNA damage is underscored by the fact that numerous diseases, linked to mutations in DNA repair factors, manifest with neurological symptoms (Katyal et al., 2014; Madabhushi et al., 2014). Furthermore, each neuronal population, or even subpopulation, carries cell-type-specific vulnerabilities. For instance, dopaminergic neurons are particularly vulnerable to oxidative stress due to their specific physiology and morphology

TABLE 1 | Evidence for aging hallmarks in the healthy or diseased brain.

The nine hallmarks of aging The hallmarks of aging (López-Otín et al., 2013)	Evidence for aging hallmarks in the healthy or diseased brain
Genomic instability	DNA damage and its links to neurodegeneration (Madabhushi et al., 2014) Engrailed homeoprotein blocks degeneration in adult dopaminergic neurons through LINE-1 repression (Blaudin de Thé et al., 2018) Deletion of topoisomerase 1 in excitatory neurons causes genomic instability and early onset neurodegeneration (Fragola et al., 2020) Inefficient DNA repair is an aging-related modifier of Parkinson's Disease (Sepe et al., 2016)
Telomere attrition	Debated: Eitan et al. (2014) Telomere shortening in neurological disorders: an abundance of unanswered questions Folic acid inhibits aging-induced telomere attrition and apoptosis in astrocytes <i>in vivo</i> and <i>in vitro</i> (Li et al., 2021)
Epigenetic alterations	Epigenetic regulation in neurodegenerative diseases (Berson et al., 2018) Epigenetic changes and its intervention in age-related neurodegenerative diseases (Mohd Murshid et al., 2020)
Loss of proteostasis	Regulation of protein homeostasis in neurodegenerative diseases: the role of coding and non-coding genes (Sin and Nollen, 2015) Altered proteostasis in neurodegenerative tauopathies (Papanikolopoulou and Skoulakis, 2020) Proteostasis disturbances and inflammation in neurodegenerative diseases (Sonninen et al., 2020)
Altered intercellular communication	On the central role of brain connectivity in neurodegenerative disease progression (Iturria-Medina and Evans, 2015) Extracellular vesicles and neurodegenerative diseases (Hill, 2019)
Stem cell exhaustion	Nutrients, neurogenesis and brain aging: From disease mechanisms to therapeutic opportunities (Fidaleo et al., 2017) Stem cell aging in lifespan and disease: A state-of-the-art review (Sameri et al., 2020)
Cellular senescence	Aging, cellular senescence and neurodegenerative disease (Kritsilis et al., 2018) Cellular senescence in brain aging and neurodegenerative diseases: evidence and perspectives (Baker and Petersen, 2018)
Mitochondrial dysfunction	Abnormalities of mitochondrial dynamics in neurodegenerative diseases (Gao et al., 2017) Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases and the potential countermeasure (Wang et al., 2019) Mitochondrial dysfunction in the development and progression of neurodegenerative diseases (Johnson et al., 2021)
Deregulated nutrient sensing	Dysregulation of nutrient sensing and CLEARance in presenilin deficiency (Reddy et al., 2016)

(Surmeier et al., 2017), especially in humans where dopaminergic neurons increased in number and arborization throughout evolution (Vernier, 2004; Bolam and Pissadaki, 2012).

DNA damage has been documented in experimental models of NDs, and in PD and AD patients (Mullaart et al., 1990; Adamec et al., 1999; Sepe et al., 2016; Mitra et al., 2019; Shanbhag et al., 2019). Interestingly, mice deficient in the serine/threonine kinase ataxia telangiectasia (ATM) show a selective degeneration of dopaminergic neurons in the SNpc (Eilam et al., 1998). Following rapid recruitment to DSBs, ATM not only coordinates several aspects of the cellular DNA damage response (Shiloh and Ziv, 2013) but also averts DNA damage by preventing the accumulation of topoisomerase-dependent DNA lesions (Katyal et al., 2014). This indicates that dopaminergic neurons are particularly sensitive to defects in the DSB repair pathway. The NER pathway is equally important in dopaminergic neurons as NER-deficiency induces a PD-related pathology (Sepe et al., 2016). More recently, DSBs were shown to precede all pathological hallmarks in a mouse model of AD (CK-p25). DNA damage in these mice coincided with a reduction in HDAC1 (histone deacetylase 1), and neuronal loss could be rescued by HDAC1 (Kim et al., 2008) and the NAD⁺-dependent deacetylase SIRT1 (Sirtuin 1) (Kim et al., 2007). A complex interplay between HDAC1, SIRT1, and ATM was identified, suggesting that unrepaired DSBs, due to a dysfunctional DNA repair pathway, could underline neurodegeneration in AD (Dobbin et al., 2013). DNA damage has also been shown to accumulate in other NDs such as ALS (Kwiatkowski et al., 2009; Vance et al., 2009; Wang et al., 2013).

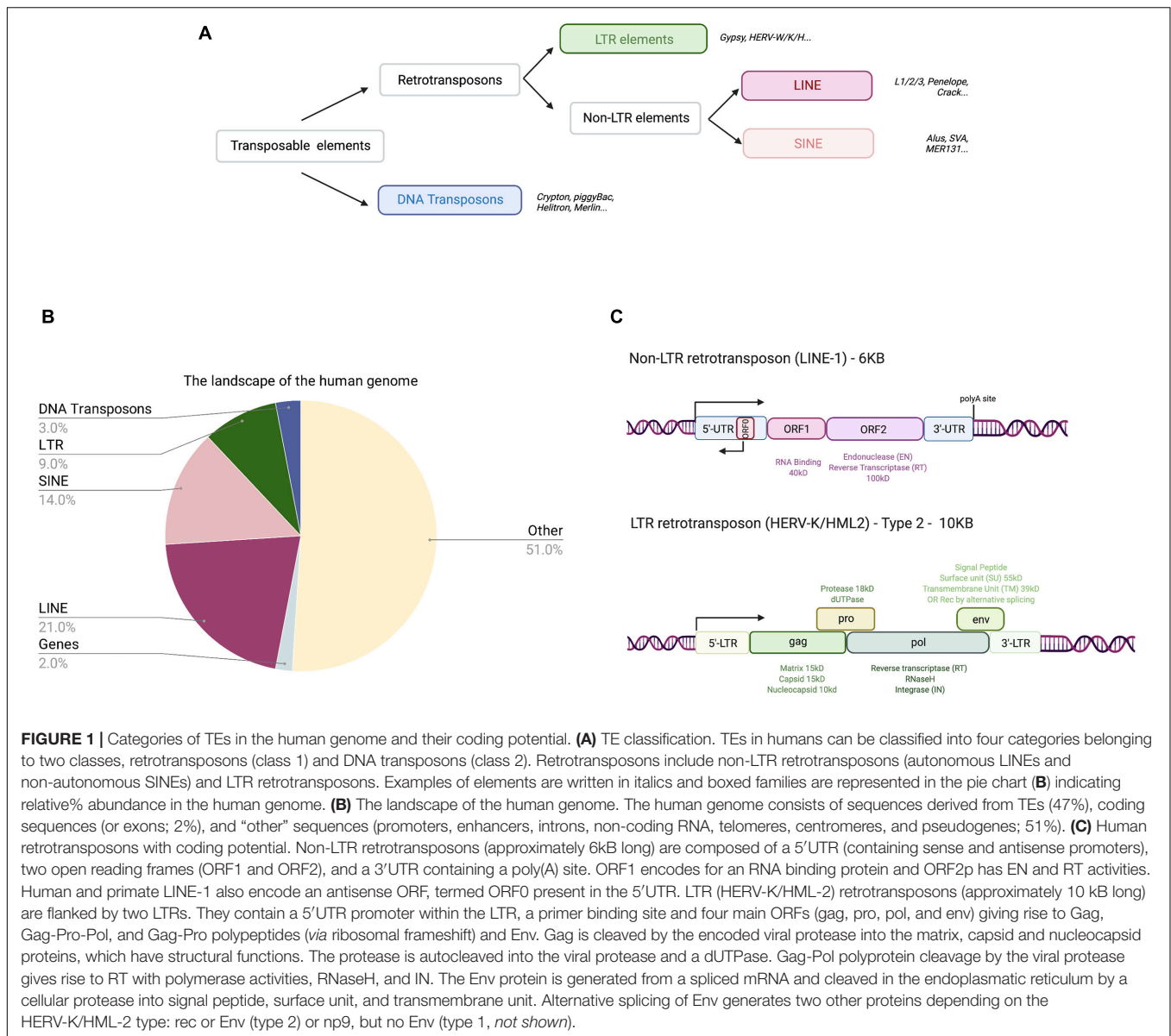
Taken together, neurons seem particularly susceptible to DNA damage due to neuron-specific features. Increasing experimental evidence suggests that genomic instability is related to the aging

process in neurons and sufficient to trigger neurodegeneration. The life-long accumulation of DNA damage together with a decline in DNA repair mechanisms might be initiating or at least contributing to neurodegeneration (Madabhushi et al., 2014; Martínez-Cué and Rueda, 2020).

We discuss below the emerging concept that LINE-1 elements might be an additional source of DNA damage and genomic instability and that LINE-1 activation in the brain could be part of the aging process as shown in somatic cells (Gasior et al., 2006; Belancio et al., 2010; De Cecco et al., 2019; Simon et al., 2019) and lead to DNA damage and neurodegeneration (Blaudin de Thé et al., 2018). Through induction of genomic instability and other recently discovered consequences of LINE-1 activation, e.g., neuroinflammation (reviewed in Saleh et al., 2019; Gorbunova et al., 2021), LINE-1 represents a so far unsuspected new pathogenic driver in NDs.

LIFE CYCLE OF LINE-1 RETROTRANSPOSONS

The complete human genome sequencing revealed that about 50% of human DNA consists of repetitive sequences (Lander et al., 2001), most of which are remnants of an ancient activity of TEs (**Figures 1A,B** and **Table 2**). These mobile elements comprise DNA transposons, LTR-retrotransposons (mammalian apparent LTR retrotransposon, MaLRs; endogenous retroviruses, ERVs), and non-LTR retrotransposons (LINE-1; Short Interspersed Elements, SINEs, and the composite element SINE/VNTR/Alu, SVA). LINE-1 elements have massively expanded in mammalian genomes and are the only autonomous retrotransposons in humans that encode their own mobilization machinery to



move from one genomic location to another. As shown in **Figure 1C**, a full-length LINE-1 contains two open reading frames: ORF1 coding for ORF1p (an RNA binding protein) and ORF2 encoding ORF2p (with endonuclease, EN, and reverse transcriptase, RT, activity). The number of LINE-1 elements that have retained their full coding potential in the human genome is currently estimated to be 146 in the human reference genome GRCh38/hg38 and 2811 in the mouse reference genome GRCm38/mm10 (euL1db: L1Basev2 Mir et al., 2015; Penzkofer et al., 2017). The mechanism of LINE-1 retrotransposition, the “LINE-1 life cycle,” is depicted in **Figure 2** and described in more detail in the figure legend. TEs have self-amplified and shaped mammalian genomes during evolution and possibly conferred evolutionary benefit (Goodier and Kazazian, 2008). A physiological role of LINE-1 retrotransposition in neuronal mosaicism during adult neurogenesis has also been proposed;

this aspect is not discussed here and has been reviewed elsewhere (Erwin et al., 2014; Richardson et al., 2014; Faulkner and Garcia-Perez, 2017). Nevertheless, LINE-1 mobilization at the level of an individual represents a threat to genome integrity. As an example, LINE-1 insertions account for 1 in every 250 pathogenic mutations in human diseases (Kazazian, 1998; Kazazian and Moran, 2017). In addition, LINE-1 unsilencing in culture can lead to numerous DSBs in the genome of human cells (Belgnaoui et al., 2006; Gasior et al., 2006), thereby decreasing cellular viability by inducing a senescence-like state (Wallace et al., 2008) or inducing apoptosis (Belgnaoui et al., 2006). ORF2p seems to nick chromosomal DNA at hundreds of different loci before each successful integration event (Gasior et al., 2006). Indeed, mutations in the EN domain of the LINE-1 ORF2 resulted in complete loss of γ -H2AX (phosphorylated histone H2A) foci, a marker of DNA damage, in HeLa cells (Gasior et al., 2006),

TABLE 2 | Summary of the frequency of retrotransposons and estimates about the number of open reading frames for their encoded proteins.

	LTR	LINE	SINE	References
% Human genome	9%	21%	14%	Lander et al., 2001
Integration mechanism	dsDNA + IN	TPRT + EN	TPRT + EN (from L1)	
# of potential coding loci	Predicted in ¹ :12779 Predicted in ² ≈ 3000 Pol ORFs	Predicted in ¹ :21187	0	¹ Nakagawa and Takahashi, 2016 ² Seifarth et al., 2005
# of TEs with coding potential	Predicted in ³ :42 HERVs regions with 29 Env, 13 Pol, 17 Gag ORFs Predicted in ² :15 Env, 14 Pol, 25 Gag, 11 Rec, 12 Np9 ⁴ , 8 IN	Predicted in ⁶ :146 fIL1 with complete ORF1p and ORF2p ORFs, 107 ORF2-only Predicted in ⁷ :147 fIL1, 80 ORF2-only	Not coding	³ Villesen et al., 2004 ⁴ Garcia-Montojo et al., 2018, 2021 ⁵ Bray et al., 2016 ⁶ Penzkofer et al., 2017 ⁷ Mills et al., 2007

LINEs are the most represented subclass in the human genome covering 21% of the human genome with about 500,000 copies (Lander et al., 2001) of which only a small fraction of the LINE-1 family is mobile. HERVs are thought to have lost mobility, but some HERV families still encode functional proteins. LINE-1 integration is mediated by the LINE-1 encoded EN via a mechanism called targeted primed reverse transcription, TPRT. HERV elements integrate via a pre-integration complex formed by the IN protein, viral dsDNA, and host proteins. Non-autonomous SINEs do not encode protein as they use the retrotransposition machinery and form an RNP with their RNA and the LINE-1 encoded ORF1 and ORF2 for integration. Listed are predictions for the number of potential coding loci for HERV and LINE-1 elements using different sources. Of note, TEs are polymorphic in populations and these predictions are mostly based on reference genomes.

indicating that DNA damage is mediated by the ORF2 encoded EN activity. This was also experimentally demonstrated in mouse fibroblasts (Belancio et al., 2010). Thus, all LINE-1 elements that have retained coding potential for at least the ORF2p EN are potential endogenous sources of genomic instability when unsilenced. Based on the L1Basev2 annotation (Penzkofer et al., 2017), there are about 253 individual LINE-1 elements with a complete open reading frame for ORF2p in addition to the full-length LINE-1 elements which, when activated, could constitute an additional source of genome instability in somatic cells.

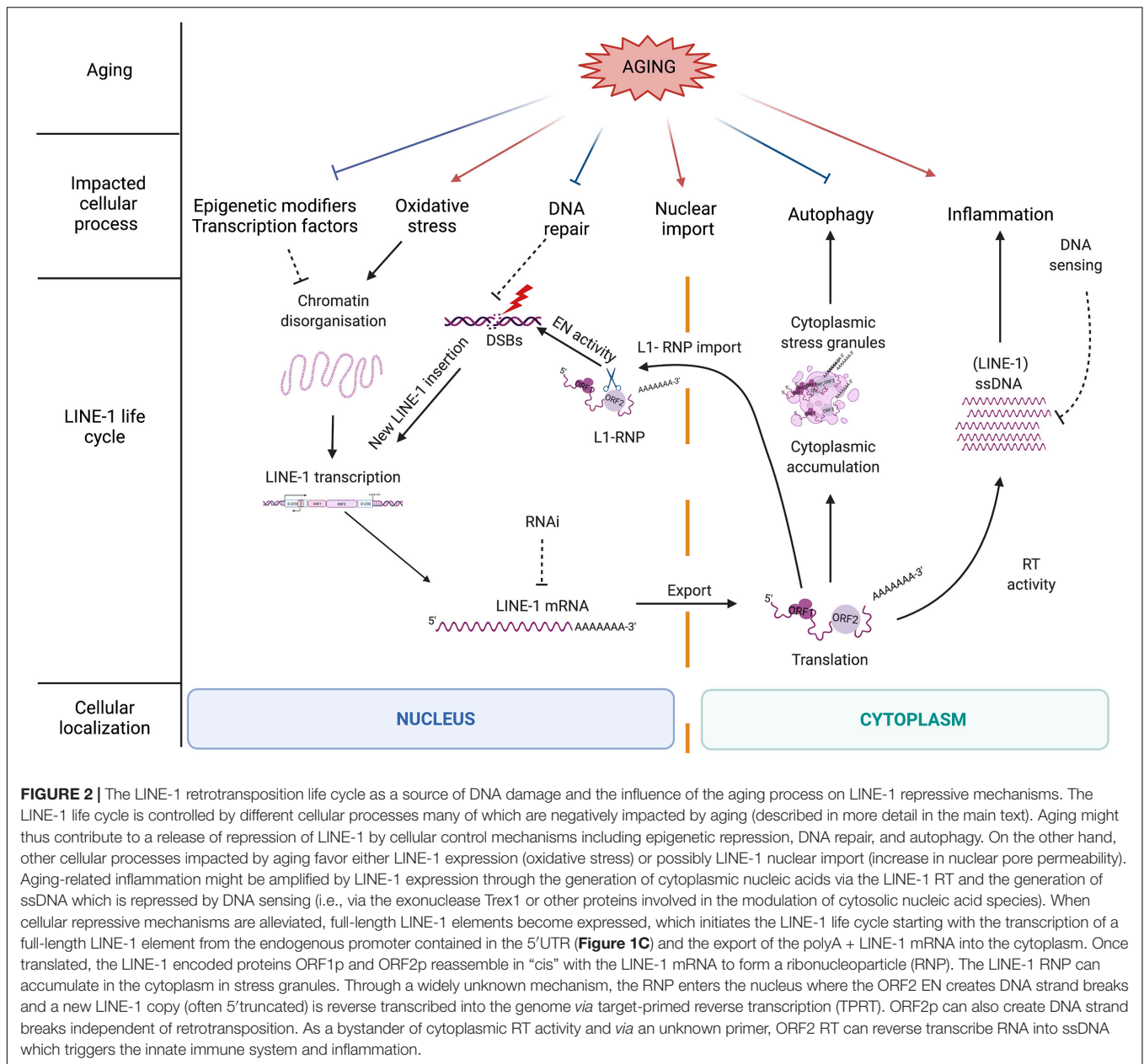
MULTIPLE LAYERS OF LINE-1 REPRESSION

Since LINE-1 activity represents a potential threat for genome integrity, several cellular factors and pathways keep these elements in check at almost every level of the LINE-1 life cycle (Figure 2). These repressive mechanisms include regulation at the epigenetic level by the binding of epigenetic modifiers to the LINE-1 sequence, at the transcriptional level by sequence-specific repressive transcription factors binding to the LINE-1 promoter in the 5'UTR (5' untranslated region), at the post-transcriptional level by degradation mechanisms (splicing, RNA interference or RNAi, autophagy, and stress granules), at the translational level via RNA binding proteins, at the level of the nuclear import of the RNA, and at the integration level by several factors belonging to the DNA repair machinery (Pizarro and Cristofari, 2016). Repression at the epigenetic level is mostly accomplished by the addition of repressive histone marks, mainly trimethylation of lysine 9 of histone H3 (H3K9me3) (Bulut-Karslioglu et al., 2014; Liu et al., 2014; He et al., 2019), trimethylation of lysine 20 of histone H4 (H4K20me3) (Ren et al., 2021), and histone H1 on LINE-1 loci (Healton et al., 2020), and by DNA methylation (Hata and Sakaki, 1997; Muotri et al., 2010). This is mediated by several sequence-specific repressors that directly bind to TEs and recruit epigenetic modulators. One example of a rather general repressor of TEs is the Kruppel-associated box Zinc finger protein

family (KRAB-ZFPs) which repress LTR retrotransposons (Ecco et al., 2017; Yang et al., 2017), but also LINE-1 and SVA elements (Castro-Diaz et al., 2014; Jacobs et al., 2014). KRAB-ZFPs provide a scaffold for the formation of heterochromatin on TEs. Another example for a repressive transcription factor is the homeobox protein Engrailed, which binds to the 5'UTR of LINE-1 elements and represses their expression in midbrain dopaminergic neurons (Blaudin de Thé et al., 2018). As Engrailed expression is regionally restricted (Di Nardo et al., 2018), this provides an example of region-specific TE control.

When TEs become derepressed and transcribed, the next level of repression consists of small RNAs targeted against TE transcripts. In the germline, where specific developmental states require the relaxation of epigenetic repression, the PIWI (Piwi-Induced WImpy testis in *Drosophila*)-piRNA (Piwi-interacting RNA) pathway plays an important role in TE control (Zamudio and Bourc'his, 2010). Outside of the germline, piRNA expression has been documented in somatic tissues, including the mouse brain (Lee et al., 2011), but so far the role of piRNA expression in the brain has not yet been identified. However, as a proof-of-principle, PIWIL1 (PIWI-like protein 1) overexpression from a viral vector was sufficient to repress LINE-1 induced neurodegeneration of midbrain dopaminergic neurons during oxidative stress and in the *En1*[±] heterozygous mouse model of PD (Blaudin de Thé et al., 2018). In addition to the specific piRNA pathway, endogenous siRNAs (small interfering RNAs) suppressing TE expression have been identified in both gonadal and non-gonadal tissues. They derive from bidirectional transcription of TE-containing loci (Saito and Siomi, 2010). Other RNAi pathways, capable of degrading LINE-1 mRNA directly via the microprocessor complex (Drosha/DGCR8), have also been described (Heras et al., 2013, 2014). Furthermore, several cellular proteins have been identified that positively or negatively regulate LINE-1 activity through proteomic screens for cellular interactors of ORF1p or ORF2p (Pizarro and Cristofari, 2016).

Several other cellular pathways alter LINE-1 activity. Among these, autophagy is an important cellular mechanism used to



degrade LTR and non-LTR retrotransposon RNA and thereby prevent retrotransposition events. Depending on the level of expression, LINE-1 mRNA localizes either to RNA granules (endogenously expressed LINE-1) or cytoplasmic stress granules (exogenous overexpressed LINE-1 RNA), but in either case, LINE-1 RNA can be degraded via autophagy (Guo et al., 2014). ORF1p is located in distinct foci in the cytoplasm which have been (in conditions of exogenous expression) identified as stress granules (Goodier et al., 2007, 2013). It is noteworthy that stress granules formed in the absence of an exogenous stress, indicating that ORF1p overexpression itself is recognized as a stress by the host cell. Based on their data, the authors suggest that stress granules could sequester and possibly degrade LINE-1 RNPs (ribonucleoproteins consisting of ORF1p/ORF2p and the

LINE-1 mRNA) via P (processing)-bodies (Goodier et al., 2007), consistent with what was found for LINE-1 RNA (Guo et al., 2014). Within the stress granules, ORF1p interacts with a large number of RNA-binding proteins but interestingly, the authors also identified RNAi factors colocalizing with ORF1p, suggesting an additional layer of repression within this membraneless cytoplasmic compartment.

The proteomic screens for LINE-1 interactors also identified proteins activated through the interferon response pathway by the innate immune system. These findings are consistent with the role of the innate immune response as one of the first cellular responses activated upon viral infections (MacMicking, 2012) and the parasitic nature of LINE-1 elements. Some of these proteins colocalize with stress granules and degrade LINE-1 RNA

(e.g., MOV10, Moloney leukemia virus 10 homolog). However, the exact mechanism for LINE-1 repression remains unknown for other proteins (e.g., cytidine deaminase APOBEC3) (Pizarro and Cristofari, 2016). This inflammatory response, although essential, can have pathological consequences if not regulated (Kassiotis and Stoye, 2016). Mutations in TREX1 (three prime repair exonuclease 1) or SAMHD1 (SAM domain and HD domain-containing protein 1) (Hu et al., 2015), for instance, lead to the same autoimmune disease, Aicardi-Goutières syndrome (AGS). TREX1 detects and degrades cytoplasmic ssDNA (single-stranded DNA) fragments arising from aberrant RT activity of LINE-1 or ERV (Stetson et al., 2008; Thomas et al., 2017) and possibly also released from mitochondrial damage (Sliter et al., 2018). The loss of TREX1 activity results in the accumulation of LINE-1-derived ssDNA in the cytoplasm of astrocytes, initiating (through the cGAS-STING pathway) a neurotoxic release of interferon in the extracellular medium, and leads to neurodegeneration (Thomas et al., 2017).

Finally, at the level of LINE-1 insertions or EN-mediated DSBs, the DNA repair pathway comes into play. However, while some DNA repair pathway proteins restrict LINE-1 activity (e.g., DNA excision repair protein 1, ERCC1), others such as poly(ADP-ribose) polymerase 2 (PARP2) bind to LINE-1 integration sites leading to subsequent recruitment of the replication protein A (RPA) complex to facilitate retrotransposition (for review, Pizarro and Cristofari, 2016; Miyoshi et al., 2019).

Taken together, this complex interplay of repressive mechanisms controlling TE expression ensures genomic integrity and has been shown to be of great importance in the context of neuronal cell survival (Thomas et al., 2017; Blandin de Thé et al., 2018). However, these mechanisms seem to fail over time. We will discuss below how the aging process weakens this multi-layer cellular response (Figure 2), increasing genomic instability in the host cell and igniting (neuro)inflammation.

LINE-1 DEREPRESSION WITH AGING

Somatic cells express low, basal levels of LINE-1 (Faulkner et al., 2009; Belancio et al., 2010). The brain seems to provide a particularly permissive environment for LINE-1 activity (Muotri et al., 2005, 2010; Coufal et al., 2009; Macia et al., 2017) and supports higher retrotransposition rates compared to other tissues (Muotri et al., 2005; Coufal et al., 2009; Baillie et al., 2011; Evrony et al., 2012; Goodier, 2014; Suarez et al., 2018). While LINE-1 RNA expression is well documented in the human brain (Guo et al., 2018; Pereira et al., 2018; Sun et al., 2018; Savage et al., 2019), knowledge about the expression of LINE-1 encoded proteins in the brain remains scarce. Although limited by sample size, the only study, to our knowledge, using immunohistochemistry to characterize ORF1p expression in human post-mortem brain provides evidence of higher ORF1p expression levels in the brain compared to peripheral tissues and suggests that patterns of ORF1p expression might vary depending on the age of the individual, notably with regard to the subcellular localization of ORF1p (Sur et al., 2017). The mobility of TEs

increases with aging in several species [*Saccharomyces cerevisiae* (Maxwell et al., 2011); *Caenorhabditis elegans* (Dennis et al., 2012); human cells in culture (De Cecco et al., 2013); mice (De Cecco et al., 2019) and mouse tissues including brain (Van Meter et al., 2014)]. As discussed above, aging is characterized by several hallmarks impacting normal cellular functions and inducing a secretory phenotype affecting surrounding cells (Di Micco et al., 2021). Aging alters repressive epigenetic modifiers, leading to heterochromatin disorganization (Misteli, 2010; Lee et al., 2020), induces autophagy inhibition (Barbosa et al., 2019) and cytoplasmic stress granule dysfunction (Cao et al., 2020), increases permeability of the nuclear membrane (Li and Lagier-Tourenne, 2018), triggers a dysfunctional innate immune response (Shaw et al., 2010) and a decline of DNA repair (Maynard et al., 2015). As shown in Figure 2, aging generally leads to a decrease in TE repressive factors (Van Meter et al., 2014), which allows TE expression. Finally, aging also favors certain environments which increase LINE-1 expression, notably oxidative stress (Rockwood et al., 2004; Blandin de Thé et al., 2018).

The regulation of LINE-1 by SIRT6 (sirtuin 6) particularly illustrates the failure of a major LINE-1 repressive mechanism following cellular stress or aging and thus impacting cellular fitness. Indeed, during aging or in response to DNA damage, the heterochromatin-inducing protein SIRT6, a histone deacetylase, becomes depleted from LINE-1 loci, leading to derepression of LINE-1 elements (Van Meter et al., 2014). SIRT6 is a key regulator of mammalian lifespan as illustrated by the severe premature aging phenotype of *Sirt6* knockout mice (Mostoslavsky et al., 2006) and the increase in lifespan of mice overexpressing *Sirt6* (Kanfi et al., 2012). Interestingly, of all organs tested, the brain showed the highest upregulation of LINE-1 transcripts with aging, together with a partial loss of *Sirt6* binding to the LINE-1 5'UTR. This, combined with reports of higher retrotransposition rates in the brain compared to other tissues (Coufal et al., 2009; Baillie et al., 2011) and several neurological diseases associated with a dysregulation of LINE-1 activity (Baillie et al., 2011; Jakovcevski and Akbarian, 2012), suggests that the brain might be a particularly susceptible organ to LINE-1 related aging.

Another sirtuin, *Sirt7* (sirtuin 7), safeguards genome stability and cell viability (Tang et al., 2021). Among its cellular functions, *Sirt7* also acts as a tethering factor, partly *via* acetylation of H3K18 (histone H3 lysine 18), between the nuclear lamina protein laminA/C and young LINE-1 sequences in mice and human cells. LINE-1 elements are thus enriched at lamin-associated domains (LADs), which are heterochromatic regions at the nuclear periphery (Zuo and Rocha, 2020), and this tethering by *Sirt7* ensures LINE-1 transcriptional silencing (Vazquez et al., 2019). However, *Sirt7* is downregulated during aging in hematopoietic stem cells (Mohrin et al., 2015), suggesting that this repressive mechanism of LINE-1 could be altered. Furthermore, it has been reported that aging is correlated with the decrease of LINE-1 retrotransposon promoter methylation in purified cell-free DNA from human blood (Mahmood et al., 2020).

The visionary “LINEage” theory has been postulated more than a decade ago (St. Laurent et al., 2010). It hypothesized that L1 acts as an “endogenous clock” which slowly erodes genomic

integrity by competing with DNA break repair mechanisms and thereby negatively impacting longevity. Accumulating experimental evidence since then only confirms that LINE-1 activation might not only be an important universal hallmark of aging in various tissues, including the brain, but also a mechanistic driver of aging.

LINE-1 AS A SOURCE OF DNA DAMAGE IN NEURODEGENERATION

Overexpression of LINE-1 in human embryonic stem cells differentiated into hippocampal neurons led to an increase in DNA DSBs (marked by γ -H2AX) which was abolished when the LINE-1 EN and RT domains were mutated (Erwin et al., 2016). The fact that LINE-1 activation can lead to DSBs in adult neurons *in vivo* and induce neurodegeneration was recently established in a mouse model of PD carrying only one allele of the homeodomain transcription factor Engrailed-1 (En1) (Blaudin de Thé et al., 2018). The homeoprotein Engrailed plays an important role in the development and survival of dopaminergic neurons during development (Simon et al., 2001; Di Nardo et al., 2007; Rekaik et al., 2015). En1 expression persists in adult midbrain dopaminergic neurons and continues to be required for the survival of these neurons. Indeed, *En1*[±] mice lose dopaminergic neurons in the SNpc starting from 6 weeks of age (Sonnier et al., 2007). This loss is progressive and mutant mice develop PD-like motor symptoms. These mice also show early dysfunctions in nerve termini and the autophagy-lysosome pathway, reminiscent of early perturbances and retrograde degeneration patterns observed in PD. *En1*[±] mice thus represent a valuable model for PD (Sgadò et al., 2008), used for preclinical drug testing (Ghosh et al., 2016). Further characterization of this model revealed that *En1*[±] mice exhibit loss of repressive chromatin marks, increased LINE-1 expression, and DSBs accumulation in dopaminergic neurons in the SNpc. Importantly, it was shown that part of these DSBs result from LINE-1 activation (Blaudin de Thé et al., 2018). In line with this, DNA damage and neuronal cell death in either *En1*[±] mice or a toxicological model of PD (direct injection of 6-hydroxydopamine in the SNpc) could be rescued by anti-LINE-1 strategies such as overexpression of PIWIL1, siRNAs targeting ORF2, or a reverse transcriptase (RT) inhibitor developed in the context of HIV/AIDS treatment, but also active against the RT enzyme encoded by ORF2p (Dai et al., 2011; Banuelos-Sanchez et al., 2019). Altogether, these studies indicate that LINE-1 activity contributes to neurodegeneration in *En1*[±] mice and in an acute oxidative stress model of dopaminergic neurodegeneration *via* the induction of DNA damage. These studies also showed that LINE-1 retrotransposons are inducible in postmitotic dopaminergic neurons under stress conditions and stress-induced LINE-1 increase is associated with DNA damage and linked to neurodegeneration. More recently, it was shown that heterochromatin destructure following changes in DNA methylation in dopaminergic neurons in the SNpc also resulted in LINE-1 derepression, DNA damage and neurodegeneration (Ravel-Godreuil et al., 2021a).

The active expression of TEs, especially LINE-1 retrotransposons, has now been documented in other NDs such as AD (Guo et al., 2018; Sun et al., 2018) or ALS (Pereira et al., 2018; Savage et al., 2019). Although LINE-1 retrotransposition has been reported in healthy tissues (Muotri et al., 2005, 2010; Coufal et al., 2009; Macia et al., 2017) and in the context of a large spectrum of neurological diseases (Reilly et al., 2013; Suarez et al., 2018), the question as to whether retrotransposition events take place in postmitotic neurons is still a matter of debate. In particular, the relative contribution of LINE-1 retrotransposition events in inducing genomic instability and neurodegeneration remains to be established. However, as discussed above, even in the absence of LINE-1 mobilization, the DNA strand breaks induced by LINE-1 activity can be sufficient to jeopardize genome integrity in the brain and contribute to neurodegeneration (Blaudin de Thé et al., 2018). In addition to being a source of DNA damage and genomic instability, LINE-1 could be pathogenic drivers for other pathological features of NDs. Indeed, the activity of LINE-1 loci can modulate host gene expression in various ways (Elbarbary et al., 2016; Liu et al., 2018). In addition, TE-derived proteins can be neurotoxic (Antony et al., 2004; Douville and Nath, 2017) and an increase in TE encoded proteins can be an important source of neuroinflammation. Both, gene dysregulation and neuroinflammation are common hallmarks of NDs. These aspects have recently been reviewed in depth elsewhere (Saleh et al., 2019; Tam et al., 2019a; Gorbunova et al., 2021). Further, exciting evidence suggests that some proteins linked to AD and two other neurodegenerative diseases, namely, ALS and FTD, control or interact with TEs at different levels. The protein Tau, mutated in specific forms of FTD and aggregating in several neurodegenerative diseases including AD (Orr et al., 2017) is involved in epigenetic repression of TEs (Sun et al., 2018; Ramirez et al., 2021) and TDP-43 binds TE sequences and TE transcripts (Li et al., 2012; Tam et al., 2019b).

LINE-1, DNA DAMAGE, AND SENESCENCE

Genomic DNA damage can also be associated with other types of cellular response, such as cellular senescence. In recent years, a role of senescent cells has been recognized in aging and aging-related pathologies (Childs et al., 2017; Kritsilis et al., 2018). It is well documented that persistent accumulation of unrepairable DNA damage in dividing cells leads to either apoptosis or senescence, characterized by permanent cell cycle arrest (d'Adda di Fagagna, 2008; Herranz and Gil, 2018) and a senescence-associated secretory phenotype (SASP). The secretion of various factors such as pro-inflammatory cytokines or matrix remodeling factors by senescent cells can promote the induction of the same phenotype in surrounding cells and drive aging and aging-related diseases. LINE-1 expression induces cellular senescence in MCF7 cells (Wallace et al., 2008), and in turn, senescence induces LINE-1 expression which activates a type-I interferon (IFN-I) response (De Cecco et al., 2019). Furthermore, several factors, such as FOXA1 (Forkhead box protein A1), TREX1, and RB1

(retinoblastoma 1), have altered expression during senescence and are also LINE-1 regulators (De Cecco et al., 2019).

While neurons cannot divide, recent evidence suggests that post-mitotic neurons could re-enter the cell cycle in the context of neurodegeneration (Nandakumar et al., 2021). Since mature neurons cannot fully terminate the cell cycle by cell division, they might rapidly exit the cell cycle and acquire a senescent-like phenotype (Jurk et al., 2012). The DNA damage resulting from the activation of LINE-1 elements could contribute to the accumulation of senescent-like neurons in various brain areas during aging and neurodegeneration. Such cells might spread this senescence-like state through SASP to neighboring neurons and thereby contribute to the chronic neuroinflammation observed in NDs. Selective ablation of senescent cells is thought to have therapeutic potential in neuroprotection (Childs et al., 2017).

LTR RETROTRANSPOSONS – ANOTHER POSSIBLE SOURCE OF GENOMIC INSTABILITY?

As documented above, accumulating evidence suggests that LINE-1 retrotransposons can be a source of genomic instability through the activity of the encoded EN. As DNA cleavage is an integral part of transposition, we will examine in the following section whether other TEs in the human genome could be accountable for genomic instability in specific cellular contexts. While LINE-1 are the only currently mobile TEs in the human genome, some copies of LTR retrotransposons, which comprise 8 to 9% of the human genome (Figure 1B), have retained transcriptional activity and coding potential and have been associated with human diseases, including neurodegenerative diseases. A comprehensive review on HERV pathogenicity in neurodegenerative diseases was published recently (Tam et al., 2019a).

Human LTR retrotransposons can be broadly divided into the non-autonomous MaLR and human endogenous retroviruses (HERVs), which originate from exogenous retroviruses that have infected hominoid germline cells millions of years ago (Boeke and Stoye, 1997). In contrast to endogenous retroviruses in mice, HERVs are considered non-replicating, but HERV-RNA and encoded proteins have been identified in various tissues (Garcia-Montojo et al., 2018). Although differences in structure and processing exist, ERVs follow globally the classical life cycle of retroviruses, namely, transcription from the so-called nuclear DNA provirus, a complex translation pattern of the compact RNA which includes two frameshifts, assembly of encoded proteins and RNA to envelope-mediated budding from the plasma membrane, processing of polyproteins into functional protein units by the encoded protease within the capsid, entry into a new cell, and post capsid disassembly and reverse transcription of the viral RNA into cDNA (dsDNA *via* the activity of the polymerase, Pol). Finally, a pre-integration complex containing an integrase (IN) processed from the Pol polyprotein within the capsid, “viral” dsDNA, and host proteins, enter the nucleus and, following DNA strand breaks, the viral dsDNA integrates into the host genome. Different HERV families

arose through independent infections of the human germ line 10 millions of years ago (Tristem, 2000).

Very few complete HERV sequences with open reading frames for all encoded proteins have been identified in current human genomes so far (Turner et al., 2001; Belshaw et al., 2005a) as most HERV sequences have been mutated or recombined to solo-LTRs during hominoid evolution. It is clear, however, that TEs are highly polymorphic in populations (including humans) and polymorphic HERVs are linked to diseases (Wallace et al., 2018). It cannot be excluded that complete HERV sequences that are replication-competent might exist at low frequency (Belshaw et al., 2005a). The release of virus-like particles in the context of cancer has been documented (Brodsky et al., 1993; Contreras-Galindo et al., 2015), but no human HERV elements and very few mouse ERVs so far have been shown to complete the integration process. However, several loci show potential for coding for one or the other HERV protein (Table 2; Seifarth et al., 2005; Nakagawa and Takahashi, 2016), which theoretically could recombine to form a functional element or through a process combining recombination and trans-complementation (Dewannieux et al., 2006). Indeed, incomplete HERVs might retrotranspose through a process called “complementation in *trans*” (Mager and Freeman, 1995; Belshaw et al., 2005b), which requires the simultaneous expression of HERV elements encoding a polyprotein with ORFs for both Gag (group antigen) and Pol, complemented by another element (or the same), encoding a functional Env (envelop) protein. *Trans* complementation of HERVs has been experimentally demonstrated by reconstituting a HRV-K(HML-2) element, which was infectious and depended on a capsid-involving infection of another cell and could lead to the reintegration of a new synthetic HERV copy *in vitro* (Dewannieux et al., 2006). Capsid-independent mobilization and amplification through retrotransposition has been suggested (Belshaw et al., 2005b), but the mechanisms by which this could be possible remain unknown. Retrotransposition in “*cis*” uses the proteins encoded by a given HERV element (or several HERVs *via trans* complementation) to “copy-and-paste” elsewhere in the genome, which requires a functional Gag and Pol, but not Env protein (as this process does not require infection). This is known for the LTR retrotransposons Ty1 and *Drosophila* copia (Dewannieux and Heidmann, 2005) as well as for mouse IAP elements (Ribet et al., 2008), but has not been documented for HERVs and was absent in the synthetic HERV-K *Phoenix* (Dewannieux et al., 2006). Another described mechanism for HERV amplification is the *trans*-mobilization of HERV-W elements by the LINE-1 machinery (Costas, 2002; Pavlíček et al., 2002; Grandi and Tramontano, 2017). Thus, although experimental evidence *in vivo* is lacking, HERV retrotransposition (within the same cell or *via* a capsid-involving infection of another cell) cannot be completely excluded (Romanish et al., 2010; Xue et al., 2020). Together, this theoretical framework of possible HERV retrotransposition activity implies that IN-induced genomic instability might be possible. The presence of a functional IN protein, which has been demonstrated for HERV-K (Kitamura et al., 1996) for instance, is dependent on the processing of the Pol polyprotein. However, not much is known concerning

this process and whether it is possible in the absence of an infectious capsid. Some recent evidence in the context of another Pol encoded RT protein suggests that protease cleavage of the Pol polyprotein is possible in neurons and astrocytes, generating full-length RT proteins (Manghera et al., 2015) and possibly a functional IN protein. Supposing that IN is processed, it can form a so-called pre-integration complex together with the reverse transcribed dsDNA and host proteins. IN prepares the linear dsDNA ends for integration and joins these ends to the host DNA through a strand transfer reaction leaving behind DNA lesions needing to be repaired by the host DNA repair machinery (reviewed in Lesbats et al., 2016). During this process, aberrant IN activity or a failure in DNA repair (as in aging) renders the cell prone to the formation of DSB (Bray et al., 2016), which can lead to the loss of cellular functionality and, ultimately, when the cell is overwhelmed, to cell death (Hanahan and Weinberg, 2011). It remains however unclear whether this genomic instability stems from TE mobilization or the expression of the IN protein alone.

Human ERVs are expressed at low levels in the brain (Kurth and Bannert, 2010) and can be activated in several neurological diseases (Küry et al., 2018; Gröger et al., 2021). One example is ALS. HERV-K loci containing open reading frames for IN are increasingly transcribed in ALS cortical tissues (Douville et al., 2011) and RT (and Env) proteins are specifically expressed in ALS cortical neurons (Douville et al., 2011; Li et al., 2015), suggesting that IN might also be expressed. Genomic instability has been observed in ALS (Deng et al., 2014; Maizels, 2015) as well as in other neurological diseases (like schizophrenia) where HERV-K expression is upregulated (Smith et al., 2010; Kushima et al., 2017). While formal evidence of HERV-K IN-mediated DNA damage is lacking, this evidence provides a fertile ground for further studies in this direction.

RETROTRANSPOSONS AS NEW THERAPEUTIC TARGETS IN NEURODEGENERATION

As we have developed above, the activation of coding LINE-1 and potentially HERV retrotransposons can permit the production of functional DNA cleaving proteins like the LINE-1 encoded EN or the HERV encoded IN, the presence and activity of which endanger the host genome and might contribute to aging and neurodegeneration. In the following section, we will discuss the potential of targeting retrotransposons to prevent DNA damage in the context of aging and age-related NDs.

Inhibition of retrotransposon activity can be achieved at multiple levels (Figure 2), namely, transcription, mRNA stability, translation, degradation, and enzymatic activities of the encoded proteins. Modifying environmental regulators of TEs or specific drugs intervening at various steps of the TE lifecycle are already partly available and constitute attractive tools to explore as a possible treatment of NDs.

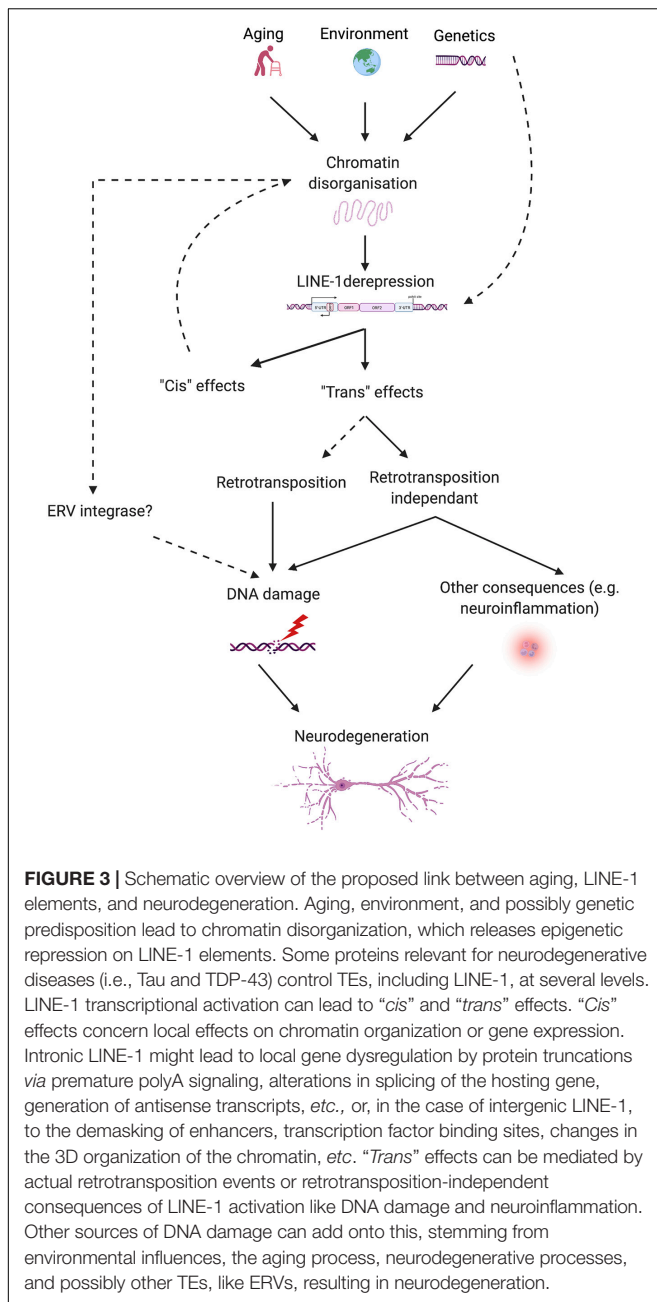
A potentially interesting environmental regulator of RTs is caloric restriction. The impact of dietary restriction on lifespan and/or healthspan (length of life deprived of any age-related

disease) in various organisms, ranging from invertebrates to non-human primates, is well documented (Fontana and Partridge, 2015). This is thought to be mediated by a downturn in the metabolic rate which, among many other effects (reviewed in Martin et al., 2007), reduces the generation of reactive oxidative species (Bianchi et al., 2016) and inflammation (Ma et al., 2020) and increases DNA repair (Rao, 2003); pathways with relevance for RT activation. Indeed, caloric restriction in mice results in a drastic decrease in the expression of TEs in liver and muscle, accompanied by an aging-related restructuring of chromatin, suggesting that dietary restriction might also modulate aging-induced chromatin remodeling and thereby reduce the transcription of TEs (De Cecco et al., 2013). Many sirtuins positively affect lifespan (Kanfi et al., 2012; Satoh et al., 2013), and are positively regulated by caloric restriction (Wątroba and Szukiewicz, 2016). The sirtuins might thus be one of the hubs for the effects of caloric restrictions linking TE regulation and aging-induced chromatin alterations.

Two sirtuins, Sirt1 and Sirt6, are of particular interest since they act as NAD⁺-dependent deacetylases of H3K9, thereby favoring the formation of H3K9me3 repressive chromatin (Zhong et al., 2010; Poulouse and Raju, 2015) on LINE-1 and HERVs (Kato et al., 2018). In addition, Sirt1 activity regulates the histone methyltransferase SUV39H1 (suppressor of variegation 3-9 homolog 1) (Vaquero et al., 2004, 2007), which is also known to repress LINE-1 (Bulut-Karslioglu et al., 2014). A correlation between Sirt1 expression and LINE-1 promoter methylation levels has been identified in the human retina in the context of age-related macular degeneration (AMD) (Maugeri et al., 2019). As described above, Sirt6, in addition to being associated with aging and neurodegeneration (Kaluski et al., 2017; Portillo et al., 2021), negatively regulates LINE-1 in an age-dependent manner (Van Meter et al., 2014; Simon et al., 2019) and promotes genomic stability (Mostoslavsky et al., 2006).

Mice deficient for the DNA repair enzyme Ercc1 display an accelerated aging phenotype. Caloric restriction in these mice significantly decreases DNA damage, leads to increased lifespan and shows a protective effect on neuronal function (Vermeij et al., 2016). This is consistent with other studies showing that caloric restriction and intermittent fasting protect from cognitive decline in mouse models of AD (Halagappa et al., 2007; Stekovic et al., 2019). It is thus tempting to speculate that some of the life span-regulating effects of caloric restriction, namely, a reduction in DNA damage and inflammation, could be partly due to a decrease in RT activation upon caloric restriction *via* epigenetic containment of TEs. First evidence for a beneficial effect of caloric restriction in humans (Il'yasova et al., 2018; Redman et al., 2018) suggests that dietary interventions, including caloric restriction, could be a non-specific strategy to reduce RT expression, decrease DNA damage and inflammation, and, in turn, in the context of age-related diseases, prevent neurodegeneration.

On a transcriptional level, the homeodomain protein Engrailed could be an interesting target for LINE-1 repression in dopaminergic neurons. Engrailed is a conserved homeoprotein transcription factor involved in ventral midbrain dopaminergic neuron and cerebellum development and, in the adult ventral midbrain, specifically expressed in dopaminergic neurons and



important for their survival (Alvarez-Fischer et al., 2011). Upon acute oxidative stress inflicted on midbrain dopaminergic neurons *in vivo*, Engrailed blocks cell death and restores epigenetic marks disrupted by oxidative stress (Rekaik et al., 2015). Chromatin immunoprecipitation experiments showed that Engrailed specifically binds to LINE-1 promoters and is a transcriptional repressor of LINE-1 in mice *in vivo*. By blocking LINE-1 expression, Engrailed prevented DNA damage and neuronal death induced by oxidative stress in mouse dopaminergic neurons (Blaudin de Thé et al., 2018). Importantly, the Engrailed protein can be internalized into live cells, enabling its use as a therapeutic protein (Di Nardo et al., 2018).

A more specific way to inhibit TE activity is using inhibitors of one of their encoded functional protein subunits. The one protein shared by LINE-1 and HERVs, and to which they owe their name, is the RT. Several FDA-approved drugs used in AIDS (acquired immunodeficiency syndrome) therapies that target HIV (human immunodeficiency virus) RT also efficiently inhibit the RT enzymes of LINE-1 (Dai et al., 2014; Krug et al., 2017; Liu et al., 2019) and the RT of HERVs (Garcia-Montojo et al., 2021). Blocking LINE-1 with the nucleoside reverse transcriptase inhibitor (NRTI) stavudine in the context of an acute oxidative stress, reduced DNA damage and mitigated the neurodegeneration of dopaminergic neurons (Blaudin de Thé et al., 2018). Lamivudine was shown to almost completely block the synthesis of LINE-1 cDNA, leading to a reduction in the expression of IFN-1 response genes and LINE-1 associated neuroinflammation (De Cecco et al., 2019). Similarly, inhibition of LINE-1 activity with NRTIs in Sirt-6-deficient mice (exhibiting upregulation of LINE-1, see above) rescued DNA damage (Simon et al., 2019). These results are surprising, as NRTIs are reverse-transcriptase inhibitors and do not inhibit LINE-1 EN activity. It is not clear how NRTIs can reduce EN-mediated DNA damage. It was proposed that NRTIs could terminate an integration attempt, thereby facilitating the access of the DNA damage response (DDR) machinery to damaged sites, as NRTI treatments result in less LINE-1 RNA bound to chromatin (Blaudin de Thé et al., 2018). NRTIs have been shown to be efficient in *in vitro* cell cultures or mouse models, but whether they can confer protection against neurodegeneration in diseases linked to RT activation is currently under investigation. Clinical safety and tolerability in humans have been investigated in the context of ALS in the “Lighthouse trial” (Gold et al., 2019). In this trial, a combination of NRTIs, already used in the context of AIDS, called Triumeq (abacavir, lamivudine, and dolutegravir) was tested. Triumeq was safe and well tolerated by patients and a phase 3 clinical trial has been scheduled (Gold et al., 2019). The efficacy of NRTIs to treat other NDs is currently ongoing in AD (Pizarro and Cristofari, 2016; Salloway, 2021) and continuing in ALS (National Institute of Neurological Disorders and Stroke [NINDS], 2021). Based on the current data on LINE-1 as a source of genomic instability in neurons, LINE-1 EN inhibitors would be of interest but are unfortunately not available.

In addition to RT inhibitors, efficient inhibitors of HIV IN were developed to treat AIDS. Although with lower efficacy, these inhibitors are also effective against the HERV-K/HML-2 IN *in vitro* (Contreras-Galindo et al., 2017; Tyagi et al., 2017). As discussed above, based on the scarcity of evidence for HERV-mediated genomic instability, the use of IN inhibitors is of less interest in the context of NDs.

CONCLUSION

In view of the evidence discussed in this review, a novel pathogenic axis for NDs emerges, linking age and neurodegeneration based on the aging-induced alteration of heterochromatin organization, subsequent LINE-1

derepression, and LINE-1-related genomic instability leading to neurodegeneration. This hypothesis reconciles the transposon theory (Driver and McKechnie, 1992), extended by the LINEage theory stipulating the importance of non-retrotransposition dependent DNA damage in the aging process (St. Laurent et al., 2010), with the heterochromatin theory of aging (Villeponteau, 1997) and provides a molecular basis to explain why age is the major risk factor for NDs. Derepression of transposable elements including LINE-1 can have multiple consequences on cellular functions of which genomic instability appears to be of major importance. Examples of neurodegenerative processes favoring TE derepression are emerging (Guo et al., 2018; Sun et al., 2018) and suggest that genetic risk together with environmental factors and age in combination might determine the individual risk to develop a neurodegenerative disease (Figure 3). As such, this pathogenic axis could be shared by many age-related NDs and regional susceptibility could be determined by the combination of TE regulatory factors specific for certain neuronal populations or brain regions. Of specific interest is the potential of this emerging axis not only to foster the understanding of the pathogenesis of NDs but also to provide a point of attack for the development of urgently needed disease-modifying treatments. Much is still to learn and the coming years will likely increase our understanding of the role that TEs play in the physiology and pathophysiology of the brain.

REFERENCES

- Adamec, E., Vonsattel, J. P., and Nixon, R. A. (1999). DNA strand breaks in Alzheimer's disease. *Brain Res.* 849, 67–77. doi: 10.1016/s0006-8993(99)02004-1
- Alvarez-Fischer, D., Fuchs, J., Castagner, F., Stettler, O., Massiani-Beaudoin, O., Moya, K. L., et al. (2011). Engrailed protects mouse midbrain dopaminergic neurons against mitochondrial complex I insults. *Nat. Neurosci.* 14, 1260–1266. doi: 10.1038/nn.2916
- Antony, J. M., van Marle, G., Opii, W., Butterfield, D. A., Mallet, F., Yong, V. W., et al. (2004). Human endogenous retrovirus glycoprotein-mediated induction of redox reactants causes oligodendrocyte death and demyelination. *Nat. Neurosci.* 7, 1088–1095. doi: 10.1038/nn1319
- Baillie, J. K., Barnett, M. W., Upton, K. R., Gerhardt, D. J., Richmond, T. A., De Sapio, F., et al. (2011). Somatic retrotransposition alters the genetic landscape of the human brain. *Nature* 479, 534–537. doi: 10.1038/nature10531
- Baker, D. J., and Petersen, R. C. (2018). Cellular senescence in brain aging and neurodegenerative diseases: evidence and perspectives. *J. Clin. Invest.* 128, 1208–1216. doi: 10.1172/JCI95145
- Banuelos-Sanchez, G., Sanchez, L., Benitez-Guijarro, M., Sanchez-Carnerero, V., Salvador-Palomeque, C., Tristan-Ramos, P., et al. (2019). Synthesis and characterization of specific reverse transcriptase inhibitors for mammalian LINE-1 retrotransposons. *Cell Chem. Biol.* 26, 1095–1109.e14. doi: 10.1016/j.chembiol.2019.04.010
- Barbosa, M. C., Grosso, R. A., and Fader, C. M. (2019). Hallmarks of aging: an autophagic perspective. *Front. Endocrinol.* 9:790. doi: 10.3389/fendo.2018.00790
- Belancio, V. P., Roy-Engel, A. M., Pochampally, R. R., and Deininger, P. (2010). Somatic expression of LINE-1 elements in human tissues. *Nucleic Acids Res.* 38, 3909–3922. doi: 10.1093/nar/gkq132
- Belgnaoui, S. M., Gosden, R. G., Semmes, O. J., and Haoudi, A. (2006). Human LINE-1 retrotransposon induces DNA damage and apoptosis in cancer cells. *Cancer Cell Int.* 6:13. doi: 10.1186/1475-2867-6-13
- Belshaw, R., Dawson, A. L. A., Woolven-Allen, J., Redding, J., Burt, A., and Tristram, M. (2005a). Genomewide screening reveals high levels of insertional polymorphism in the human endogenous retrovirus family HERV-K(HML2):

AUTHOR CONTRIBUTIONS

All authors listed have made a substantial, direct, and intellectual contribution to the work, and approved it for publication.

FUNDING

This work was supported by grants from the Fondation de France (00086320 to JF), Fondation du Collège de France (to JF), and National French Agency for Research (Agence Nationale de la Recherche (ANR-20-CE16-0022 NEURAGE to JF). RZ and TB are enrolled in the Ecole Doctorale 3C at the Sorbonne Université, Paris, France. RZ acknowledges the “Fondation pour la Recherche sur Alzheimer’s” (FRA) for a fellowship. TB acknowledges the “Fondation du Collège de France” for a fellowship.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the Fondation Bettencourt Schueller for their support. Images were created with BioRender.com (publishing license to EP-H).

- implications for present-day activity. *J. Virol.* 79, 12507–12514. doi: 10.1128/JVI.79.19.12507-12514.2005
- Belshaw, R., Katzourakis, A., Paces, J., Burt, A., and Tristram, M. (2005b). High copy number in human endogenous retrovirus families is associated with copying mechanisms in addition to reinfection. *Mol. Biol. Evol.* 22, 814–817. doi: 10.1093/molbev/msi088
- Berson, A., Nativo, R., Berger, S. L., and Bonini, N. M. (2018). Epigenetic regulation in neurodegenerative diseases. *Trends Neurosci.* 41, 587–598. doi: 10.1016/j.tins.2018.05.005
- Bianchi, V. E., Falcioni, G., Bianchi, V. E., and Falcioni, G. (2016). Reactive oxygen species, health and longevity. *AIMS Mol. Sci.* 3, 479–504. doi: 10.3934/molsci.2016.4.479
- Blaudun de Thé, F., Rekaik, H., Peze-Heidsieck, E., Massiani-Beaudoin, O., Joshi, R. L., Fuchs, J., et al. (2018). Engrailed homeoprotein blocks degeneration in adult dopaminergic neurons through LINE-1 repression. *EMBO J.* 37:e97374. doi: 10.15252/embj.201797374
- Boeke, J. D., and Stoye, J. P. (1997). “Retrotransposons, Endogenous Retroviruses, and the Evolution of Retroelements,” in *Retroviruses*, eds J. M. Coffin, S. H. Hughes, and H. E. Varmus (Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Bolam, J. P., and Pissadaki, E. K. (2012). Living on the edge with too many mouths to feed: Why dopamine neurons die. *Mov. Disord.* 27, 1478–1483. doi: 10.1002/mds.25135
- Bray, S., Turnbull, M., Hebert, S., and Douville, R. N. (2016). Insight into the ERVK Integrase - Propensity for DNA Damage. *Front. Microbiol.* 7:1941. doi: 10.3389/fmicb.2016.01941
- Brodsky, I., Foley, B., Haines, D., Johnston, J., Cuddy, K., and Gillespie, D. (1993). Expression of HERV-K proviruses in human leukocytes. *Blood* 81, 2369–2374.
- Bulut-Karslioglu, A., De La Rosa-Velázquez, I. A., Ramirez, F., Barenboim, M., Onishi-Seebacher, M., Arand, J., et al. (2014). Suv39h-Dependent H3K9me3 marks intact retrotransposons and silences LINE elements in mouse embryonic stem cells. *Mol. Cell* 55, 277–290. doi: 10.1016/j.molcel.2014.05.029
- Cao, X., Jin, X., and Liu, B. (2020). The involvement of stress granules in aging and aging-associated diseases. *Aging Cell* 19:e13136. doi: 10.1111/acel.13136

- Castro-Diaz, N., Ecco, G., Coluccio, A., Kapopoulou, A., Yazdanpanah, B., Friedli, M., et al. (2014). Evolutionally dynamic L1 regulation in embryonic stem cells. *Genes Dev.* 28, 1397–1409. doi: 10.1101/gad.241661.114
- Chatterjee, N., and Walker, G. C. (2017). Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis. *Environ. Mol. Mutagen.* 58, 235–263. doi: 10.1002/em.22087
- Childs, B. G., Gluscevic, M., Baker, D. J., Laberge, R.-M., Marquess, D., Dananberg, J., et al. (2017). Senescent cells: an emerging target for diseases of ageing. *Nat. Rev. Drug Discov.* 16, 718–735. doi: 10.1038/nrd.2017.116
- Chow, H., and Herrup, K. (2015). Genomic integrity and the ageing brain. *Nat. Rev. Neurosci.* 16, 672–684. doi: 10.1038/nrn4020
- Contreras-Galindo, R., Dube, D., Fujinaga, K., Kaplan, M. H., and Markovitz, D. M. (2017). Susceptibility of human endogenous retrovirus type K to reverse transcriptase inhibitors. *J. Virol.* 91:e01309-17. doi: 10.1128/JVI.01309-17
- Contreras-Galindo, R., Kaplan, M. H., Dube, D., Gonzalez-Hernandez, M. J., Chan, S., Meng, F., et al. (2015). Human endogenous retrovirus Type K (HERV-K) particles package and transmit HERV-K-Related Sequences. *J. Virol.* 89, 7187–7201. doi: 10.1128/JVI.00544-15
- Costas, J. (2002). Characterization of the intragenomic spread of the human endogenous retrovirus family HERV-W. *Mol. Biol. Evol.* 19, 526–533.
- Coufal, N. G., Garcia-Perez, J. L., Peng, G. E., Yeo, G. W., Mu, Y., Lovci, M. T., et al. (2009). L1 retrotransposition in human neural progenitor cells. *Nature* 460, 1127–1131. doi: 10.1038/nature08248
- d'Adda di Fagagna, F. (2008). Living on a break: cellular senescence as a DNA-damage response. *Nat. Rev. Cancer* 8, 512–522. doi: 10.1038/nrc2440
- Dai, L., Huang, Q., and Boeke, J. D. (2011). Effect of reverse transcriptase inhibitors on LINE-1 and Ty1 reverse transcriptase activities and on LINE-1 retrotransposition. *BMC Biochem.* 12:18. doi: 10.1186/1471-2091-12-18
- Dai, L., Mahajan, S. D., Guo, C., Zhang, T., Wang, W., Li, T., et al. (2014). Spectrum of central nervous system disorders in hospitalized HIV/AIDS patients (2009–2011) at a major HIV/AIDS referral center in Beijing, China. *J. Neurol. Sci.* 342, 88–92. doi: 10.1016/j.jns.2014.04.031
- De Cecco, M., Criscione, S. W., Peckham, E. J., Hillenmeyer, S., Hamm, E. A., Manivannan, J., et al. (2013). Genomes of replicatively senescent cells undergo global epigenetic changes leading to gene silencing and activation of transposable elements. *Aging Cell* 12, 247–256. doi: 10.1111/acel.12047
- De Cecco, M., Ito, T., Petrashen, A. P., Elias, A. E., Skvir, N. J., Criscione, S. W., et al. (2019). L1 drives IFN in senescent cells and promotes age-associated inflammation. *Nature* 566, 73–78. doi: 10.1038/s41586-018-0784-9
- Deng, Q., Holler, C. J., Taylor, G., Hudson, K. F., Watkins, W., Gearing, M., et al. (2014). FUS is phosphorylated by DNA-PK and accumulates in the cytoplasm after DNA damage. *J. Neurosci.* 34, 7802–7813. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0172-14.2014
- Dennis, S., Sheth, U., Feldman, J. L., English, K. A., and Priess, J. R. (2012). *C. elegans* germ cells show temperature and age-dependent expression of Cer1, a Gypsy/Ty3-related retrotransposon. *PLoS Pathog.* 8:e1002591. doi: 10.1371/journal.ppat.1002591
- Dewannieux, M., Harper, F., Richaud, A., Letzelter, C., Ribet, D., Pierron, G., et al. (2006). Identification of an infectious progenitor for the multiple-copy HERV-K human endogenous retroelements. *Genome Res.* 16, 1548–1556. doi: 10.1101/gr.5565706
- Dewannieux, M., and Heidmann, T. (2005). LINES, SINEs and processed pseudogenes: parasitic strategies for genome modeling. *Cytogenet. Genome Res.* 110, 35–48. doi: 10.1159/000084936
- Di Micco, R., Krizhanovskiy, V., Baker, D., and d'Adda di Fagagna, F. (2021). Cellular senescence in ageing: from mechanisms to therapeutic opportunities. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 22, 75–95. doi: 10.1038/s41580-020-00314-w
- Di Nardo, A. A., Fuchs, J., Joshi, R. L., Moya, K. L., and Prochiantz, A. (2018). The Physiology of Homeoprotein Transduction. *Physiol. Rev.* 98, 1943–1982. doi: 10.1152/physrev.00018.2017
- Di Nardo, A. A., Nedelec, S., Trembleau, A., Volovitch, M., Prochiantz, A., and Luz Montesinos, M. (2007). Dendritic localization and activity-dependent translation of Engrailed1 transcription factor. *Mol. Cell. Neurosci.* 35, 230–236. doi: 10.1016/j.mcn.2007.02.015
- Dobbin, M. M., Madabhushi, R., Pan, L., Chen, Y., Kim, D., Gao, J., et al. (2013). SIRT1 collaborates with ATM and HDAC1 to maintain genomic stability in neurons. *Nat. Neurosci.* 16, 1008–1015. doi: 10.1038/nn.3460
- Douville, R., Liu, J., Rothstein, J., and Nath, A. (2011). Identification of active loci of a human endogenous retrovirus in neurons of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Neurol.* 69, 141–151. doi: 10.1002/ana.22149
- Douville, R. N., and Nath, A. (2017). Human endogenous retrovirus-K and TDP-43 expression bridges ALS and HIV neuropathology. *Front. Microbiol.* 8:1986. doi: 10.3389/fmicb.2017.01986
- Driver, C. J., and McKechnie, S. W. (1992). Transposable elements as a factor in the aging of *Drosophila melanogaster*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 673, 83–91. doi: 10.1111/j.1749-6632.1992.tb27439.x
- Ecco, G., Imbeault, M., and Trono, D. (2017). KRAB zinc finger proteins. *Development* 144, 2719–2729. doi: 10.1242/dev.132605
- Eilam, R., Peter, Y., Elson, A., Rotman, G., Shiloh, Y., Groner, Y., et al. (1998). Selective loss of dopaminergic nigro-striatal neurons in brains of Atm-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 12653–12656. doi: 10.1073/pnas.95.21.12653
- Eitan, E., Hutchison, E. R., and Mattson, M. P. (2014). Telomere shortening in neurological disorders: an abundance of unanswered questions. *Trends Neurosci.* 37, 256–263. doi: 10.1016/j.tins.2014.02.010
- Elbarbary, R. A., Lucas, B. A., and Maquat, L. E. (2016). Retrotransposons as regulators of gene expression. *Science* 351:aac7247. doi: 10.1126/science.aac7247
- Erwin, J. A., Marchetto, M. C., and Gage, F. H. (2014). Mobile DNA elements in the generation of diversity and complexity in the brain. *Nat. Rev. Neurosci.* 15, 497–506. doi: 10.1038/nrn3730
- Erwin, J. A., Paquola, A. C. M., Singer, T., Gallina, I., Novotny, M., Quayle, C., et al. (2016). L1-associated genomic regions are deleted in somatic cells of the healthy human brain. *Nat. Neurosci.* 19, 1583–1591. doi: 10.1038/nn.4388
- Ervony, G. D., Cai, X., Lee, E., Hills, L. B., Elhosary, P. C., Lehmann, H. S., et al. (2012). Single-Neuron Sequencing Analysis of L1 Retrotransposition and Somatic Mutation in the Human Brain. *Cell* 151, 483–496. doi: 10.1016/j.cell.2012.09.035
- Faulkner, G. J., and Garcia-Perez, J. L. (2017). L1 Mosaicism in mammals: extent, effects, and evolution. *Trends Genet.* 33, 802–816. doi: 10.1016/j.tig.2017.07.004
- Faulkner, G. J., Kimura, Y., Daub, C. O., Wani, S., Plessy, C., Irvine, K. M., et al. (2009). The regulated retrotransposon transcriptome of mammalian cells. *Nat. Genet.* 41, 563–571. doi: 10.1038/ng.368
- Fidaleo, M., Cavallucci, V., and Pani, G. (2017). Nutrients, neurogenesis and brain ageing: from disease mechanisms to therapeutic opportunities. *Biochem. Pharmacol.* 141, 63–76. doi: 10.1016/j.bcp.2017.05.016
- Fontana, L., and Partridge, L. (2015). Promoting health and longevity through diet: from model organisms to humans. *Cell* 161, 106–118. doi: 10.1016/j.cell.2015.02.020
- Fragola, G., Mabb, A. M., Taylor-Blake, B., Niehaus, J. K., Chronister, W. D., Mao, H., et al. (2020). Deletion of Topoisomerase 1 in excitatory neurons causes genomic instability and early onset neurodegeneration. *Nat. Commun.* 11:1962. doi: 10.1038/s41467-020-15794-9
- Gan, L., Cookson, M. R., Petrucelli, L., and La Spada, A. R. (2018). Converging pathways in neurodegeneration, from genetics to mechanisms. *Nat. Neurosci.* 21, 1300–1309. doi: 10.1038/s41593-018-0237-7
- Gao, J., Wang, L., Liu, J., Xie, F., Su, B., and Wang, X. (2017). Abnormalities of mitochondrial dynamics in neurodegenerative diseases. *Antioxidants* 6:E25. doi: 10.3390/antiox6020025
- Garcia-Montojo, M., Doucet-O'Hare, T., Henderson, L., and Nath, A. (2018). Human endogenous retrovirus-K (HML-2): a comprehensive review. *Crit. Rev. Microbiol.* 44, 715–738. doi: 10.1080/1040841X.2018.1501345
- Garcia-Montojo, M., Fathi, S., Norato, G., Smith, B. R., Rowe, D. B., Kiernan, M. C., et al. (2021). Inhibition of HERV-K (HML-2) in amyotrophic lateral sclerosis patients on antiretroviral therapy. *J. Neurol. Sci.* 423:117358. doi: 10.1016/j.jns.2021.117358
- Gasior, S. L., Wakeman, T. P., Xu, B., and Deininger, P. L. (2006). The Human LINE-1 retrotransposon creates DNA double-strand breaks. *J. Mol. Biol.* 357, 1383–1393. doi: 10.1016/j.jmb.2006.01.089
- Ghosh, A., Tyson, T., George, S., Hildebrandt, E. N., Steiner, J. A., Madaj, Z., et al. (2016). Mitochondrial pyruvate carrier regulates autophagy, inflammation, and

- neurodegeneration in experimental models of Parkinsons disease. *Sci. Transl. Med.* 8:368ra174. doi: 10.1126/scitranslmed.aag2210
- Gilbert, S. F. (2000). *Aging: The Biology of Senescence. Developmental Biology. 6th edition*. Available online at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK10041/> (accessed July 30, 2021).
- Gold, J., Rowe, D. B., Kiernan, M. C., Vucic, S., Mathers, S., van Eijk, R. P. A., et al. (2019). Safety and tolerability of Triumeq in amyotrophic lateral sclerosis: the Lighthouse trial. *Amyotroph. Lateral Scler. Frontotemporal Degener.* 20, 595–604. doi: 10.1080/21678421.2019.1632899
- Goodier, J. L. (2014). Retrotransposition in tumors and brains. *Mob. DNA* 5:11. doi: 10.1186/1759-8753-5-11
- Goodier, J. L., Cheung, L. E., and Kazazian, H. H. (2013). Mapping the LINE1 ORF1 protein interactome reveals associated inhibitors of human retrotransposition. *Nucleic Acids Res.* 41, 7401–7419. doi: 10.1093/nar/gkt512
- Goodier, J. L., and Kazazian, H. H. (2008). Retrotransposons revisited: the restraint and rehabilitation of parasites. *Cell* 135, 23–35. doi: 10.1016/j.cell.2008.09.022
- Goodier, J. L., Zhang, L., Vetter, M. R., and Kazazian, H. H. (2007). LINE-1 ORF1 protein localizes in stress granules with other RNA-binding proteins, including components of RNA interference RNA-induced silencing complex. *Mol. Cell. Biol.* 27, 6469–6483. doi: 10.1128/MCB.00332-07
- Gorbunova, V., Seluanov, A., Mita, P., McKerrow, W., Fenyö, D., Boeke, J. D., et al. (2021). The role of retrotransposable elements in ageing and age-associated diseases. *Nature* 596, 43–53. doi: 10.1038/s41586-021-03542-y
- Grandi, N., and Tramontano, E. (2017). Type W human endogenous retrovirus (HERV-W) integrations and their mobilization by L1 machinery: contribution to the human transcriptome and impact on the host physiopathology. *Viruses* 9:E162. doi: 10.3390/v9070162
- Gröger, V., Emmer, A., Staega, M. S., and Cynis, H. (2021). Endogenous retroviruses in nervous system disorders. *Pharmaceuticals* 14:70. doi: 10.3390/ph14010070
- Guo, C., Jeong, H.-H., Hsieh, Y.-C., Klein, H.-U., Bennett, D. A., De Jager, P. L., et al. (2018). Tau Activates Transposable Elements in Alzheimer's Disease. *Cell Rep.* 23, 2874–2880. doi: 10.1016/j.celrep.2018.05.004
- Guo, H., Chitiprolu, M., Gagnon, D., Meng, L., Perez-Iratxeta, C., Lagace, D., et al. (2014). Autophagy supports genomic stability by degrading retrotransposon RNA. *Nat. Commun.* 5:5276. doi: 10.1038/ncomms6276
- Halagappa, V. K. M., Guo, Z., Pearson, M., Matsuoka, Y., Cutler, R. G., Laferla, F. M., et al. (2007). Intermittent fasting and caloric restriction ameliorate age-related behavioral deficits in the triple-transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Dis.* 26, 212–220. doi: 10.1016/j.nbd.2006.12.019
- Hanahan, D., and Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646–674. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013
- Hata, K., and Sakaki, Y. (1997). Identification of critical CpG sites for repression of L1 transcription by DNA methylation. *Gene* 189, 227–234. doi: 10.1016/s0378-1119(96)00856-6
- He, J., Fu, X., Zhang, M., He, F., Li, W., Abdul, M. M., et al. (2019). Transposable elements are regulated by context-specific patterns of chromatin marks in mouse embryonic stem cells. *Nat. Commun.* 10:34. doi: 10.1038/s41467-018-08006-y
- Heaton, S. E., Pinto, H. D., Mishra, L. N., Hamilton, G. A., Wheat, J. C., Swist-Rosowska, K., et al. (2020). H1 linker histones silence repetitive elements by promoting both histone H3K9 methylation and chromatin compaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 117, 14251–14258. doi: 10.1073/pnas.1920725117
- Heras, S. R., Macias, S., Cáceres, J. F., and Garcia-Perez, J. L. (2014). Control of mammalian retrotransposons by cellular RNA processing activities. *Mob. Genet. Elem.* 4:e28439. doi: 10.4161/mge.28439
- Heras, S. R., Macias, S., Plass, M., Fernandez, N., Cano, D., Eyra, E., et al. (2013). The Microprocessor controls the activity of mammalian retrotransposons. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 20, 1173–1181. doi: 10.1038/nsmb.2658
- Herranz, N., and Gil, J. (2018). Mechanisms and functions of cellular senescence. *J. Clin. Invest.* 128, 1238–1246. doi: 10.1172/JCI95148
- Hill, A. F. (2019). Extracellular vesicles and neurodegenerative diseases. *J. Neurosci.* 39, 9269–9273. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0147-18.2019
- Hou, Y., Dan, X., Babbar, M., Wei, Y., Hasselbalch, S. G., Croteau, D. L., et al. (2019). Ageing as a risk factor for neurodegenerative disease. *Nat. Rev. Neurol.* 15, 565–581. doi: 10.1038/s41582-019-0244-7
- Hu, S., Li, J., Xu, F., Mei, S., Le Duff, Y., Yin, L., et al. (2015). SAMHD1 Inhibits LINE-1 retrotransposition by promoting stress granule formation. *PLoS Genet.* 11:e1005367. doi: 10.1371/journal.pgen.1005367
- Ilyasova, D., Fontana, L., Bhapkar, M., Pieper, C. F., Spasojevic, I., Redman, L. M., et al. (2018). Effects of 2 years of caloric restriction on oxidative status assessed by urinary F2-isoprostanes: the CALERIE 2 randomized clinical trial. *Aging Cell* 17:e12719. doi: 10.1111/accel.12719
- Ismail, I. H., and Hendzel, M. J. (2008). The γ -H2A.X: Is it just a surrogate marker of double-strand breaks or much more? *Environ. Mol. Mutagen.* 49, 73–82. doi: 10.1002/em.20358
- Iturria-Medina, Y., and Evans, A. C. (2015). On the central role of brain connectivity in neurodegenerative disease progression. *Front. Aging Neurosci.* 7:90. doi: 10.3389/fnagi.2015.00090
- Jacobs, F. M. J., Greenberg, D., Nguyen, N., Haeussler, M., Ewing, A. D., Katzman, S., et al. (2014). An evolutionary arms race between KRAB zinc-finger genes ZNF91/93 and SVA/L1 retrotransposons. *Nature* 516, 242–245. doi: 10.1038/nature13760
- Jakovcevski, M., and Akbarian, S. (2012). Epigenetic mechanisms in neurological disease. *Nat. Med.* 18, 1194–1204. doi: 10.1038/nm.2828
- Johnson, J., Mercado-Ayon, E., Mercado-Ayon, Y., Dong, Y. N., Halawani, S., Ngaba, L., et al. (2021). Mitochondrial dysfunction in the development and progression of neurodegenerative diseases. *Arch. Biochem. Biophys.* 702:108698. doi: 10.1016/j.abb.2020.108698
- Jurk, D., Wang, C., Miwa, S., Maddick, M., Korolchuk, V., Tsolou, A., et al. (2012). Postmitotic neurons develop a p21-dependent senescence-like phenotype driven by a DNA damage response: a senescence-like phenotype in postmitotic neurons. *Aging Cell* 11, 996–1004. doi: 10.1111/j.1474-9726.2012.00870.x
- Kalia, L. V., and Lang, A. E. (2015). Parkinson's disease. *Lancet* 386, 896–912. doi: 10.1016/S0140-6736(14)61393-3
- Kaluski, S., Portillo, M., Besnard, A., Stein, D., Einav, M., Zhong, L., et al. (2017). Neuroprotective functions for the histone deacetylase SIRT6. *Cell Rep.* 18, 3052–3062. doi: 10.1016/j.celrep.2017.03.008
- Kanfi, Y., Naiman, S., Amir, G., Peshti, V., Zinman, G., Nahum, L., et al. (2012). The sirtuin SIRT6 regulates lifespan in male mice. *Nature* 483, 218–221. doi: 10.1038/nature10815
- Karch, C. M., Wen, N., Fan, C. C., Yokoyama, J. S., Kouri, N., Ross, O. A., et al. (2018). Selective genetic overlap between amyotrophic lateral sclerosis and diseases of the frontotemporal dementia spectrum. *JAMA Neurol.* 75, 860–875. doi: 10.1001/jamaneurol.2018.0372
- Kassiotis, G., and Stoye, J. P. (2016). Immune responses to endogenous retroelements: taking the bad with the good. *Nat. Rev. Immunol.* 16, 207–219. doi: 10.1038/nri.2016.27
- Kato, M., Takemoto, K., and Shinkai, Y. (2018). A somatic role for the histone methyltransferase Setdb1 in endogenous retrovirus silencing. *Nat. Commun.* 9:1683. doi: 10.1038/s41467-018-04132-9
- Katyal, S., Lee, Y., Nitiss, K. C., Downing, S. M., Li, Y., Shimada, M., et al. (2014). Aberrant topoisomerase-1 DNA lesions are pathogenic in neurodegenerative genome instability syndromes. *Nat. Neurosci.* 17, 813–821. doi: 10.1038/nn.3715
- Kazazian, H. H. (1998). Mobile elements and disease. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 8, 343–350. doi: 10.1016/s0959-437x(98)80092-0
- Kazazian, H. H., and Moran, J. V. (2017). Mobile DNA in health and disease. *N. Engl. J. Med.* 377, 361–370. doi: 10.1056/NEJMr1510092
- Kim, D., Frank, C. L., Dobbin, M. M., Tsunemoto, R. K., Tu, W., Peng, P. L., et al. (2008). Deregulation of HDAC1 by p25/Cdk5 in neurotoxicity. *Neuron* 60, 803–817. doi: 10.1016/j.neuron.2008.10.015
- Kim, D., Nguyen, M. D., Dobbin, M. M., Fischer, A., Sananbenesi, F., Rodgers, J. T., et al. (2007). SIRT1 deacetylase protects against neurodegeneration in models for Alzheimer's disease and amyotrophic lateral sclerosis. *EMBO J.* 26, 3169–3179. doi: 10.1038/sj.emboj.7601758
- King, I. F., Yandava, C. N., Mabb, A. M., Hsiao, J. S., Huang, H.-S., Pearson, B. L., et al. (2013). Topoisomerases facilitate transcription of long genes linked to autism. *Nature* 501, 58–62. doi: 10.1038/nature12504
- Kitamura, Y., Ayukawa, T., Ishikawa, T., Kanda, T., and Yoshiike, K. (1996). Human endogenous retrovirus K10 encodes a functional integrase. *J. Virol.* 70, 3302–3306. doi: 10.1128/JVI.70.5.3302-3306.1996

- Kritsilis, M., Rizou, S. V., Koutsoudaki, P., Evangelou, K., Gorgoulis, V., and Papadopoulos, D. (2018). Ageing, cellular senescence and neurodegenerative disease. *IJMS* 19:2937. doi: 10.3390/ijms19102937
- Krug, L., Chatterjee, N., Borges-Monroy, R., Hearn, S., Liao, W.-W., Morrill, K., et al. (2017). Retrotransposon activation contributes to neurodegeneration in a *Drosophila* TDP-43 model of ALS. *PLoS Genet.* 13:e1006635. doi: 10.1371/journal.pgen.1006635
- Kurth, R., and Bannert, N. (2010). Beneficial and detrimental effects of human endogenous retroviruses. *Int. J. Cancer* 126, 306–314. doi: 10.1002/ijc.24902
- Küry, P., Nath, A., Créange, A., Dolei, A., Marche, P., Gold, J., et al. (2018). Human endogenous retroviruses in neurological diseases. *Trends Mol. Med.* 24, 379–394. doi: 10.1016/j.molmed.2018.02.007
- Kushima, I., Aleksic, B., Nakatochi, M., Shimamura, T., Shiino, T., Yoshimi, A., et al. (2017). High-resolution copy number variation analysis of schizophrenia in Japan. *Mol. Psychiatry* 22, 430–440. doi: 10.1038/mp.2016.88
- Kwiatkowski, T. J., Bosco, D. A., Leclerc, A. L., Tamrazian, E., Vanderburg, C. R., Russ, C., et al. (2009). Mutations in the FUS/TLS gene on chromosome 16 cause familial amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 323, 1205–1208. doi: 10.1126/science.1166066
- Lander, E. S., Linton, L. M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M. C., Baldwin, J., et al. (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409, 860–921. doi: 10.1038/35057062
- Lee, E. J., Banerjee, S., Zhou, H., Jammalamadaka, A., Arcila, M., Manjunath, B. S., et al. (2011). Identification of piRNAs in the central nervous system. *RNA* 17, 1090–1099. doi: 10.1261/rna.2565011
- Lee, J.-H., Kim, E. W., Croteau, D. L., and Bohr, V. A. (2020). Heterochromatin: an epigenetic point of view in aging. *Exp. Mol. Med.* 52, 1466–1474. doi: 10.1038/s12276-020-00497-4
- Lesbats, P., Engelman, A. N., and Cherepanov, P. (2016). Retroviral DNA Integration. *Chem. Rev.* 116, 12730–12757. doi: 10.1021/acs.chemrev.6b00125
- Li, N., and Lagier-Tourenne, C. (2018). Nuclear pores: the gate to neurodegeneration. *Nat. Neurosci.* 21, 156–158. doi: 10.1038/s41593-017-0066-0
- Li, W., Jin, Y., Prazak, L., Hammell, M., and Dubnau, J. (2012). Transposable Elements in TDP-43-mediated neurodegenerative disorders. *PLoS One* 7:e44099. doi: 10.1371/journal.pone.0044099
- Li, W., Lee, M.-H., Henderson, L., Tyagi, R., Bachani, M., Steiner, J., et al. (2015). Human endogenous retrovirus-K contributes to motor neuron disease. *Sci. Transl. Med.* 7:307ra153. doi: 10.1126/scitranslmed.aac8201
- Li, Z., Zhou, D., Zhang, D., Zhao, J., Li, W., Sun, Y., et al. (2021). Folic acid inhibits aging-induced telomere attrition and apoptosis in astrocytes *in vivo* and *in vitro*. *Cereb. Cortex* 2021:bhab208. doi: 10.1093/cercor/bhab208
- Liu, E. Y., Russ, J., Cali, C. P., Phan, J. M., Amlie-Wolf, A., and Lee, E. B. (2019). Loss of Nuclear TDP-43 Is Associated with Decondensation of LINE Retrotransposons. *Cell Rep.* 27, 1409–1421.e6. doi: 10.1016/j.celrep.2019.04.003
- Liu, N., Lee, C. H., Swigut, T., Grow, E., Gu, B., Bassik, M. C., et al. (2018). Selective silencing of euchromatic L1s revealed by genome-wide screens for L1 regulators. *Nature* 553, 228–232. doi: 10.1038/nature25179
- Liu, S., Brind'Amour, J., Karimi, M. M., Shirane, K., Bogutz, A., Lefebvre, L., et al. (2014). Setdb1 is required for germline development and silencing of H3K9me3-marked endogenous retroviruses in primordial germ cells. *Genes Dev.* 28, 2041–2055. doi: 10.1101/gad.244848.114
- López-Otín, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M., and Kroemer, G. (2013). The Hallmarks of Aging. *Cell* 153, 1194–1217. doi: 10.1016/j.cell.2013.05.039
- Lu, T., Pan, Y., Kao, S.-Y., Li, C., Kohane, I., Chan, J., et al. (2004). Gene regulation and DNA damage in the ageing human brain. *Nature* 429, 883–891. doi: 10.1038/nature02661
- Ma, S., Zhang, B., LaFave, L. M., Earl, A. S., Chiang, Z., Hu, Y., et al. (2020). Chromatin Potential Identified by Shared Single-Cell Profiling of RNA and Chromatin. *Cell* 183, 1103–1116.e20. doi: 10.1016/j.cell.2020.09.056
- Macia, A., Widmann, T. J., Heras, S. R., Ayllon, V., Sanchez, L., Benkaddour-Boumzaouad, M., et al. (2017). Engineered LINE-1 retrotransposition in nondividing human neurons. *Genome Res.* 27, 335–348. doi: 10.1101/gr.206805.116
- MacMicking, J. D. (2012). Interferon-inducible effector mechanisms in cell-autonomous immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 12, 367–382. doi: 10.1038/nri3210
- Madabhushi, R., Gao, F., Pfenning, A. R., Pan, L., Yamakawa, S., Seo, J., et al. (2015). Activity-Induced DNA breaks govern the expression of neuronal early-response genes. *Cell* 161, 1592–1605. doi: 10.1016/j.cell.2015.05.032
- Madabhushi, R., Pan, L., and Tsai, L.-H. (2014). DNA Damage and Its Links to Neurodegeneration. *Neuron* 83, 266–282. doi: 10.1016/j.neuron.2014.06.034
- Mager, D. L., and Freeman, J. D. (1995). HERV-H endogenous retroviruses: presence in the New World branch but amplification in the Old World primate lineage. *Virology* 213, 395–404. doi: 10.1006/viro.1995.0012
- Mahmood, W., Erichsen, L., Ott, P., Schulz, W. A., Fischer, J. C., Arauzo-Bravo, M. J., et al. (2020). Aging-associated distinctive DNA methylation changes of LINE-1 retrotransposons in pure cell-free DNA from human blood. *Sci. Rep.* 10:22127. doi: 10.1038/s41598-020-79126-z
- Maizels, N. (2015). G4-associated human diseases. *EMBO Rep.* 16, 910–922. doi: 10.15252/embr.201540607
- Manghera, M., Ferguson, J., and Douville, R. (2015). ERVK polyprotein processing and reverse transcriptase expression in human cell line models of neurological disease. *Viruses* 7, 320–332. doi: 10.3390/v7010320
- Martin, C. K., Heilbronn, L. K., de Jonge, L., DeLany, J. P., Volaufova, J., Anton, S. D., et al. (2007). Effect of calorie restriction on resting metabolic rate and spontaneous physical activity. *Obesity* 15, 2964–2973. doi: 10.1038/oby.2007.354
- Martínez-Cué, C., and Rueda, N. (2020). Cellular senescence in neurodegenerative diseases. *Front. Cell. Neurosci.* 14:16. doi: 10.3389/fncel.2020.00016
- Mattson, M. P., and Arumugam, T. V. (2018). Hallmarks of brain aging: adaptive and pathological modification by metabolic states. *Cell Metab.* 27, 1176–1199. doi: 10.1016/j.cmet.2018.05.011
- Maugeri, A., Barchitta, M., Fallico, M., Castellino, N., Reibaldi, M., and Agodi, A. (2019). Characterization of SIRT1/DNMTs Functions and LINE-1 methylation in patients with age-related macular degeneration. *J. Clin. Med.* 8:159. doi: 10.3390/jcm8020159
- Maxwell, P. H., Burhans, W. C., and Curcio, M. J. (2011). Retrotransposition is associated with genome instability during chronological aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 20376–20381.
- Maynard, S., Fang, E. F., Scheibye-Knudsen, M., Croteau, D. L., and Bohr, V. A. (2015). DNA Damage, DNA repair, aging, and neurodegeneration. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 5:a025130. doi: 10.1101/cshperspect.a025130
- Mills, R. E., Bennett, E. A., Iskow, R. C., and Devine, S. E. (2007). Which transposable elements are active in the human genome? *Trends Genet.* 23, 183–191. doi: 10.1016/j.tig.2007.02.006
- Mir, A. A., Philippe, C., and Cristofari, G. (2015). euL1db: the european database of L1HS retrotransposon insertions in humans. *Nucleic Acids Res.* 43, D43–D47. doi: 10.1093/nar/gku1043
- Misteli, T. (2010). Higher-order genome organization in human disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2:a000794. doi: 10.1101/cshperspect.a000794
- Mitra, J., Guerrero, E. N., Hegde, P. M., Liachko, N. F., Wang, H., Vasquez, V., et al. (2019). Motor neuron disease-associated loss of nuclear TDP-43 is linked to DNA double-strand break repair defects. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 116, 4696–4705. doi: 10.1073/pnas.1818415116
- Miyoshi, T., Makino, T., and Moran, J. V. (2019). Poly(ADP-Ribose) Polymerase 2 Recruits Replication Protein A to Sites of LINE-1 Integration to Facilitate Retrotransposition. *Mol. Cell* 75, 1286–1298.e12. doi: 10.1016/j.molcel.2019.07.018
- Mohd Murshid, N., Aminullah Lubis, F., and Makpol, S. (2020). Epigenetic changes and its intervention in age-related neurodegenerative diseases. *Cell. Mol. Neurobiol.* doi: 10.1007/s10571-020-00979-z [Epub ahead of print].
- Mohr, M., Shin, J., Liu, Y., Brown, K., Luo, H., Xi, Y., et al. (2015). Stem cell aging. A mitochondrial UPR-mediated metabolic checkpoint regulates hematopoietic stem cell aging. *Science* 347, 1374–1377. doi: 10.1126/science.aaa2361
- Mostoslavsky, R., Chua, K. F., Lombard, D. B., Pang, W. W., Fischer, M. R., Gellon, L., et al. (2006). Genomic instability and aging-like phenotype in the absence of mammalian SIRT6. *Cell* 124, 315–329. doi: 10.1016/j.cell.2005.11.044
- Mullaart, E., Boerrigter, M. E., Ravid, R., Swaab, D. F., and Vijg, J. (1990). Increased levels of DNA breaks in cerebral cortex of Alzheimer's disease patients. *Neurobiol. Aging* 11, 169–173. doi: 10.1016/0197-4580(90)90542-8
- Muotri, A. R., Chu, V. T., Marchetto, M. C. N., Deng, W., Moran, J. V., and Gage, F. H. (2005). Somatic mosaicism in neuronal precursor cells mediated by L1 retrotransposition. *Nature* 435, 903–910. doi: 10.1038/nature03663

- Muotri, A. R., Marchetto, M. C. N., Coufal, N. G., Oefner, R., Yeo, G., Nakashima, K., et al. (2010). L1 retrotransposition in neurons is modulated by MeCP2. *Nature* 468, 443–446. doi: 10.1038/nature09544
- Nakagawa, S., and Takahashi, M. U. (2016). gEVE: a genome-based endogenous viral element database provides comprehensive viral protein-coding sequences in mammalian genomes. *Database* 2016:baw087. doi: 10.1093/database/baw087
- Nandakumar, S., Rozich, E., and Buttitta, L. (2021). Cell cycle re-entry in the nervous system: from polyploidy to neurodegeneration. *Front. Cell Dev. Biol.* 9:698661. doi: 10.3389/fcell.2021.698661
- National Institute of Neurological Disorders and Stroke [NINDS] (2021). *HERV-K Suppression Using Antiretroviral Therapy in Volunteers With Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS)*. Available online at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02437110> (accessed July 29, 2021).
- Naz, M., Younesi, E., and Hofmann-Apitius, M. (2017). Systematic analysis of GWAS data reveals genomic hotspots for shared mechanisms between neurodegenerative diseases. *J. Alzheimers Dis. Park.* 7, 460–2161. doi: 10.4172/2161-0460.1000368
- Obouidiyat, C., Glazer, H., Seifan, A., Greer, C., and Isaacson, R. (2013). Alzheimer's disease. *Semin. Neurol.* 33, 313–329. doi: 10.1055/s-0033-1359319
- Orr, M. E., Sullivan, A. C., and Frost, B. (2017). A brief overview of tauopathy: causes, consequences, and therapeutic strategies. *Trends Pharmacol. Sci.* 38, 637–648. doi: 10.1016/j.tips.2017.03.011
- Papanikolopoulou, K., and Skoulakis, E. M. C. (2020). Altered proteostasis in neurodegenerative tauopathies. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1233, 177–194. doi: 10.1007/978-3-030-38266-7_7
- Pavlicek, A., Paces, J., Elleder, D., and Hejnar, J. (2002). Processed pseudogenes of human endogenous retroviruses generated by LINEs: their integration, stability, and distribution. *Genome Res.* 12, 391–399. doi: 10.1101/gr.216902
- Penzkofer, T., Jäger, M., Figlerowicz, M., Badge, R., Mundlos, S., Robinson, P. N., et al. (2017). L1Base 2: more retrotransposition-active LINE-1s, more mammalian genomes. *Nucleic Acids Res.* 45, D68–D73. doi: 10.1093/nar/gkw925
- Pereira, G. C., Sanchez, L., Schaughency, P. M., Rubio-Roldán, A., Choi, J. A., Planet, E., et al. (2018). Properties of LINE-1 proteins and repeat element expression in the context of amyotrophic lateral sclerosis. *Mob. DNA* 9:35. doi: 10.1186/s13100-018-0138-z
- Pizarro, J. G., and Cristofari, G. (2016). Post-Transcriptional Control of LINE-1 retrotransposition by cellular host factors in somatic cells. *Front. Cell Dev. Biol.* 4:14. doi: 10.3389/fcell.2016.00014
- Portillo, M., Eremenko, E., Kaluski, S., Garcia-Venzor, A., Onn, L., Stein, D., et al. (2021). SIRT6-CBP-dependent nuclear Tau accumulation and its role in protein synthesis. *Cell Rep.* 35:109035. doi: 10.1016/j.celrep.2021.109035
- Poulose, N., and Raju, R. (2015). Sirtuin regulation in aging and injury. *Biochim. Biophys. Acta* 1852, 2442–2455. doi: 10.1016/j.bbadis.2015.08.017
- Ramirez, P., Sun, W., Zuniga, G., Thomas, E. O., DeVos, S. L., Hyman, B., et al. (2021). Pathogenic tau accelerates aging-associated activation of transposable elements in the mouse central nervous system. *bioRxiv* [Preprint]. doi: 10.1101/2021.02.25.432716
- Rao, K. S. (2003). Dietary calorie restriction. DNA-repair and brain aging. *Mol. Cell. Biochem.* 253, 313–318. doi: 10.1023/a:1026084420943
- Ravel-Godreuil, C., Znaidi, R., Bonnifet, T., Joshi, R. L., and Fuchs, J. (2021b). Transposable elements as new players in neurodegenerative diseases. *FEBS Lett.* 595, 2733–2755. doi: 10.1002/1873-3468.14205
- Ravel-Godreuil, C., Massiani-Beaudoin, O., Mailly, P., Prochiantz, A., Joshi, R. L., and Fuchs, J. (2021a). Perturbed DNA methylation by Gadd45b induces chromatin disorganization, DNA strand breaks and dopaminergic neuron death. *iScience* 24:102756. doi: 10.1016/j.isci.2021.102756
- Reddy, K., Cusack, C. L., Nnah, I. C., Khayati, K., Saqena, C., Huynh, T. B., et al. (2016). Dysregulation of Nutrient Sensing and CLEARance in Presenilin Deficiency. *Cell Rep.* 14, 2166–2179. doi: 10.1016/j.celrep.2016.02.006
- Redman, L. M., Smith, S. R., Burton, J. H., Martin, C. K., Il'yasova, D., and Ravussin, E. (2018). Metabolic slowing and reduced oxidative damage with sustained caloric restriction support the rate of living and oxidative damage theories of aging. *Cell Metab.* 27, 805–815.e4. doi: 10.1016/j.cmet.2018.02.019
- Reilly, M. T., Faulkner, G. J., Dubnau, J., Ponomarev, I., and Gage, F. H. (2013). The role of transposable elements in health and diseases of the central nervous system. *J. Neurosci.* 33, 17577–17586. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3369-13.2013
- Rekaik, H., Blaudin de Thé, F.-X., Prochiantz, A., Fuchs, J., and Joshi, R. L. (2015). Dissecting the role of Engrailed in adult dopaminergic neurons - Insights into Parkinson disease pathogenesis. *FEBS Lett.* 589, 3786–3794. doi: 10.1016/j.febslet.2015.10.002
- Ren, W., Fan, H., Grimm, S. A., Kim, J. J., Li, L., Guo, Y., et al. (2021). DNMT1 reads heterochromatic H4K20me3 to reinforce LINE-1 DNA methylation. *Nat. Commun.* 12:2490. doi: 10.1038/s41467-021-22665-4
- Ribet, D., Harper, F., Dupressoir, A., Dewannieux, M., Pierron, G., and Heidmann, T. (2008). An infectious progenitor for the murine IAP retrotransposon: emergence of an intracellular genetic parasite from an ancient retrovirus. *Genome Res.* 18, 597–609. doi: 10.1101/gr.073486.107
- Richardson, S. R., Morell, S., and Faulkner, G. J. (2014). L1 retrotransposons and somatic mosaicism in the brain. *Annu. Rev. Genet.* 48, 1–27. doi: 10.1146/annurev-genet-120213-092412
- Rockwood, L. D., Felix, K., and Janz, S. (2004). Elevated presence of retrotransposons at sites of DNA double strand break repair in mouse models of metabolic oxidative stress and MYC-induced lymphoma. *Mutat. Res.* 548, 117–125. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2004.01.005
- Romanish, M. T., Cohen, C. J., and Mager, D. L. (2010). Potential mechanisms of endogenous retroviral-mediated genomic instability in human cancer. *Semin. Cancer Biol.* 20, 246–253. doi: 10.1016/j.semcancer.2010.05.005
- Saito, K., and Siomi, M. C. (2010). Small RNA-mediated quiescence of transposable elements in animals. *Dev. Cell* 19, 687–697. doi: 10.1016/j.devcel.2010.10.011
- Saleh, A., Macia, A., and Muotri, A. R. (2019). Transposable elements, inflammation, and neurological disease. *Front. Neurol.* 10:894. doi: 10.3389/fneur.2019.00894
- Salloway, S. (2021). *Repurposing Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors for Treatment of AD*. Available online at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04500847> (accessed July 29, 2021).
- Sameri, S., Samadi, P., Dehghan, R., Salem, E., Fayazi, N., and Amini, R. (2020). Stem cell aging in lifespan and disease: a state-of-the-art review. *Curr. Stem Cell Res. Ther.* 15, 362–378. doi: 10.2174/1574888X15666200213105155
- Satoh, A., Brace, C. S., Rensing, N., Cliften, P., Wozniak, D. F., Herzog, E. D., et al. (2013). Sirt1 extends life span and delays aging in mice through the regulation of Nk2 homeobox 1 in the DMH and LH. *Cell Metab.* 18, 416–430. doi: 10.1016/j.cmet.2013.07.013
- Savage, A. L., Schumann, G. G., Breen, G., Bubb, V. J., Al-Chalabi, A., and Quinn, J. P. (2019). Retrotransposons in the development and progression of amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 90, 284–293.
- Sedelnikova, O. A., Horikawa, I., Zimonjic, D. B., Popescu, N. C., Bonner, W. M., and Barrett, J. C. (2004). Senescing human cells and ageing mice accumulate DNA lesions with unreparable double-strand breaks. *Nat. Cell Biol.* 6, 168–170. doi: 10.1038/ncb1095
- Seifarth, W., Frank, O., Zeifelder, U., Spiess, B., Greenwood, A. D., Hehlmann, R., et al. (2005). Comprehensive analysis of human endogenous retrovirus transcriptional activity in human tissues with a retrovirus-specific microarray. *J. Virol.* 79, 341–352. doi: 10.1128/JVI.79.1.341-352.2005
- Sepe, S., Milanese, C., Gabriels, S., Derks, K. W. J., Payan-Gomez, C., van IJcken, W. F. J., et al. (2016). Inefficient DNA repair is an aging-related modifier of Parkinson's disease. *Cell Rep.* 15, 1866–1875. doi: 10.1016/j.celrep.2016.04.071
- Sgadò, P., Viaggi, C., Fantacci, C., and Corsini, G. U. (2008). Characterization of the Engrailed mutant mice as experimental models for Parkinson's disease. *Parkinsonism. Relat. Disord.* 14(Suppl. 2), S103–S106. doi: 10.1016/j.parkreldis.2008.04.011
- Shanbhag, N. M., Evans, M. D., Mao, W., Nana, A. L., Seeley, W. W., Adame, A., et al. (2019). Early neuronal accumulation of DNA double strand breaks in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol. Commun.* 7:77. doi: 10.1186/s40478-019-0723-5
- Shaw, A. C., Joshi, S., Greenwood, H., Panda, A., and Lord, J. M. (2010). Aging of the Innate Immune System. *Curr. Opin. Immunol.* 22, 507–513. doi: 10.1016/j.coi.2010.05.003
- Shiloh, Y., and Ziv, Y. (2013). The ATM protein kinase: regulating the cellular response to genotoxic stress, and more. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 14, 197–210. doi: 10.1038/nrm3546
- Simon, H. H., Saueressig, H., Wurst, W., Goulding, M. D., and O'Leary, D. D. (2001). Fate of midbrain dopaminergic neurons controlled by the engrailed genes. *J. Neurosci.* 21, 3126–3134.

- Simon, M., Van Meter, M., Ablava, J., Ke, Z., Gonzalez, R. S., Taguchi, T., et al. (2019). LINE1 Derepression in Aged Wild-Type and SIRT6-Deficient Mice Drives Inflammation. *Cell Metab.* 29, 871–885.e5. doi: 10.1016/j.cmet.2019.02.014
- Sin, O., and Nollen, E. A. A. (2015). Regulation of protein homeostasis in neurodegenerative diseases: the role of coding and non-coding genes. *Cell. Mol. Life Sci.* 72, 4027–4047. doi: 10.1007/s00018-015-1985-0
- Sliter, D. A., Martinez, J., Hao, L., Chen, X., Sun, N., Fischer, T. D., et al. (2018). Parkin and PINK1 mitigate STING-induced inflammation. *Nature* 561, 258–262. doi: 10.1038/s41586-018-0448-9
- Smith, C. L., Bolton, A., and Nguyen, G. (2010). Genomic and epigenomic instability, fragile sites, schizophrenia and autism. *Curr. Genomics* 11, 447–469. doi: 10.2174/138920210793176001
- Sonnier, L., Le Pen, G., Hartmann, A., Bizot, J.-C., Trovero, F., Krebs, M.-O., et al. (2007). Progressive loss of dopaminergic neurons in the ventral midbrain of adult mice heterozygote for engrailed1. *J. Neurosci.* 27, 1063–1071. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4583-06.2007
- Sonninen, T.-M., Goldsteins, G., Laham-Karam, N., Koistinaho, J., and Lehtonen, Š. (2020). Proteostasis disturbances and inflammation in neurodegenerative diseases. *Cells* 9:E2183. doi: 10.3390/cells9102183
- St. Laurent, G., Hammell, N., and McCaffrey, T. A. (2010). A LINE-1 component to human aging: Do LINE elements exact a longevity cost for evolutionary advantage? *Mech. Ageing Dev.* 131, 299–305. doi: 10.1016/j.mad.2010.03.008
- Stekovic, S., Hofer, S. J., Tripolt, N., Aon, M. A., Royer, P., Pein, L., et al. (2019). Alternate day fasting improves physiological and molecular markers of aging in healthy, non-obese humans. *Cell Metab.* 30, 462–476.e6. doi: 10.1016/j.cmet.2019.07.016
- Stetson, D. B., Ko, J. S., Heidmann, T., and Medzhitov, R. (2008). Trex1 prevents cell-intrinsic initiation of autoimmunity. *Cell* 134, 587–598. doi: 10.1016/j.cell.2008.06.032
- Suarez, N. A., Macia, A., and Muotri, A. R. (2018). LINE-1 retrotransposons in healthy and diseased human brain: L1 Activity in the Human Brain. *Dev. Neurobiol.* 78, 434–455. doi: 10.1002/dneu.22567
- Suberbielle, E., Sanchez, P. E., Kravitz, A. V., Wang, X., Ho, K., Eilertson, K., et al. (2013). Physiologic brain activity causes DNA double-strand breaks in neurons, with exacerbation by amyloid- β . *Nat. Neurosci.* 16, 613–621. doi: 10.1038/nn.3356
- Sun, W., Samimi, H., Gamez, M., Zare, H., and Frost, B. (2018). Pathogenic tau-induced piRNA depletion promotes neuronal death through transposable element dysregulation in neurodegenerative tauopathies. *Nat. Neurosci.* 21, 1038–1048. doi: 10.1038/s41593-018-0194-1
- Sur, D., Kustwar, R. K., Budania, S., Mahadevan, A., Hancks, D. C., Yadav, V., et al. (2017). Detection of the LINE-1 retrotransposon RNA-binding protein ORF1p in different anatomical regions of the human brain. *Mob. DNA* 8:17. doi: 10.1186/s13100-017-0101-4
- Surmeier, D. J., Obeso, J. A., and Halliday, G. M. (2017). Selective neuronal vulnerability in Parkinson disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 18, 101–113. doi: 10.1038/nrn.2016.178
- Tam, O. H., Ostrow, L. W., and Gale Hammell, M. (2019a). Diseases of the nERVous system: retrotransposon activity in neurodegenerative disease. *Mob. DNA* 10:32. doi: 10.1186/s13100-019-0176-1
- Tam, O. H., Rozhkov, N. V., Shaw, R., Kim, D., Hubbard, I., Fennessey, S., et al. (2019b). Postmortem cortex samples identify distinct molecular subtypes of ALS: retrotransposon activation, oxidative stress, and activated glia. *Cell Rep.* 29, 1164–1177.e5. doi: 10.1016/j.celrep.2019.09.066
- Tang, M., Tang, H., Tu, B., and Zhu, W.-G. (2021). SIRT7: a sentinel of genome stability. *Open Biol.* 11:210047. doi: 10.1098/rsob.210047
- Thomas, C. A., Tejwani, L., Trujillo, C. A., Negraes, P. D., Herai, R. H., Mesci, P., et al. (2017). Modeling of TREX1-dependent autoimmune disease using human stem cells highlights L1 accumulation as a source of neuroinflammation. *Cell Stem Cell* 21, 319–331.e8. doi: 10.1016/j.stem.2017.07.009
- Tristem, M. (2000). Identification and characterization of novel human endogenous retrovirus families by phylogenetic screening of the human genome mapping project database. *J. Virol.* 74, 3715–3730. doi: 10.1128/jvi.74.8.3715-3730.2000
- Turner, G., Barbulescu, M., Su, M., Jensen-Seaman, M. I., Kidd, K. K., and Lenz, J. (2001). Insertional polymorphisms of full-length endogenous retroviruses in humans. *Curr. Biol.* 11, 1531–1535. doi: 10.1016/s0960-9822(01)00455-9
- Tyagi, R., Li, W., Parades, D., Bianchet, M. A., and Nath, A. (2017). Inhibition of human endogenous retrovirus-K by antiretroviral drugs. *Retrovirology* 14:21. doi: 10.1186/s12977-017-0347-4
- Van Bulck, M., Sierra-Magro, A., Alarcon-Gil, J., Perez-Castillo, A., and Morales-Garcia, J. (2019). Novel approaches for the treatment of Alzheimer's and Parkinson's disease. *IJMS* 20:719. doi: 10.3390/ijms20030719
- Van Meter, M., Kashyap, M., Rezazadeh, S., Geneva, A. J., Morello, T. D., Seluanov, A., et al. (2014). SIRT6 represses LINE1 retrotransposons by ribosylating KAP1 but this repression fails with stress and age. *Nat. Commun.* 5:5011. doi: 10.1038/ncomms6011
- Vance, C., Rogelj, B., Hortobágyi, T., De Vos, K. J., Nishimura, A. L., Sreedharan, J., et al. (2009). Mutations in FUS, an RNA processing protein, cause familial amyotrophic lateral sclerosis type 6. *Science* 323, 1208–1211. doi: 10.1126/science.1165942
- Vaquero, A., Scher, M., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Serrano, L., and Reinberg, D. (2007). SIRT1 regulates the histone methyl-transferase SUV39H1 during heterochromatin formation. *Nature* 450, 440–444. doi: 10.1038/nature06268
- Vaquero, A., Scher, M., Lee, D., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Reinberg, D. (2004). Human SirT1 interacts with histone H1 and promotes formation of facultative heterochromatin. *Mol. Cell* 16, 93–105. doi: 10.1016/j.molcel.2004.08.031
- Vazquez, B. N., Thackray, J. K., Simonet, N. G., Chahar, S., Kane-Goldsmith, N., Newkirk, S. J., et al. (2019). SIRT7 mediates L1 elements transcriptional repression and their association with the nuclear lamina. *Nucleic Acids Res.* 47, 7870–7885. doi: 10.1093/nar/gkz519
- Vermeij, W. P., Dollé, M. E. T., Reiling, E., Jaarsma, D., Payan-Gomez, C., Bombardieri, C. R., et al. (2016). Restricted diet delays accelerated ageing and genomic stress in DNA-repair-deficient mice. *Nature* 537, 427–431. doi: 10.1038/nature19329
- Vernier, P. (2004). The degeneration of dopamine neurons in Parkinson's disease: insights from embryology and evolution of the mesostriatocortical system. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1035, 231–249. doi: 10.1196/annals.1332.015
- Villeponteau, B. (1997). The heterochromatin loss model of aging. *Exp. Gerontol.* 32, 383–394.
- Villesen, P., Aagaard, L., Wiuf, C., and Pedersen, F. S. (2004). Identification of endogenous retroviral reading frames in the human genome. *Retrovirology* 1:32.
- Vyjayanti, V. N., and Rao, K. S. (2006). DNA double strand break repair in brain: reduced NHEJ activity in aging rat neurons. *Neurosci. Lett.* 393, 18–22. doi: 10.1016/j.neulet.2005.09.053
- Wallace, A. D., Wendt, G. A., Barcellos, L. F., de Smith, A. J., Walsh, K. M., Metayer, C., et al. (2018). To ERV is human: a phenotype-wide scan linking polymorphic human endogenous retrovirus-K insertions to complex phenotypes. *Front. Genet.* 9:298. doi: 10.3389/fgene.2018.00298
- Wallace, N. A., Belancio, V. P., and Deininger, P. L. (2008). L1 mobile element expression causes multiple types of toxicity. *Gene* 419, 75–81. doi: 10.1016/j.gene.2008.04.013
- Wang, W.-Y., Pan, L., Su, S. C., Quinn, E. J., Sasaki, M., Jimenez, J. C., et al. (2013). Interaction of FUS and HDAC1 regulates DNA damage response and repair in neurons. *Nat. Neurosci.* 16, 1383–1391. doi: 10.1038/nn.3514
- Wang, Y., Xu, E., Musich, P. R., and Lin, F. (2019). Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases and the potential countermeasure. *CNS Neurosci. Ther.* 25, 816–824. doi: 10.1111/cns.13116
- Wątroba, M., and Szukiewicz, D. (2016). The role of sirtuins in aging and age-related diseases. *Adv. Med. Sci.* 61, 52–62. doi: 10.1016/j.advms.2015.09.003
- Xue, B., Sechi, L. A., and Kelvin, D. J. (2020). Human endogenous retrovirus K (HML-2) in health and disease. *Front. Microbiol.* 11:1690. doi: 10.3389/fmicb.2020.01690
- Yang, P., Wang, Y., and Macfarlan, T. S. (2017). The Role of KRAB-ZFPs in transposable element repression and mammalian evolution. *Trends Genet.* 33, 871–881. doi: 10.1016/j.tig.2017.08.006
- Yang, W., Hamilton, J. L., Kopil, C., Beck, J. C., Tanner, C. M., Albin, R. L., et al. (2020). Current and projected future economic burden of Parkinson's disease in the U.S. *NPJ Parkinsons Dis.* 6:15.

- Zamudio, N., and Bourc'his, D. (2010). Transposable elements in the mammalian germline: a comfortable niche or a deadly trap? *Heredity* 105, 92–104. doi: 10.1038/hdy.2010.53
- Zhong, L., D'Urso, A., Toiber, D., Sebastian, C., Henry, R. E., Vadysirisack, D. D., et al. (2010). The histone deacetylase Sirt6 regulates glucose homeostasis via Hif1 α . *Cell* 140, 280–293. doi: 10.1016/j.cell.2009.12.041
- Zuo, Z., and Rocha, P. P. (2020). Repetitive elements: different subtypes hint at distinct functions. *Trends Genet.* 36, 385–387. doi: 10.1016/j.tig.2020.03.008

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's Note: All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Copyright © 2022 Peze-Heidsieck, Bonnifet, Znaidi, Ravel-Godreuil, Massiani-Beaudoin, Joshi and Fuchs. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

DISCUSSION

I. L'expression d'ORF1p dans le cerveau :

L'expression des LINE-1s est de mieux en mieux caractérisée au sein du cerveau. Ces avancées ont notamment été rendues possibles par les avancées technologiques dans le domaine du séquençage, permettant de discriminer les séquences hautement répétées relatives au transcrite LINE-1. Ainsi différentes analyses de RNA-seq (séquençage ARN) et de RT-qPCR ont permis de montrer l'expression constitutive des LINE-1 dans le cerveau de la souris et de l'Homme (Bedrosian et al., 2018; Blaudin de Thé et al., 2018; Guo et al., 2018; Moszczynska, 2020; Pereira et al., 2018; Savage et al., 2019; T. Takahashi et al., 2022). De plus, on sait désormais depuis cette année, grâce à des données de séquençage « long-reads » sur différents tissus, que le cerveau représente un des organes ayant la plus forte expression de LINE-1s intacts (Rybacki et al., 2023), séquences pouvant conduire à l'expression d'ORF1p. Cet aspect était déjà sous-entendu par le fort taux d'insertions détecté dans cet organe ainsi que sa permissivité face à ces insertions, reflétant une expression non négligeable de LINE-1 et ses protéines (Baillie et al., 2011; Faulkner & Garcia-Perez, 2017). On sait aussi que chez la souris, le motif d'expression des loci LINE-1s est différent d'un organe à l'autre et qu'il existe un dimorphisme sexuel de ce motif d'expression (Stow et al., 2021). Cependant les analyses de RNA-seq sont complexes et utilisent des méthodologies variées, parfois sur la manière de « mapper » les « reads » (mapping random ou unique), parfois en analysant les LINE-1s de manière globale ou uniquement les intacts, le tout avec des techniques de séquençage différentes. Cet aspect sera explicité plus loin. Toutes ces méthodes se valent et ont chacune leurs avantages et inconvénients mais elles compliquent aussi l'interprétation de cette expression dans le cerveau. Par exemple, chez la souris, certaines études montrent que le cerveau exprime davantage de LINE-1s que d'autres organes comme le foie, alors que d'autre observent l'inverse ((Simon et al., 2019)vs(Stow et al., 2021)). Autre exemple, chez l'homme où, si le cerveau semble être l'un des organes contenant le plus de LINE-1s intacts exprimés (Rybacki et al., 2023), d'autre études toutes aussi récentes montrent que les LINE-1s intacts ne sont quasiment pas détectés dans cet organe (McKerrow et al., 2023). Bien que dans ce cas précis l'analyse par read long de la première étude porte davantage ses fruits que la base de données publiques de la deuxième étude dont la méthode de quantification n'était pas destinée à l'étude des ETs. Ces analyses n'en restent pas moins primordiales pour décrypter l'expression des LINE-1, mais il apparait aussi que l'étude de la protéine ORF1p constitue un bon marqueur afin de refléter l'activité des LINE-1s intacts dans le cerveau. Cependant l'expression de la protéine ORF1p encodée par LINE-1 au sein du système nerveux central, est quant à elle beaucoup moins caractérisée. A titre d'exemple, la recherche de peptide

protéotypique de la protéine ORF1p au sein de données de spectrométrie de masse issues de 29 tissus humains n'a pas permis d'identifier ORF1p dans le cerveau (McKerrow et al., 2023). Ces résultats sous-entendent la difficulté de détecter ORF1p dans ce tissu, bien qu'il soit caractérisé dans d'autres études. Ces dernières, via des analyses de WB et d'immunofluorescence ont exploré l'expression d'ORF1p dans un contexte physiologique au sein du cerveau de rat (Osburn et al., 2022), de la souris (Blaudin de Thé et al., 2018; T. Takahashi et al., 2022; Y. Zhang et al., 2022) et de l'Homme (Sur et al., 2017) sur différentes régions (Mésencéphale, Hippocampe, Cervelet). De ce fait, nous avons voulu caractériser l'étendue de l'expression d'ORF1p dans le cerveau murin et humain.

A. Une expression généralisée

De manière surprenante, nous avons pu observer un grand nombre de cellules exprimant cette protéine. Nous avons donc voulu les quantifier et définir leur identité cellulaire. Profitant des avancées dans le domaine de la microscopie à grande échelle, qui permettent désormais d'obtenir des images pyramidales allant du tissu global à la cellule individuelle, nous avons voulu cartographier et mesurer l'expression de notre protéine d'intérêt. Il existe d'un côté des outils permettant de cartographier *in silico* les différentes zones du cerveau en utilisant des atlas référencés (H. Carey et al., 2023) et d'un autre côté des programmes de « machine learning » pour la détection de cellule (cellpose et stardist). Cependant il n'existait pas, à ma connaissance, de méthodes associant ces deux procédés. Nous avons mis en commun ces deux outils en appliquant cette méthode de détection cellulaire par machine learning sur chacune des sous régions de l'atlas de nos coupes.

Grâce à cette méthodologie, nous avons démontré qu'environ une cellule sur 5 exprimée ORF1p dans le cerveau de la souris âgée de 3 mois (cervelet et corps calleux exclu), représentant en moyenne 10 000 cellules par coupe. D'un point de vue technique, les régions ayant des zones granulaires avec une agglomération de noyau ne peuvent être analysées par notre méthodologie puisque les noyaux sont quasiment indiscernables les uns des autres, c'est le cas ici de l'hippocampe et du cervelet. En revanche, toutes les régions du cerveau analysées présentaient une expression d'ORF1p, ce qui a aussi été validé par WB. D'autre part, dans des échantillons *post-mortem* humain de 5 individus sains, nous avons observé l'expression d'ORF1p dans 3 régions différentes : le gyrus cingulaire, le cervelet et le cortex frontal (dernière région montrée que pour un seul individu mais bien présente dans les 5). Bien que ces individus soient relativement âgés (79 ans en moyenne, allant de 73 à 92 ans), ces données suggèrent une expression généralisée d'ORF1p dans le cerveau humain puisque d'autres régions avaient déjà été définies comme exprimant cette protéine (Sur et al., 2017). Il est intéressant de noter

que de récents travaux montrent que les transcrits LINE-1s intacts et codant pour ORF1p ne sont pas retrouvés dans le cortex frontal et dans le gyrus cingulaire mais dans le cervelet (Rybacki et al., 2023). Leur protocole est cependant très stringent comme l'affirment les auteurs et nous avons montré que le gyrus cingulaire a une expression d'ORF1p très hétérogène dû à la nature même du tissu par sa proximité avec le corps calleux, ce qui permettrait d'expliquer pourquoi toutes les régions et tous les individus analysés présentaient une expression d'ORF1p suffisante pour être détectée via WB. Ainsi la détection d'ORF1p permet indirectement de montrer une expression des LINE-1s dans ces tissus, là où parfois la détection des transcrits peut s'avérer limitée. Le cerveau apparaît ici comme un organe exprimant ORF1p à un niveau basal. Cette expression concerne plus de 20% des cellules du cerveau chez la souris. Il serait intéressant à l'avenir de pouvoir déterminer cette proportion dans le cerveau humain.

B. Une expression neuronale

Par la suite, afin de déterminer le type de cellules exprimant ORF1p, nous avons réalisé plusieurs co-détection. Nous avons utilisé différents marqueurs comme Iba1 pour les cellules microgliales, NeuN pour les cellules neuronales et Sox9, S100B et GFAP pour les cellules astrocytaires. Associé à des expériences de FACS isolant la fraction neuronale des autres types cellulaires, nous avons montré que l'expression de ORF1p était majoritairement neuronale. Dans nos analyses à grande échelle dans tout le cerveau murin, plus de 72% des cellules exprimant ORF1p étaient des neurones. Ce chiffre s'élève à plus de 90% dans nos analyses via confocale sur les deux régions analysées. La nature de cette différence entre les deux techniques et acquisition employées sera discutée ci-après. Nos observations concordent avec de précédents travaux relatant que les LINE-1s sont actifs dans les neurones de l'homme et la souris (Muotri et al., 2010; Thomas et al., 2012; Y. Zhang et al., 2022). Cette expression d'ORF1p, au sein de ce type cellulaire avait déjà été montrée auparavant par l'équipe dans les neurones dopaminergiques de la *substantia nigra* (Blaudin de Thé et al., 2018), plus récemment dans les neurones excitateurs et inhibiteurs du cortex (Y. Zhang et al., 2022), et dans les cellules de Purkinje du cervelet (T. Takahashi et al., 2022). Nous avons retrouvé cette expression au sein de tous ces types-neuronaux mentionnés, mais il est désormais démontré, ici, une expression d'ORF1p qui touche principalement les neurones. En effet, nous n'avons trouvé aucun astrocyte ni cellule microgliale exprimant la protéine endogène avec certitude. Il y aurait donc une spécificité des neurones à exprimer ORF1p, bien que certains travaux laissent entendre une expression de la protéine dans les astrocytes et dans les neurones de la moelle épinière des souris ayant développées expérimentalement une encéphalomyélite auto-immune (F. Takahashi et al., 2022). Sur le plan transcriptionnel, il est depuis peu

montré que les neurones de l'hippocampe murin expriment environ deux fois plus LINE-1 que les autres types cellulaires (astrocytes, microglies, oligodendrocytes et péricytes) allant dans le sens d'une particularité des neurones à exprimer LINE-1 et ses protéines à un niveau plus élevé que les autres types cellulaires du cerveau (McKerrow et al., 2023). Une autre étude de RNA-seq effectuée sur des noyaux uniques (snRNA-seq) montre que les éléments répétés sont plus actifs dans les neurones que dans les cellules gliales (Y. Zhang et al., 2022). De plus, cette étude montre aussi par ATAC-seq une accessibilité de la chromatine contenant certaines séquences LINE-1 dans les neurones excitateurs, suggérant qu'ils seraient plus enclins à exprimer ces séquences. Il est aussi intéressant de mentionner que chez l'homme et la souris, nous avons trouvé que certains neurones n'expriment pas ORF1p, interrogeant sur la nature de cette expression. En effet, à titre d'exemple, dans le cervelet qui contient une portion non-négligeable des neurones du cerveau, on observe parmi toutes les cellules du feuillet granulaire exprimant NeuN, que quelques rares cellules ORF1p positives.

Il y a donc une certaine spécificité des neurones à exprimer ORF1p, cependant, en dehors du cervelet, une proportion majoritaire des neurones n'exprime pas cette protéine. Il me paraît important ici d'ajouter des précisions techniques afin de discuter ces résultats. En effet, la méthodologie que nous avons mise en place tend fortement à sous-estimer la proportion des cellules doubles positives (ORF1p+/NeuN+) et ce pour différentes raisons. Tout d'abord, le signal de chacun des deux marqueurs doit être suffisant mais aussi arborer une certaine forme lui permettant de pouvoir être identifié comme une cellule par les algorithmes de machine learning, et cela de manière indépendante pour les deux marqueurs. Une fois qu'une cellule considérée comme positive sera détectée, elle sera annotée (création d'une annotation) puis sera associée à un noyau. Il faudra que l'annotation cellulaire ORF1p et l'annotation NeuN partagent le même noyau pour être caractérisé comme double positive. Or, cette assignation peut être problématique lorsque plusieurs noyaux sont présents dans une annotation (deux cytoplasmes identifiés comme un seul, proximité du cytoplasme avec un noyau adjacent, etc), phénomène accentué par « l'étalement » optique du signal sur plusieurs plans focaux (inhérent à ces scanners de lames). Ainsi, cela va tendre à augmenter la proportion des simples positives au détriment des doubles positives. De plus, à la différence d'une analyse focalisée sur une région, analyser la totalité d'une coupe implique d'avoir un signal de qualité sur tout le tissu mais avec de faibles portions d'une qualité moindre. Il ne faut pas oublier non-plus que le marquage NeuN ne marque pas l'ensemble des neurones, comme le montre certaines analyses de FANS (H. Liu et al., 2021). Enfin, plus d'un demi-million de noyaux sont analysés, un nombre considérable dont il vaut mieux privilégier la fraction des faux négatifs que des faux-positifs. Ainsi, dans les cellules ORF1p-/NeuN+, on retrouve majoritairement un marquage ORF1p+ bien au-dessus du bruit de fond, mais dont

soit la forme, soit le noyau d'assignation n'a pas permis une caractérisation comme double positive. Ainsi, la proportion des cellules simples positives est surestimée par rapport à celle des doubles positives qui est sous-exprimée aussi bien dans l'analyse issue des acquisitions confocales que dans celle des pyramidales. Cependant pour les raisons mentionnées précédemment, ce phénomène est accentué dans notre analyse à grande échelle, expliquant un plus fort pourcentage de ORF1p non-neuronal dans celle-ci, comparée à l'analyse issue des acquisitions confocales. En ce qui concerne les mesures d'intensité, rappelons que toutes les intensités cellulaires moyennes ont été normalisées pour chaque sous-région analysée de chaque individu en tenant compte du background total de la sous-région. Ainsi, étant donné que notre analyse sous-estime les proportions des cellules positives, notre méthode s'avère particulièrement adaptée à l'étude des variations d'intensité. Cependant, que ce soit dans le cerveau de souris ou celui de l'homme, on retrouve de manière formelle des neurones n'exprimant pas ORF1p. De plus, en dépit des aspects techniques évoqués, on observe bien une proportion de neurones exprimant ORF1p qui varie à travers les différentes régions du cerveau murin.

Une information importante dévoilée dans cette étude est la différence d'expression de la protéine ORF1p entre les régions, mais aussi au sein d'une même région. Les différences de proportion et de densité cellulaire des cellules ORF1p+ d'une région à l'autre peuvent découler de la proportion et de la densité des neurones, cependant le niveau d'expression est quant à lui intrigant. L'équipe avait déjà montré une expression plus forte dans les neurones dopaminergiques comparée aux autres neurones (Blaudin de Thé et al., 2018), suggérant des spécificités de certains types neuronaux face à cette expression. De plus, une différence du niveau d'expression des transcrits LINE-1 d'environ 50% avait déjà été caractérisée chez la souris entre les neurones du cornu ammonis et ceux du gyrus denté, deux régions distinctes de l'hippocampe (McKerrow et al., 2023).

Mais comment expliquer que certains neurones vont avoir un niveau d'intensité ORF1p moyen huit fois supérieur à d'autres neurones ?

Une hypothèse serait que ce niveau d'expression reflète l'activité métabolique des différents types de neurones. En effet, les neurones dopaminergiques ont une activité métabolique élevée (Pacelli et al., 2015) et ces cellules montrent une expression élevée d'ORF1p. De plus, une augmentation d'ORF1p est observée *in vitro* et dans le mésencéphale lorsque l'on perturbe le fonctionnement de la chaîne respiratoire de ces cellules (Baeken et al., 2020). Une autre hypothèse pourrait aussi impliquer un possible rôle de la protéine ORF1p dans les neurones. En effet, on peut citer quatre aspects dévoilés dans cette étude qui questionnent ce possible rôle physiologique de la

protéine ORF1p dans le cerveau : (1) ORF1p est exprimé dans toutes les régions du cerveau ; (2) cette expression est spécifique aux neurones ; (3) une proportion non majoritaire de neurone ne semble pas exprimer ORF1p, ou du moins se situe sous le seuil de détection et (4) le niveau d'expression d'ORF1p est hautement variable entre les neurones, et ce au sein d'une même région.

Il est essentiel de rappeler ici les multiples implications délétères que peuvent avoir l'expression des LINE-1s et de la présence de L1-RNP sur l'intégrité de la cellule, en particulier dans les neurones (Blaudin de Thé et al., 2018), et qui ont été explicitées dans l'introduction. De plus, l'équipe a récemment suggéré que ORF1p pourrait jouer un rôle pathogénique dans les neurones dopaminergiques humains en culture (Znaidi et al., 2023) notamment en ciblant la membrane nucléaire. Une autre équipe a aussi montré expérimentalement que ORF1p pouvait être reconnu par le système immunitaire comme un antigène induisant une certaine neurotoxicité (F. Takahashi et al., 2022). Cet aspect sera discuté par la suite.

De ce fait, pourquoi ces 4 aspects ont-ils été observés si LINE-1 et ses protéines doivent être absolument réprimés par la cellule ? Est-ce nécessairement le reflet d'une répression incomplète cell-type spécifique et dont certains neurones devront faire face tout du long ? Avec un niveau d'expression bien plus élevé pour certains neurones que pour d'autres ? Ou à l'inverse serait-il possible que la cellule ait tiré parti de la protéine ORF1p, lui conférant un rôle physiologique dans ce type cellulaire ? Pourquoi maintenir une expression qui s'avérerait néfaste ? De ce fait, nous avons voulu caractériser avec quels partenaires protéiques ORF1p interagissaient dans le cerveau de la souris et dans des neurones dopaminergiques humains en culture. La discussion de ces résultats sera explicitée en dernière partie. Avant cela nous allons nous focaliser sur l'expression d'ORF1p et des LINE-1s au cours du vieillissement.

II. L'expression d'ORF1p et des LINE-1s dans le cerveau au cours du vieillissement.

Nous avons détecté dans notre analyse une augmentation générale de la protéine ORF1p chez les souris âgées par rapport aux souris jeunes. Cette augmentation est d'environ 13% dans tout le cerveau et affecte pratiquement toutes les régions analysées. Le striatum dorsal, le pallidum, le

thalamus et le mésencéphale « sensorielle » et « moteur » présentent une augmentation significative de la protéine ORF1p dans les souris âgées de 16 mois comparé à celles âgées de 3 mois. Excepté dans l'isocortex, toutes les autres régions présentent une augmentation notable. Ceci a aussi été validé par notre approche confocale. Certaines régions vont être plus impactées que d'autres comme le striatum dorsal qui présente une augmentation de 27% de la protéine ORF1p dans le cadre du vieillissement. Ces travaux constituent la première étude de l'impact du vieillissement sur l'étendue de l'augmentation d'une protéine issue du génome non-codant dans le cerveau. Comme nous l'avons vu, de plus en plus de travaux convergent vers l'idée que le vieillissement est marqué par l'activation des éléments transposables (Copley & Shorter, 2023; LaRocca et al., 2020; Schneider et al., 2023; Wahl et al., 2021; Wood et al., 2016). Parmi ces ETs, les LINE-1s sont particulièrement pointé du doigt (De Cecco et al., 2019; Simon et al., 2019; Van Meter et al., 2014).

Quelques études relatent ces changements d'expression dans le système nerveux central notamment chez les souris ayant été inactivée pour le gène SIRT6 et qui présentent un phénotype de vieillissement prémature (Simon et al., 2019; Van Meter et al., 2014). Dans deux études différentes, il est observé par RT-qPCR une augmentation des transcrits LINE-1s dans le cerveau des souris âgées et SIRT6 (Simon et al., 2019; Van Meter et al., 2014). De plus, entre le cœur, le foie et le cerveau, les travaux de Michael Van Meter montrent que le cerveau est l'organe le plus marqué par cette surexpression de LINE-1 (Van Meter et al., 2014). L'équipe de Vera Gorbunova, après avoir aussi montré cette surexpression dans différents tissus, a démontré par WB une plus grande quantité de protéine ORF1p dans la peau et les poumons des souris âgées WT (Simon et al., 2019). Ils ont aussi fait la même découverte par immunofluorescence dans le foie. Cette augmentation de la protéine ORF1p dans le contexte du vieillissement a aussi été détectée dans le foie, le muscle squelettique et le cerveau chez le rat (Osburn et al., 2022).

Ainsi, lorsque nous avons mis en place notre expérience, nous partions de l'hypothèse que la protéine ORF1p allait être augmentée dans le cerveau des souris âgées. Puisque nous analysons tout le cerveau, nos hypothèses dans le contexte du vieillissement étaient les suivantes : (1) certaines régions allaient être plus touchées que d'autres reflétant une certaine prédisposition de ces régions, puisque le phénomène de neurodégénérescence impliquant les LINE-1s avait été observé précédemment par l'équipe dans les neurones dopaminergiques de la substance noire. (2) Ces régions impactées pourraient présenter une délocalisation de la protéine ORF1p vers d'autres types cellulaires que les neurones. En effet, on peut spéculer que la neurodégénérescence induite par les LINE-1 lors du vieillissement, comme cela a été montré précédemment par l'équipe dans un contexte de stress oxydatifs (Blaudin de Thé et al., 2018), pourrait conduire à un relargage du ORF1p dans le milieu extracellulaire qui devra être ensuite pris en charge par les cellules microgliales. C'est d'ailleurs ce qui

est avancé par les travaux de Takahashi dans le contexte d'une encéphalomyélite auto-immune induite expérimentalement dans la moelle épinière de souris (F. Takahashi et al., 2022).

Nous avons pu ainsi valider notre première hypothèse. En effet, nos analyses ont démontré que la quasi-totalité du cerveau murin était impactée par l'augmentation d'ORF1p dans le cadre du vieillissement. Certaines régions présentent une augmentation plus accrue que d'autres régions. La région du mésencéphale impliquée dans les processus moteurs (et qui contiennent les neurones dopaminergiques de la substantia nigra) a une intensité d'ORF1p significativement plus élevée chez les souris âgées. Ainsi, cette observation laisse supposer que cette augmentation pourrait mener à une vulnérabilité accrue de ces neurones dopaminergiques notamment vis-à-vis de la neurodégénérescence. En effet, lors d'un stress oxydatif induit par 6-OHDA, l'équipe a montré une neurodégénérescence sélective des neurones dopaminergiques précédé d'une augmentation de l'expression des LINE-1s et de ORF1p. Cette neurodégénérescence pouvait être empêché par l'utilisation de différentes stratégies diminuant l'expression des LINE-1 comme les NRTI (Blaudin de Thé et al., 2018). Ainsi, ce phénomène pourrait avoir lieu lors du vieillissement. Cependant, il est aussi intéressant de noter que certaines régions ayant une plus forte quantité d'ORF1p lors du vieillissement, seront toujours à un niveau inférieur que d'autre régions sans vieillissement. Le striatum dorsal par exemple, qui exhibe une augmentation de 27% de la quantité d'ORF1p lors du vieillissement, reste à un niveau plus faible d'expression que le mésencéphale « moteur » des souris jeunes. Cette observation questionne une fois de plus le possible rôle d'ORF1p dans ces neurones exprimant fortement ORF1p mais aussi la possible tolérance de certaines régions face à cette augmentation.

Dans le cadre de la seconde hypothèse, nous n'avons pas observé une recrudescence de cellules non-neuronales positives à ORF1p lors du vieillissement. En revanche on observe une diminution de la proportion neuronale mais sans pouvoir le relier à une augmentation d'ORF1p. Cette diminution pourrait être incombée à un processus de gliose (Unger, 1998) ou à une perte d'identité neuronale, perte de plus en plus relatée dernièrement dans le contexte du vieillissement (Traxler et al., 2023). Il semble de plus qu'il y ait une tendance puisque les neurones ORF1p+ semblent représenter une proportion plus faible suite au vieillissement dans les régions ayant une augmentation d'ORF1p, questionnant la participation de cette protéine dans la diminution de ces cellules ORF1p+/ NeuN+. En effet, un papier montre que ORF1p pourrait être considéré comme un antigène qui serait détecté par les cellules immunitaires du système nerveux central (F. Takahashi et al., 2022). Dans cette étude, il apparaît que certains lymphocytes reconnaissent spécifiquement ORF1p ce qui induit une sécrétion de

granzyme B qui serait potentiellement à l'origine de la neurodégénérescence dans des modèles de MNs. Cependant, ce phénomène nécessite d'être mieux caractérisé mais ouvre sur la possible implication d'ORF1p dans la mort neuronale. Un autre papier publié par ma collègue Rania Znaidi met en lumière la possible implication d'ORF1p dans ce processus (Znaidi et al., 2023). En effet, sous un stress intense médié par l'arsénite, ORF1p entre dans le noyau et se lie à la membrane nucléaire. Cette liaison altère la localisation de la Lamine B1 et pourrait contribuer à la déformation de la membrane nucléaire. Cette déformation est largement décrite dans le contexte du vieillissement (Mertens et al., 2015; Oberdoerffer & Sinclair, 2007). Ces deux papiers (F. Takahashi et al., 2022; Znaidi et al., 2023), questionnent l'effet que pourrait avoir la quantité d'ORF1p dans ces neurones, mais surtout les possibles conséquences de l'augmentation de cette protéine dans le cerveau en vieillissement.

Il est important de préciser que cette analyse a été effectuée sur des souris femelles et qu'il existe possiblement un dimorphisme sexuel au niveau de l'expression des LINE-1s individuels (Stow et al., 2021). Ainsi, il serait aussi intéressant et nécessaire de confirmer ce phénomène chez des souris males. De plus, bien que de nombreux travaux, explicités plus haut, relatent une augmentation des LINE-1s ainsi que des pistes sur les processus épigénétiques sous-jacents, la régulation post-traductionnelle d'ORF1p demeure méconnue. Cependant, celle-ci pourrait être impactée et ainsi conduire à une surexpression de ORF1p indépendamment d'une dérégulation transcriptionnelle des LINE-1s comme cela est montré dans les testicules de souris (Xu et al., 2008). De plus, l'augmentation de ORF1p observée par Yanxiao Zhang dans les neurones inhibiteurs n'est pas corrélée à une diminution de H3K9me3. Les auteurs ne détectent aucune surexpression des transcrits LINE-1s alors qu'une augmentation de ORF1p est présente (Y. Zhang et al., 2022). Des limitations inhérentes au RNA-seq sur cellule unique pourraient en être la cause, mais la question de l'importance de la régulation post-transcriptionnelle des LINE-1s dans le phénomène d'augmentation d'ORF1p interroge. Enfin, comme dans toutes les études ayant relaté une augmentation de ORF1p dans le système nerveux central y compris la nôtre, seulement deux conditions sont utilisées : jeune versus âgée. Ainsi, on ne sait pas grand-chose sur la dynamique de l'expression d'ORF1p au cours du vieillissement. On pourra tout de même citer une étude dans le cortex murin s'appuyant sur l'expression des LINE-1s à 3, 12 et 20 mois (Ramirez et al., 2022). Les auteurs relatent une augmentation des transcrits LINE-1s à 20 mois mais qui n'est pas détectée à 12 mois. De plus amples investigations seraient nécessaires pour caractériser l'augmentation de ces transcrits au cours du vieillissement. En effet, cette expression est-elle tardive pour augmenter ensuite de manière drastique ? Ou à l'inverse, est-ce une accumulation constante ?

Nous avons pu démontrer dans nos analyses que la quasi-totalité du cerveau murin était impactée par l'augmentation d'ORF1p dans le cadre du vieillissement. Cette observation intrigue par les différents niveaux d'expression, mais il reste possible que les régions ayant une forte expression d'ORF1p accompagnée d'une augmentation significative avec l'âge soient particulièrement affectées. De plus, l'augmentation générale d'ORF1p dans le cerveau converge une fois de plus vers le fait que les LINE-1 complets et codants sont dérégulés lors du vieillissement dans cet organe.

Nous avons voulu ensuite savoir si dans le cerveau humain, il était possible de détecter une augmentation des LINE-1 dans des neurones dopaminergiques post-mortem humains de la *substantia nigra*, dans un contexte de vieillissement. Comme nous l'avons vu, l'activation de LINE-1 dans le vieillissement est particulièrement démontrée dans différents organes mais aussi dans les neurones de l'hippocampe de souris (Copley & Shorter, 2023). De plus, nous avons vu une certaine prédisposition des neurones dopaminergiques et des conséquences de cette dérégulation dans des conditions induites, chez la souris (Blaudin de Thé et al., 2018).

L'analyse de RNA-seq est une tâche complexe, exacerbée lorsqu'elle est utilisée pour quantifier l'expression des éléments transposables. La nature répétée de ces éléments complique l'assignation des reads (read : fragment d'ADN séquencé dont la composition de séquence est connue *in silico* / mapper : assigner un read à un endroit précis du génome) et va ainsi diminuer considérablement la couverture des ETs lorsqu'on applique une méthodologie adaptée. En effet, ces séquences hautement répétées ont des « mappabilités » variables. Plus un ET s'est inséré récemment (on parle évidemment à l'échelle de l'évolution bien que cela pourrait aussi bien être applicable à des échelles bien plus courtes), plus il sera proche d'une séquence « consensus » et donc plus il sera commun aux autres ET « jeunes » c'est-à-dire récemment insérés et peu mutés. Sa mappabilité sera donc plutôt faible et il sera plus difficile de lui assigner des reads d'une manière fiable et « locus-spécifique ». En outre une assignation fautive en faveur d'une autre copie peut conduire à une sous-estimation de son expression. A l'inverse, plus lointaine aura été l'insertion, plus l'ET aura accumulé des mutations le distinguant de ces paires, jusqu'à même créer éventuellement une nouvelle sous-famille. Ces ET auront une meilleure mappabilité. Il faut aussi prendre en compte que la mappabilité est dépendante de la taille des reads.

Mais ce phénomène d'insertion implique un deuxième challenge inhérent à l'étude des ETs : le polymorphisme d'insertion. En effet la quasi-totalité, voire la totalité des études de séquençage de transcrit ARN se font via une mappabilité sur le génome de référence humain. Or celui-ci est unique,

et n'est pas fait pour rendre compte ni des différences d'insertion des ETs entre individus, ni au sein des organes d'un même individu. Pour rappel, rien que pour les LINE-1s, on estime à 285 le nombre d'insertions différentes entre deux individus (Ewing & Kazazian, 2010). Ajoutons à cela le polymorphisme d'insertions entre organe, ou au sein même d'un organe. Plus de 7 000 insertions somatiques putatives ont été identifiées entre 3 individus dans le cerveau (Baillie et al., 2011). Cependant, il est complexe de faire face à ce challenge, qui impliquerait un séquençage de génome entier et un séquençage des transcrits sur cellule unique. Rappelons que le génome humain a été séquencé en 2001 (Lander et al., 2001), cependant il aura fallu attendre l'année dernière pour une carte complète de notre génome (Nurk et al., 2022), et cela n'a clairement pas été réalisé sur cellule unique. C'est pourquoi ce biais ne peut, pour l'instant, pas être écarté et il est important de le garder en tête dans toutes les études caractérisant les ETs, y compris la nôtre.

De plus, un troisième niveau de complexité inhérent à l'étude des ETs est ajouté puisque les ETs peuvent être intergéniques ou intragéniques. Dans le cas des intragéniques, il faudra donc pouvoir différencier ce qui est un transcrit chimérique, contenant des séquences d'ETs et de portion exonique et résultant d'un transcrit issu d'un promoteur génique (ARNm), d'un transcrit reflétant réellement l'expression de l'ETs issue de son promoteur endogène (Figure 12).

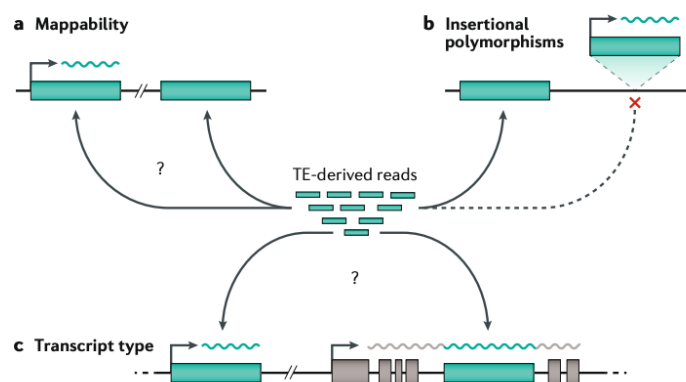


Figure 12 : Les challenges associés à l'études des transcrits issus des éléments transposables (d'après Lanciano et Cristofari, 2020)

On pourra aussi rapidement expliciter un biais inhérent au séquençage lui-même mais qui se retrouve amplifier dans le contexte de l'analyse des ETs. Les reads comportent des erreurs de

séquençage, ainsi chaque base du read à une probabilité d'erreur connue qui lui est associée. Ainsi, un des principes du RNA-seq repose sur le tri et la suppression de ces reads (ou une portion du read). Un read peut donc contenir de potentielles erreurs. Pour cette raison, on autorise un certain degré de mésappariement afin de pouvoir mapper ces reads. C'est le cas aussi dans les analyses des ETs, cependant le mésappariement possible va influencer la mappabilité.

Afin de pouvoir quantifier les LINE-1s intacts au niveau locus-spécifique, nous avons utilisé une méthode de mapping ne gardant que les reads ayant mappé sur une région unique du génome, méthode fortement recommandée pour s'affranchir des biais qui seraient générés avec un mapping dit « random » (Stow et al., 2021; Teissandier et al., 2019). En revanche pour l'analyse des ETs, le mapping random est privilégié puisque l'on regarde des groupes d'ETs. Ce mapping assigne de manière stochastique les reads sur une région parmi toutes les régions où le read a mappé. Cette analyse utilise RepeatMasker qui regroupe les ETs sur trois niveaux : Classe, Famille et Nom. Grâce à ces analyses, nous avons pu montrer que les LINE-1s étaient exprimés différemment lors du vieillissement. Par l'approche de mapping random, nous détectons une plus forte expression de certaines sous-familles de LINE-1s, en particulier les sous-familles les plus récentes (sur le plan évolutif) comme L1HS (spécifique de l'humain) et L1PA2. C'est deux sous-familles contiennent d'ailleurs la totalité des LINE-1s intacts. Cette dérégulation n'est pas corrélée à l'âge, mais les individus catégorisés comme âgés expriment davantage ces sous-familles de LINE-1s que les individus jeunes. Ces données font écho avec les travaux de McKerrow qui retrouvent une observation similaire dans les neurones de l'hippocampe des souris âgées par rapport aux souris jeunes (McKerrow et al., 2023).

Nous avons ensuite voulu caractériser cette expression de manière individuelle au niveau de chaque locus LINE-1 intact. En cumulé, nous avons trouvé une augmentation générale chez les individus âgés. Ces observations via mapping-unique viennent ainsi corroborer avec l'augmentation des sous-familles L1HS et L1PA2 contenant ces LINE-1s intacts observés via le multi mapping. Ces résultats montrent aussi la dérégulation de ces UIDs (Unique Identifier) lors du vieillissement. Sur le plan qualitatif, il semble que certains UIDs vont être sous-exprimés et d'autres surexprimés. Afin de tenter de mesurer l'implication des biais inhérents à l'étude des ETs résumée plus haut, nous nous sommes intéressés à la mappabilité de ces UIDs ainsi qu'à l'expression des UIDs introniques face aux gènes qui les accueillent. Les k-mers sont des séquences de longueur k. On sait désormais quelles séquences du génome sont uniques en définissant les k-mers sur la base de k=50 (Karimzadeh et al., 2018). Ainsi, étant donné que notre analyse a été faite sur des reads d'une longueur de 50 paires de base, nous sommes capables d'analyser combien de k-mers uniques sont présents dans nos UIDs. Nous avons pu

visualiser qu'il n'y a pas de corrélation entre le niveau d'expression et le degré de mappabilité. Cela peut être largement discuté pour différentes raisons. Tout d'abord, le nombre de k-mer par UID n'est pas directement le reflet de la mappabilité. En effet, dans 52 paires de base, il y a 3 k-mers, mais 3 k-mers peuvent aussi être indépendants et représentés 150 paires de base. Ainsi le pourcentage de k-mers unique par UID, une approche que nous avons utilisée dans des données de séquençage sur souris (non représentée dans ce manuscrit), pourrait constituer une alternative à la visualisation des potentiels biais de mappabilité. Une autre raison est d'ordre logique. Plus un élément est mappable, plus il contient des k-mers uniques et plus il peut accumuler des reads lors du mapping. Ainsi, on devrait s'attendre à une certaine corrélation, or ce n'est pas le cas. Les degrés de mésappariement évoqués plus haut pourraient être une explication de ce phénomène. D'autres raisons inconnues pourraient éventuellement expliquer cela, mais il apparaît que dans notre analyse, le résultat observé ne s'explique pas par une mappabilité qui gouvernerait ces observations.

D'autre part, afin de pouvoir discriminer l'expression issue du promoteur endogène des LINE-1s introniques, de l'expression des gènes contenant ces UIDs, nous avons confronté au cas par cas l'expression de l'UID versus le gène accueillant l'UID. Evidemment, cette méthode ne permet pas de définir si un transcrite est chimérique ou non, mais elle permet d'estimer si la dérégulation d'un UID est principalement le fruit d'une dérégulation avant tout génique.

Dans l'analyse différentielle de l'expression des LINE-1s intacts uniques dans le cadre du vieillissement, nous observons une dérégulation de certains UIDs en particulier. On voit globalement plus d'UIDs sur-exprimés que sous-exprimés (le cumul tend vers l'augmentation). L'augmentation ou la diminution de l'expression des UIDs introniques s'explique par une expression de ces UIDs et non par une dérégulation génique.

Bien sûr, il serait très intéressant de réaliser des RTqPCR avec des amorces spécifiques ciblant les k-mers uniques des UID concernés, mais il reste compliqué d'avoir des échantillons d'individus sains de différents âges inférieurs à 60 ans issus de la *substantia nigra*, région très demandée notamment pour son implication dans la MP. Ces RT-qPCR permettraient une validation directe de nos analyses *in silico*.

Nos résultats montrent ici une dérégulation globale des LINE-1s et en particulier ceux intacts, dans les neurones dopaminergiques des individus âgés de plus de 65ans. Cette dérégulation est plus complexe qu'une simple surexpression. En effet, certains UIDs vont se retrouver plus exprimés que d'autres dans le cadre du vieillissement, d'autres UID vont aussi se retrouver sous-exprimés. De ce fait, pourquoi certains UIDs sont plus concernés que d'autres dans cette dérégulation ? Il est difficile de

fournir ici des explications tangibles. En revanche, nous savons que cette surexpression de transcrit LINE-1s peut conduire à l'activation de système immunitaire inné et à l'inflammation. En effet, de nombreux papiers qui relatent une augmentation des transcrit LINE-1s, relatent aussi une accumulation d'ADNc cytoplasmique directement impliquée dans l'activation de la voie cGAS-STING, induisant une réponse interféron puis l'expression de gènes pro inflammatoires (De Cecco et al., 2019; Simon et al., 2019; Thomas et al., 2017). De plus, l'augmentation des transcrits LINE-1s intacts permettrait d'augmenter la quantité de la protéine ORF2p, et donc augmenter aussi son action délétère pour l'intégrité du génome. En effet, si nous détectons une plus grande quantité d'ORF1p dans les souris âgées, cela suggère aussi une plus grande quantité de la protéine ORF2p.

Ainsi nos observations vont dans le sens d'une potentielle implication des LINE-1 dans le vieillissement du cerveau. L'augmentation que nous avons identifiée pourrait accentuer deux caractéristiques du vieillissement : l'inflammation et l'intégrité du génome.

Au vue des concepts explicités dans l'introduction, observe-t-on aussi cette augmentation de LINE-1 et d'ORF1p dans le contexte des MNs ?

III. L'expression d'ORF1p et des LINE-1s dans la maladie de Parkinson et d'Alzheimer

Nous avons voulu savoir si les LINE-1s pourraient se retrouver dérégulés dans le contexte de la MP et de la MA en suivant les mêmes analyses explicitées précédemment. Nous avons donc analysé des données de RNA-seq publiées issues d'échantillons *post-mortem* humains du cortex frontal de patients ayant développé la MA et d'individus contrôle non porteur de cette pathologie (Bennett & Keeney, 2018). L'analyse a aussi été menée de la même manière avec des données provenant du mésencéphale ventral dans le cadre de la MP.

Nous avons trouvé de nombreux ETs dérégulés dans le contexte de ces deux pathologies. Tout d'abord, dans le contexte de la MA, « HERV-Fc1-int » apparait particulièrement surexprimé. HERV-FC1-int est un rétro virus endogène humain avec très peu de copies mais qui est partiellement intact et appartient à la famille des HERV-H/F (Bénil et al., 2003). Il possède un potentiel codant qui pourrait lui permettre d'exprimer la protéine d'enveloppe, une glycoprotéine virale résidant sur la surface du virus qui est important pour la fusion avec la membrane cellulaire pendant l'infection. Cet élément a déjà

été caractérisé comme dérégulé dans plusieurs études, notamment dans le cancer du foie (KARAKÜLAH & YANDIM, 2021), et dans deux régions du cerveau de patient atteint de la MA (lobe temporal : (Grundman et al., 2021); cortex préfrontal dorsolatéral: (Guo et al., 2018)). A noter que la protéine d'enveloppe du HERV-K peut être neurotoxique (Steiner et al., 2022). L'injection de cette protéine dans le cerveau murin conduit à une neurodégénérescence. De plus, cette protéine est retrouvée dans le liquide cébrospinal de patient souffrant de la Sclérose latérale amyotrophique (Steiner et al., 2022). En plus de cet élément, plusieurs autres éléments transposables comme les SINEs ont aussi été caractérisés comme étant surexprimés, tels que les Alu et les SVA.

Des observations similaires ont été constatées dans le contexte de la MP dans le mésencéphale centrale concernant les mêmes familles mais avec d'autres éléments. On retrouvera des SINEs, parmi eux, des Alu et des SVA comme dans la MA. HERV3-int est aussi détecté, un élément qui a déjà été caractérisé comme dérégulé dans le cancer du foie et du poumon (Arroyo et al., 2019; KARAKÜLAH & YANDIM, 2021). Une famille de LINE-1s mais ne contenant pas de LINE-1s intacts est aussi sur-exprimée dans le contexte de Parkinson. En utilisant des échantillons *post-mortem* humains issus de 5 individus atteint de la MA et de 5 contrôles aussi issus du cortex frontal (NeuroCEB brain bank), nous avons pu confirmer une partie de nos analyses *in silico* par RT-qPCR. Par cette approche, nous avons validé la surexpression des SVA ainsi que de HERV-Fc1 dans le contexte de la MA. Nous avons aussi réalisé ces RT-qPCR sur les 3 régions codantes des HERV-k et avons trouvé uniquement la partie gag comme surexprimée dans les malades Alzheimer. D'autre part, bien que les LINE-1s n'apparaissent pas comme dérégulés dans notre analyse bio-informatique, nous avons trouvé une expression plus forte de ces éléments par RT-qPCR dans cette pathologie. Nous avons ensuite caractérisé l'expression des LINE-1 intacts dans les données RNA-seq et avons trouvé des UIDs dérégulés dans la MA et la MP. Nous avons, comme explicité au chapitre précédant, analysé l'expression des UIDs introniques dérégulés face à l'expression des gènes qui les accueillent. De plus, nous avons confirmé la surexpression de deux UIDs dans le contexte de la MA par RTqPCR via des amorces ciblant spécifiquement les k-mers uniques de ces éléments. De manière intéressante, ce ne sont pas les mêmes UIDs qui apparaissent dérégulés entre les deux pathologies.

Cela nous amène à formuler différentes hypothèses concernant nos observations. Tout d'abord, il se pourrait que l'expression au niveau locus-spécifique de ces LINE-1s intacts soit dépendante de la région observée. Un phénomène déjà constaté chez la souris non pas au niveau régional au sein d'un même organe, mais entre organes (Stow et al., 2021). Concernant l'expression différentielle entre les deux pathologies, il pourrait exister une signature de cette dérégulation qui serai spécifique d'une part pour la MA et d'autre part pour la MP. Nous pouvons espérer à l'avenir l'émergence d'études s'intéressant à la dérégulation des LINE-1s via L1base (Penzkofer et al., 2017) afin

de pouvoir comparer les UIDs apparaissant comme dérégulés dans ces maladies. Cela permettrait, en rassemblant ces études, de cibler des éléments LINE-1s uniques en particulier et de s'orienter plus en profondeur sur l'hypothèse d'une signature spécifique de certains UIDs en fonction des pathologies, puisque seulement une portion des LINE-1s intacts est responsable de la rétrotransposition chez l'humain et donc *a fortiori* d'un niveau d'expression élevée (Brouha et al., 2003). Nos résultats vont donc dans ce sens, mais il manque d'autres études permettant de caractériser l'expression des UIDs. Il existe à ma connaissance une seule étude ayant caractérisé ces UIDs, dans le domaine de l'oncologie, mais aucun UID commun à notre étude n'a été mentionné, accentuant la spécificité de l'expression de ces UIDs à travers les tissus, régions ou pathologies. Il semble cependant important de préciser deux points sur ces analyses. Premièrement, à l'inverse de notre étude précédente axée sur le vieillissement des neurones dopaminergiques *post-mortem* humains, ces deux analyses proviennent de tissus grossiers non-enrichis en un certain type cellulaire. Ainsi, notre analyse reflète l'expression d'une multitude de type cellulaire et de populations neuronales. Deuxièmement, le reflet de cette expression est obtenu à un moment t , lors de l'extraction des ARN. De ce fait, cette analyse ne peut prendre en compte la dynamique de l'expression de ces LINE-1s. En effet il est possible que l'expression des UIDs soit un phénomène très dynamique dans le temps.

Parallèlement, nous nous sommes intéressés à l'expression d'ORF1p chez des individus sains ou atteints de la MP, dans le gyrus cingulaire, une des régions affectées dans la MP (Vogt, 2019) et dans le cervelet, une région relativement moins impactée dans cette pathologie. Nos analyses laissent entendre un changement de ratio de la protéine entre le cytoplasme et le noyau dans le gyrus cingulaire chez les individus atteints de Parkinson. En revanche, ce changement de ratio n'est pas détecté dans le cervelet. Il aurait donc une plus forte présence de ORF1p dans le cytoplasme des individus malade mais la normalisation par l'actine ne laisse supposer qu'une tendance vis-à-vis de cette augmentation. De plus ORF1p pourrait éventuellement se retrouver en proportion non négligeable dans la fraction des protéines peu ou non-solubles qui sont éliminées avec les débris cellulaires lors du processus d'extraction protéique, notamment par ses nombreuses caractéristiques évoquées dans l'introduction. Ainsi, ces résultats vont dans le sens d'une expression et d'une localisation altérées d'ORF1p chez les individus ayant développés Parkinson, avec une spécificité régionale, mais de plus amples expériences, notamment via l'imagerie par immunofluorescence, sont nécessaires afin de confirmer cette observation.

Mit bout à bout, ces données permettent de caractériser l'expression de certains ETs, des LINE-1s et d'ORF1p dans le contexte de deux MNs. Nous avons vu une surexpression de certains rétrotransposons dans la MA et la MP. Certains d'entre eux ont été validés indépendamment dans d'autres tissus atteints de ces mêmes pathologies. De plus, d'autres études récentes ont trouvé des

expressions altérées des mêmes familles de rétrotransposons (SVA, SINE, HERV-Fc1) dans le contexte de la MA (Grundman et al., 2021; Guo et al., 2018). Mais, comment la dérégulation de ces rétrotransposons que nous avons observée pourrait-elle participer à l'établissement des MNs ?

Plusieurs aspects sont concernés et seront énumérés ci-dessous :

Tout d'abord, les rétrotransposons identifiés dans notre étude, à savoir LINEs, SINEs et HERVs sont détectés par le système immunitaire inné. La surexpression de ces ETs dans certaines régions du système nerveux central pourrait, comme explicité dans l'introduction, déclencher ce système et conduire à une neuroinflammation, une composante importante des MNs. En effet, cette activation des rétrotransposons et son lien avec l'activation du système immunitaire inné est de plus en plus documentée à la fois dans la senescence, dans des pathologies comme le cancer ou dans des pathologies auto-immunes comme le syndrome d'Aicardi Goutieres (Gazquez-Gutierrez et al., 2021). Les LINE-1s, SINEs et HERV peuvent conduire à l'expression d'interféron déclenchant une cascade de signalisation menant à une réponse immunitaire pouvant impacter l'intégrité cellulaire (Alcazer et al., 2020; Russ & Iordanskiy, 2023; Stenz, 2021) (Figure 13). Les « produits » géniques comme les dsRNA (Tunbak et al., 2020), les dsDNA (Mathavarajah & Delleire, 2023), les ADN simple brin (ssDNA)(Thomas et al., 2017), mais aussi les séquences LINE-1 RNA ou le LINE-1 RNP (Luqman-Fatah et al., 2023) vont de différentes manières pouvoir être détectés par le système immunitaire inné et induire une réponse interféron.

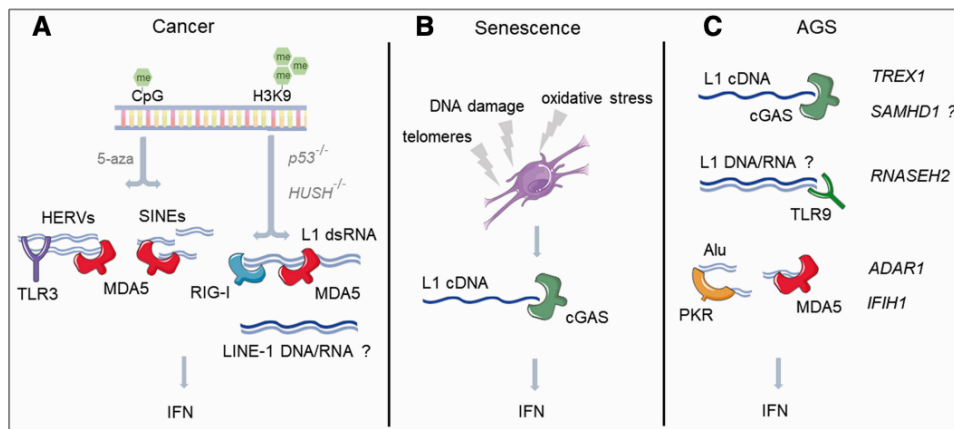


Figure 13 : Reconnaissance des rétrotransposons par le système immunitaire inné et déclenchement de la réponse interféron dans le cancer, la senescence et le syndrome d'Aicardi Goutieres (AGS) (d'après GÁZQUEZ-GUTIÉRREZ et al, 2021)

Le système immunitaire doit donc très probablement tolérer une expression basale de ces rétrotransposons qui cible et dégrade les acides nucléiques de ces ETs (Kassiotis & Stoye, 2016). Cependant dans le cas d'une surexpression, cela pourrait entraîner une réponse inflammatoire conséquente pouvant mener à la neuroinflammation. Certaines études évoquent même que les régulateurs LINE-1s seraient donc indirectement des régulateurs de la réponse interféron (Zhao et al., 2018). Il faut aussi rappeler les nombreuses études relatant une baisse de la neuroinflammation, de la senescence ou du déclin des fonctions cognitives en ciblant la production d'ADNc cytoplasmique des rétrotransposons par l'utilisation de NRTIs (De Cecco et al., 2019; Simon et al., 2019; T. Takahashi et al., 2022; Wahl et al., 2023).

D'autre part une étude récente suggère que les ARN LINE-1 impacteraient l'activité enzymatique de la protéine SUV39H (Della Valle et al., 2022). Il en résulterait une érosion globale des territoires hétérochromatiniens. Dans notre étude, nous avons vu que des UIDs s'allumaient en fonction des pathologies. La dérégulation des LINE-1 observée, ici via la présence de leur ARN, pourrait donc affecter la composition de la chromatine dans le contexte des MNs en jouant sur l'activité protéique de certains acteurs clefs, notamment SUV39H.

Ensuite, au vu de l'augmentation des LINE-1s par RT-qPCR dans la MA et l'activation de certains UIDs spécifiques dans la MP et la MA, il se pourrait que cela impacte la quantité des protéines ORF1p et ORF2p. Contrairement à notre étude dans le vieillissement chez la souris, nous n'avons pas observé une plus grande quantité d'ORF1p dans nos échantillons humains atteints de la MP, bien qu'une légère tendance soit observée. ORF2p quant à lui n'est pas décelable même après enrichissement du L1-RNP (Ardeljan et al., 2020). Il serait alors possible d'hypothétiser sur une plus grande quantité d'ORF2p dans ces pathologies qui conduirait à une instabilité génomique comme nous l'avons évoquée lors du vieillissement.

En plus de l'activité endonucléasique d'ORF2p, la composante protéique des ETs pourrait influencer l'établissement des MNs de trois manières. La première pourrait être l'action d'ORF1p sur la membrane nucléaire, montrée récemment par l'équipe (Znaidi et al., 2023). D'autant plus qu'il semble y avoir une délocalisation de la protéine ORF1p dans le gyrus cingulaire des individus atteints de la maladie de Parkinson, bien que cela reste à confirmer. La deuxième pourrait être la détection d'ORF1p comme antigène, qui a été explicitée plus haut (F. Takahashi et al., 2022). Cela induira donc le système immunitaire mais cette fois via la composante protéique des LINE-1s.

Enfin, l'étude des partenaires protéiques de la protéine ORF1p peut être enrichissante pour comprendre la possible implication des LINE-1s dans un contexte pathologique. Cet aspect sera évoqué dans la prochaine sous-partie.

Ainsi, cette étude illustre une potentielle dérégulation des ETs et des LINE-1 intacts. Cette observation va dans le sens d'un possible lien avec la neurodégénérescence comme cela a été explicité dans l'introduction et dans les aspects formulés ci-dessus. Une fois de plus, il semble que l'étude des ETs soit d'une grande importance dans la compréhension globale de l'établissement de ces pathologies. Il est fort probable, avec l'accumulation des travaux dans ce domaine dans les prochaines années ou décennies, que les LINEs-1 soient considérés comme une des cibles thérapeutiques ou même préventives de ces MNs.

Cependant il me paraît important d'insister sur le fait que certains individus diagnostiqués comme ayant soit la MA soit la MP présentent un niveau d'expression des rétrotransposons similaires aux individus sains. Ainsi, à l'instar de la protéine SIRT6 avec le vieillissement, il se pourrait que nous ne soyons pas tous égaux face au contrôle des ETs. Il existe sûrement d'autres variants de certains régulateurs de ces rétrotransposons, et certaines personnes vont alors développer des MNs mais sans être affectées sur le plan ETs.

L'hétérogénéité sur le plan transcriptionnel au sein d'une même maladie neurodégénérative est très bien illustrée dans le cadre de sclérose latérale amyotrophique (Tam et al., 2019). Ainsi, certains patients pourraient développer certaines MNs par la composante ETs et d'autre part les multiples aspects évoqués dans l'introduction.

La dérégulation des ETs est donc probablement une composante des MNs et certains individus vont être plus susceptibles que d'autres à cette dérégulation. De la même manière que certaines personnes vont atteindre des âges très avancés sans développer de MNs.

IV. Partenaires d'ORF1p dans le cerveau murin et dans les neurones dopaminergiques en condition de stress

Dans mon projet de thèse, je me suis aussi intéressé aux partenaires d'ORF1p endogènes, à la fois dans le cerveau de souris, et dans les neurones dopaminergiques humains en culture soumis ou non à un stress à l'arsénite. Les partenaires caractérisés peuvent globalement être soit des protéines relatives au cycle de vie du LINE-1, soit à son contrôle, soit n'appartenant pas à ces deux catégories. Il est cependant difficile de définir quels interacteurs sont impliqués dans le cycle de vie du LINE-1 car ils sont peu définis contrairement aux régulateurs qui sont mieux caractérisés.

Nous avons pu identifier plus d'une quinzaine de régulateurs des LINE-1s dans les analyses de spectrométrie de masse sur les neurones dopaminergiques humains en culture, dont certains n'avaient jamais été identifiés comme interagissant avec le L1-RNP (MORC2, XRCC6, SAFB). Ces résultats mettent en avant les interacteurs mis en place par les neurones pour réguler l'activité des LINE-1. Ils viennent d'une certaine manière confirmer la vision établie dans le domaine des rétrotransposons : des éléments « égoïstes » ayant pour finalité la rétrotransposition dans le génome d'une cellule qui elle, de son côté, met tout en place pour réprimer cette activité délétère. Cependant, plusieurs résultats montrés dans ce manuscrit interrogent cet aspect des LINE-1s.

Cette dernière partie de la discussion propose donc de confronter les partenaires d'ORF1p (trouvés dans nos études et celles des autres équipes (Ardeljan et al., 2020; De Luca et al., 2023; Goodier et al., 2007, 2013; Moldovan & Moran, 2015; Peddigari et al., 2013; M. S. Taylor et al., 2013, 2018)) à une littérature majoritairement récente afin de spéculer sur de possibles effets pathologiques, mais aussi sur des pistes du/des potentiel(s) rôle(s) physiologique(s) d'ORF1p dans les neurones.

A. Des partenaires ORF1p conservés de l'humain à la souris.

Nous avons trouvé 24 interacteurs d'ORF1p conservés de l'humain à la souris dans nos analyses de spectrométrie de masse réalisées dans le cerveau de la souris et dans des neurones dopaminergiques humains *in vitro*. Cette observation implique possiblement le maintien d'acteur protéique clef pour réaliser le cycle de vie du LINE-1 dans ces deux espèces. On peut mentionner par exemple RANBP2, NUP133 des protéines du pore nucléaire qui pourraient constituer des interacteurs intéressants pour l'entrée du LINE-1 dans le noyau. Nous avons aussi retrouvé PRKRA, une protéine récemment démontrée comme un activateur de l'activité LINE-1 et de l'expression d'ORF1p (De Luca et al., 2023) Le coté C-ter contenant le domaine de reconnaissance à l'ARN est plutôt bien conservé entre les deux espèces ((Naufer et al., 2019), Figure 7), en témoignent les 17 RBPs sur 24 protéines communes retrouvées. Le maintien de ces interactions entre le L1-RNP et ces protéines au cours de l'évolution doivent donc être important pour ces deux espèces, tant sur le plan de la répression que sur le plan d'un potentiel rôle physiologique.

B. Implications pathologiques.

1. Intégrité de la membrane nucléaire

Tout d'abord, ma collègue Rania Znaidi a démontré que ORF1p altère l'intégrité de la membrane nucléaire et perturbe le transport nucléocytoplasmique dans les neurones soumis à un stress intense (Znaidi et al., 2023), comme cela a été explicité plus haut. Cette étude fait suite à la découverte de nombreux partenaires d'ORF1p qui composent la membrane nucléaire, uniquement en condition de stress dans nos analyses de spectrométrie de masse. En effet, on retrouvera par exemple HP1, deux protéines des pores nucléaires : NUP133 et NUP153, Ran et KPNB1 parmi d'autres. La caractérisation de certains partenaires permet aussi de définir des acteurs protéiques putatifs impliqués dans le cycle de vie du LINE-1, notamment dans l'importation du L1-RNP/ORF1p dans le noyau des neurones. Il serait très utile pour le L1-RNP d'interagir avec ces deux NUPs et KPNB1 pour tenter d'accéder au noyau.

2. Équilibre du RBPome

Les RBPs (RNA Binding Protein ; Protéine de liaison à l'ARN) sont de plus en plus reliés aux maladies neurodégénératives (Conlon & Manley, 2017). Les RBPs régulent des processus essentiels de la cellule (export, stabilisation/dégradation de l'ARN, épissage, traduction) (Kelaini et al., 2021). La plupart de ces RBPs ont une aptitude à effectuer la séparation de phase et à s'agglomérer comme nous l'avons évoqué dans l'introduction. De plus, il apparaît que les RBPs régulent la transmission et la plasticité synaptique des neurones (Schieweck et al., 2021).

Certains travaux proposent que dans le cerveau, les RBPs forment un interactome (RBPome) dont l'équilibre est essentiel au maintien de leur fonction ((Schieweck et al., 2021), Figure 14). Ainsi, la perturbation du réseau complexe de RBPs pourrait entraîner, d'après les auteurs, certaines pathologies en particulier dans le cerveau. Cet équilibre est d'autant plus important puisqu'il est responsable de l'homéostasie traductionnelle. Cet équilibre repose sur ces RBPs, sur les quantités d'ARN et sur la capacité de fixation des RBPs à certains ARN. Évidemment, le concept explicité par Rico Schieweck, se doit d'être un minimum résilient et tolérer certains déséquilibres. Cependant, ce concept prend du sens quand on observe dans les MNs un grand nombre de RBPs qui tend à former des agglomérats comme TDP-43 et Fus par exemple (Patel et al., 2015; Portz et al., 2021; Prasad et al., 2019; Vance et al., 2009).

Dans nos résultats de spectrométrie de masse dans les neurones dopaminergiques, nous avons observé plus de 200 RBPs différents. Ces résultats sont relativement attendus étant donné que ORF1p

est également un RBP et qu'il est déjà mentionné comme interagissant avec des RBPs (Goodier et al., 2007). Cependant, le RBPome était drastiquement modifié en fonction de la présence du stress. Ainsi, l'augmentation de ORF1p et de LINE-1s dans ce contexte de stress est accompagnée d'un changement de RBPs, qui pourrait, comme évoqué précédemment, altérer certaines voies de signalisation cellulaire.

Une revue s'intéressant aux RNA-binding proteins dans le contexte des MNs conclue que le dosage des RBPs est un mécanisme central dans les MNs (Conlon & Manley, 2017).

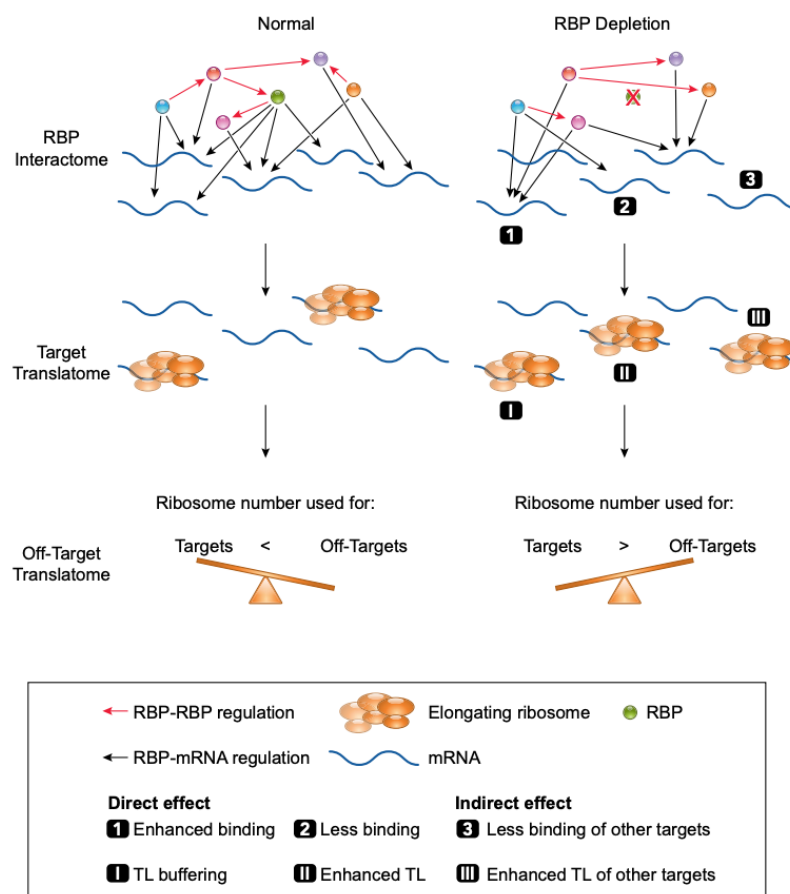


Figure 14 : L'équilibre de l'interactome des RBPs et sa perturbation (d'après Schieweck, Physiological review, 2020)

3. RBP impliqués dans la neurodégénérescence et interagissant avec ORF1p

Une étude en particulier permet de donner plus de consistance au concept évoqué précédemment (Appocher et al., 2017). Chez la drosophile sur-exprimant ou non l'orthologue humain de TDP-43, les auteurs ont supprimé sélectivement l'expression de différentes hnRNPs (Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins) via des ARN interférants. De cette manière, ils ont pu montrer une modification du phénotype neurotoxique dans l'œil des drosophiles sur-exprimant TDP-43 en fonction des hnRNPs ciblées (Figure 15). Ils ont aussi démontré cela avec la hnRNP DAZAP1 dans les neurones humains en culture. La protéine TDP-43 et son agrégation sont fortement liées au contrôle des ETs et aux MNs (T. D. Li et al., 2022; Nilaver & Urbanski, 2023). Ainsi, les auteurs montrent ici l'importance du maintien des niveaux d'expression des différentes hnRNPs dans la fonction physiologique de TDP-43. En effet, lorsque ces niveaux de hnRNPs sont impactés, cela perturbe la fonction de TDP-43 dans les neurones ce qui va ensuite altérer un grand nombre d'ARNm issu de gènes neuronaux et synaptiques (Appocher et al., 2017). Chez les patients ALS où le niveau de TDP-43 est altéré, on retrouve aussi un changement des quantités de protéines hnRNPs (Appocher et al., 2017).

Human gene	Fly gene symbol	ID RNAi	hnRNP RNAi	
			TBPH GOF	Wild-type
Enhancers				
hnRNP U ★	-/CG30122	106984 KK	**	ns
		2912 GD	***	ns
hnRNP K ★	Bl/CG13425	105271 KK	ns	ns
hnRNP D	Sqd/CG16901	32395 GD	***	ns
Mild Suppressors				
		44658 GD	***	ns
hnRNP M	Rump/CG9373	44659 GD	***	ns
		1000001 KK	ns	ns
hnRNP I	Heph/CG31000	33735 GD	***	ns
		110749 KK	***	ns
hnRNP L ★	Sm/CG9218	28117 GD	***	ns
		108351 KK	***	ns
hnRNP A2	Hrb87F/CG12749	100732 KK	***	mp
Strong Suppressors				
		16040 GD	***	ns
DAZAP1 ★	Hrb27c/CG10377	16041 GD	***	ns
		101555 KK	***	ns
hnRNP C ★	-/CG42458	47828 GD	***	ns
		108072 KK	***	ns
hnRNP F/H	Glo/CG6946	27752 GD	***	ns
		110653 KK	***	ns
		33011 GD	***	ns
hnRNP R/Q	Syp/CG17838	33012 GD	***	ns
		110542 KK	***	mp
hnRNP A1 ★	Hrp38/CG9883	31303 BSC	***	ns

Figure 15 : Bilan du silencing de ces hnRNPs sur le phénotype des drosophiles sur-exprimant TDP-43

(D'après Appocher, NAS, 2017)

Les hnRNPs interagissant avec ORF1p dans notre étude sont entourés en rouge, ceux connus comme interagissant avec ORF1p dans les spectrométries de masse publiées sont accompagnés d'une étoile.

Nous avons trouvé que les hnRNPs impliquées dans cette étude interagissaient avec ORF1p dans nos neurones dopaminergiques. Plus intéressant encore, presque tous ces hnRNPs étaient retrouvés en plus grande quantité comme liée à ORF1p dans les cellules stressées dans ces analyses de spectrométrie de masse. Une autre étude montre que hnRNP-U et hnRNP-A2 inhibent la neurotoxicité induite par TDP-43 (Suzuki et al., 2015), ces deux protéines sont aussi des partenaires de ORF1p dans nos neurones dopaminergiques.

Il se pourrait donc que le niveau d'expression d'ORF1p et des hnRNPs, fluctuant en cas de stress, induise de plus grands nombres d'interaction entre eux, influençant alors TDP-43. Une hypothèse serait que l'augmentation d'ORF1p dans le vieillissement conduise à un déséquilibre de la disponibilité de ces hnRNPs qui impacterait à son tour TDP-43 et son potentiel de formation en agrégats toxiques. Ainsi, le L1-RNP ou ORF1p pourrait avoir un effet neuro-pathologique par interactions avec ces hnRNPs et perturber leur fonctionnement.

Un autre aspect peut être discuté, entre les RBPs liés à ORF1p d'une part et l'agrégation comme mécanisme de la neurodégénérescence d'autre part. En effet, plusieurs mécanismes conduisant à l'agglomération des RBPs dans le processus neurodégénératif sont avancés. Il y a tout d'abord les RBPs qui vont se lier à des motifs répétés de l'ARN. On citera par exemple les répétitions « GGGGCC » ou G4C2 qui seraient associées à l'établissement des MNs (E. Wang et al., 2021). Du côté des LINE-1s, ces motifs forment des structures G-quadruplex qui sont très présentes dans le 3'UTR de ces rétrotransposons (Sahakyan et al., 2017). Indépendamment des séquences LINE-1, ces motifs ARN conduisent à une agglomération avec la protéine ORF1p (Pereira et al., 2018). Parmi les 6 RBPs identifiés comme séquestrés par ces structures d'ARN et conduisant à une altération de processus cellulaire (Jazurek et al., 2016), 5 (hnRNPA3, Pur α , Alyref, NCL, eIF α) sont caractérisés comme interagissant avec ORF1p ((Goodier et al., 2013; Moldovan & Moran, 2015) et notre étude sur ORF1p humain). D'autres motifs répétés (CUG, CAG, CGG) conduisent à une séquestration de RBPs, une majorité d'entre eux sont des partenaires d'ORF1p (Jazurek et al., 2016). D'autre part, deux RBPs sont impliqués dans le processus de neurodégénérescence mais sont aussi partenaires d'ORF1p dans les neurones dopaminergiques et dans les neurones du cerveau de la souris (ATXN2, NOP56) (Conlon & Manley, 2017).

On retrouvera aussi comme partenaire de ORF1p, une proportion non négligeable de protéines avec un domaine « Prion like ». Ce domaine participe au phénomène de séparation de phase liquide et joue un rôle fondamental dans l'agglomération des protéines dans le cadre des MNs (March et al., 2016). Comme mentionné dans l'introduction, ORF1p possède aussi dans sa partie N terminale et sa partie superhélice des propriétés de séparation de phase *in vitro* ((Newton et al., 2021), Figure 7). Ces caractéristiques pourraient impliquer la formation de granules séquestrant les partenaires d'ORF1p eux

aussi contenant ce domaine. Enfin le domaine superhélice de ORF1p est responsable de formation massive de polymère (Naufer et al., 2019).

Par tous ces différents aspects explicitant à la fois le potentiel agglomérant du L1-RNP et les nombreux partenaires interagissant avec ORF1p, ces interacteurs pourraient se retrouver séquestrés et ainsi ne plus exercer leurs fonctions correctement.

4. ORF1p et RBP impliqués dans les modifications m6A.

L'étude des modifications methyladenosines (m6A) de l'ARN est un sujet en plein essor. Il y a deux ans, une équipe s'est intéressée à séquencer les ARN naissants porteurs de cette modification et a découvert que les LINE-1 introniques et jeunes sur les plans évolutifs sont particulièrement marqués par cette modification (Xiong et al., 2021). Ces ARNs LINE-1s se lient à une douzaine de RBPs impliquée dans la fixation de ces ARNs modifiés. Plus intéressant encore, dans les tissus fœtaux humains, la plupart de ces LINE-1s caractérisés dans l'étude se trouvent dans des gènes longs cruciaux pour les fonctions neuronales et synaptiques (Xiong et al., 2021). Les auteurs concluent que ces modifications présentes sur ces ARN LINE-1s participent à la vulnérabilité des longs gènes accueillant ces LINE-1s introniques. Les auteurs ajoutent que la protéine SAFB se lie spécifiquement à ces LINE-1s modifiés m6A afin de diminuer ces transcrits et préserver la transcription des gènes concernés. Or, dans notre étude, nous retrouvons un grand nombre de RBP impliqués dans les modifications m6A (Lesbirel et al., 2018). Parmi la douzaine de RBP interagissant avec les LINE-1s modifiés m6A, la moitié est retrouvée dans notre analyse comme interagissant avec ORF1p dans les neurones dopaminergiques. La grande majorité de ces RBP est retrouvée à la fois sans et avec stress, soit dans 10/10 échantillons analysés mais en plus grande quantité dans la condition stressée. De plus, SAFB, la protéine gardienne du mécanisme dévoilée par Feng Xiong, est aussi présente comme interacteur d'ORF1p dans nos analyses et retrouvée majoritairement en cas de stress. Il a été montré que 19 régulateurs des modifications m6A de l'ARN se retrouvent dérégulés dans un certain type de cancer (Y. Zhang & Yang, 2021). La moitié de ces régulateurs sont retrouvés dans notre analyse. De plus, il existe une altération des transcrits modifiés m6A dans le contexte de la MA et de la MP (Deng et al., 2022).

Ainsi, nos données de spectrométrie de masse viennent corroborer l'interaction de ces RBPs avec le LINE-1, mais en ajoutant ORF1p à ce mécanisme. ORF1p aurait-il la possibilité de se lier à ces transcrits LINE-1 introniques naissant dans le noyau ? ORF1p a été montré comme présent en faible quantité dans le noyau de ces neurones dopaminergiques avec une quantité augmentée en condition de stress (Znaidi et al., 2023). De plus, ORF1p pourrait s'ajouter à la complexité de cette équation, en s'associant à ces RBPs spécifiques de la modification m6A. Ils pourraient alors potentiellement être

impliqués dans la vulnérabilité des longs gènes neuronaux, ces fluctuations d'expression pouvant perturber le fonctionnement normal de ces RBPs si particulier.

C. Potentiel physiologique

On a longtemps pensé que le génome non-codant était un ADN poubelle (« junk-DNA ») mais sa complexité est de plus en plus décryptée pour laisser place à des rôles prépondérants : régulateurs, mosaïcisme inter et intra individuel, rôle dans l'évolution et dans l'embryogénèse. Ne pourrait-il pas en être de même pour les protéines issues de la partie codante du génome « non-codant » ?

Cette dernière partie de la discussion propose de considérer la dérégulation des LINE-1 et de ORF1p dans le cerveau, non pas seulement comme une augmentation de processus délétère (revue), mais aussi comme une potentielle affectation des voies de signalisation de ORF1p normalement régulées en condition basale. Ainsi, les potentiels rôles d'ORF1p seraient altérés lorsque celle-ci serait dérégulée, ne laissant visible qu'un rôle néfaste.

Plusieurs aspects de ma thèse mettent en avant plusieurs questionnements sur le possible rôle d'ORF1p en condition physiologique dans les neurones. ORF1p est retrouvé en condition physiologique dans tout le cerveau. De plus, toujours en condition physiologique, ORF1p est spécifique des neurones et des quantités variables y sont retrouvées. Enfin, les nombreux partenaires d'ORF1p dans les neurones murins et humains interrogent en particulier au vu des RBPome et des GO term caractérisés. Si les neurones conservent une telle quantité d'ORF1p, est-ce simplement pour les réprimer ?

De plus, compte tenu du nombre de régulateurs des LINE-1, une fonction physiologique serait alors hautement régulée, permettant une fonction très finement contrôlée. Toute fonction physiologique reposant sur un bon dosage d'effecteurs.

1. Immunité

De plus en plus de papiers sont en train de converger vers l'idée que les LINE-1 sont impliqués dans le contrôle de la réponse interféron (N. Liu et al., 2018; Luqman-Fatah et al., 2023; Rookhuizen et al., 2021; Tunbak et al., 2020; Zhao et al., 2018).

Il a été montré que LINE-1 régule la réponse interféron sous le contrôle du complexe MORC2/HUSH (N. Liu et al., 2018; Tunbak et al., 2020). Cette année, il a été montré que HELZ2 fait de même tout en interagissant avec ORF1p et limite l'accessibilité du LINE-1 et la réponse interféron qui

en découle (Luqman-Fatah et al., 2023). Ce même mécanisme est démontré avec la protéine TRIM5 α qui interagit aussi avec ORF1p (Volkman et al., 2020). TRIM5 α est un facteur de restriction rétrovirale mais qui semble fonctionner en synergie avec ORF1p : plus LINE-1 est actif, plus TRIM5 α induit une réponse interféron. A l'inverse plus TRIM5 α est exprimé et plus l'activité promoteur des LINE-1 est réduite (Volkman et al., 2020). Ces résultats laissent entendre que LINE-1 et ORF1p auraient un rôle à jouer en ajoutant un niveau de contrôle à la réponse interféron. Cela est explicité dans un papier toujours sur bioRxiv où les auteurs spéculent sur le fait que LINE-1 serait central dans la réponse immunitaire innée (Rookhuizen et al., 2021).

Parmi nos partenaires de ORF1P humains, nous retrouvons MORC2, TRIM5 α ainsi que 13 autres protéines du système immunitaire inné. Il existe une expression basale d'interféron dans les neurones et celle-ci permet un contrôle précoce d'une infection virale (Cavanaugh et al., 2015). Les axones des neurones fournissent une structure parfaite pour la dissémination des virus en s'affranchissant de la réponse immunitaire extracellulaire. C'est pourquoi certains virus ont la capacité d'utiliser le transport antérograde des axones pour s'y déplacer et infecter le neurone (M. P. Taylor & Enquist, 2015).

Il se pourrait que le L1-RNP, par sa composante protéique et nucléique et son implication dans la production d'ADN cytoplasmique, participe à un seuil minimal d'interféron dans le neurone. Un avantage majeur en résulterait : une réponse accrue accompagnée d'une latence diminuée lors d'une infection virale, augmentant la survie du neurone face à cette infection.

2. ORF1p dans le carrefour métabolique des ARNs

Dans les neurones dopaminergiques humains et les neurones de souris, les RBPs sont présents en grande proportion. Ces RBPs coordonnent le contrôle post-transcriptionnel de l'expression de gène par l'export, l'épissage, la stabilisation, la dégradation et la traduction des ARN. Certes ces protéines sont intrinsèquement liées au cycle de vie et au contrôle de LINE-1. Mais il se pourrait que ORF1p participe à cette régulation notamment par les différentes caractéristiques développées précédemment. De plus, son affinité à l'ARN n'est pas séquence spécifique et il se lie avec de nombreux ARN autres que les LINEs notamment avec des ARN poly-A (Briggs et al., 2021). Comme il a été montré dans l'embryologie que l'ARN LINE-1 est un acteur essentiel à la sortie du stade 2 cellules chez la souris en recrutant des protéines afin de réprimer des gènes (Percharde et al., 2018), même si l'implication de ORF1p n'y est pas mentionnée. Ainsi, ORF1p/L1-RNP ne pourraient-ils pas servir ces mécanismes notamment post-transcriptionnels puisqu'il s'est adapté à ces mécanismes afin de parfaire son cycle de vie et ce depuis des millions d'années d'évolution ?

Au vu des clusters protéiques relatifs aux protéines ribosomales et à l'épissage retrouvé dans les neurones dopaminergiques, et dont l'interaction avec ORF1p semble particulièrement modulée, le niveau d'expression d'ORF1p ne pourrait-il pas influencer ces mécanismes ? Ces protéines sont toutes des RBPs s'articulant en un interactome complexe et dynamique où ORF1p ou le L1-RNP est présent. La capacité de fixation à des ARNs, à former des agrégats et à interagir avec des protéines différentes entre deux conditions pourrait ouvrir la voie à de nouveaux rôles physiologiques d'ORF1p, en particulier si cette expression est conservée dans tout un organe, avec des spécificités et des niveaux d'expression différents.

Enfin, des complexes protéiques retrouvés dans nos analyses comme interagissant avec ORF1p laissent perplexes. Chez la souris nous avons retrouvé une partie du complexe SWI/SNF et de l'ARN pol II. Plusieurs résultats récents de notre équipe montrent une présence d'ORF1p dans la fraction chromatinienne par fractionnement subcellulaire dans le cerveau de la souris âgée de 3 mois. De plus, chez les neurones dopaminergiques humains non stressés, 24 protéines se lient à la chromatine. Ces résultats questionnent tant sur le plan pathologique que physiologique.

Comme dernier point, il serait intéressant de caractériser si ces interactions avec ORF1p sont directes ou si elles sont médiées par l'ARN (notamment dans le cas des RBPs). La réalisation de co-immunoprécipitation avec une RNase permettrait ainsi de caractériser les partenaires directs d'ORF1p.

CONCLUSION

Les maladies neurodégénératives peuvent être considérées comme une exacerbation du processus de vieillissement (Azam et al., 2021; Hou et al., 2019). D'autre part, plusieurs travaux démontrent que le vieillissement s'accompagne d'une dérégulation des éléments transposables (Copley & Shorter, 2023; De Cecco et al., 2019; Gorbunova et al., 2021; Simon et al., 2019). Or, ces séquences issues du génome non-codant et en particulier LINE-1, peuvent induire de nombreuses conséquences délétères (cassures doubles brins, inflammation, etc) caractéristiques du vieillissement, qui pourraient de ce fait participer à l'établissement des MNs (Blaudin de Thé et al., 2018; Peze-Heidsieck et al., 2021; Ravel-Godreuil et al., 2021).

Cependant, l'expression des LINE-1s reste peu caractérisée, tant par la nature répétée de ces séquences que par la disponibilité des anticorps dirigés contre ses protéines. Il y a donc une nécessité de caractériser l'expression de cet élément transposable et de sa protéine ORF1p dans le cerveau, à la fois sur le plan physiologique et dans le vieillissement, afin de comprendre comment sa dérégulation pourrait être impliquée dans l'établissement des maladies neurodégénératives. L'ensemble de ces travaux de thèse met donc en lumière la complexité de l'expression des LINE-1 et sa protéine ORF1p dans le cerveau en condition pathophysiologique et de vieillissement.

De façon surprenante, nous avons trouvé une expression d'ORF1p bien plus étendue de ce que nous pensions, étant donné que les LINE-1s sont hautement réprimés pour limiter au maximum les conséquences qu'ils entraînent. Nous avons montré que ORF1p était exprimé dans toutes les régions du cerveau murin et dans le cervelet, le gyrus cingulaire et le cortex frontal du cerveau humain. En associant la détection de cellules par machine learning à une cartographie du cerveau, nous avons pu caractériser plus précisément l'étendue de cette expression. Cette méthodologie, nous a permis d'identifier plusieurs centaines de milliers de cellules et de démontrer que 20 % des cellules d'une coupe sagittale murine expriment ORF1p, que cette expression est majoritairement neuronale, et que les niveaux d'expression d'ORF1p d'un neurone à l'autre sont d'une grande variabilité. Cette méthodologie permet de mesurer l'intensité de plusieurs marqueurs dans toutes les cellules d'une coupe de cerveau, de lui assigner un type cellulaire et une localisation précise, le tout normalisé par rapport à chaque région. Ainsi, cette méthodologie pourra être utilisée à l'avenir, notamment dans d'autres domaines des neurosciences, pour caractériser la localisation, le niveau d'expression et

l'association de deux marqueurs (et donc le type-cellulaire) à travers le cerveau entier, le tout normalisé par rapport à chaque région.

Nous avons aussi caractérisé les partenaires de la protéine ORF1p endogène dans le cerveau de la souris et montré que l'ORF1p murin partage 38 partenaires communs avec l'ORF1p humain issu des lignées cancéreuses humaines et 24 avec l'ORF1p humain issu des neurones dopaminergiques, suggérant un rôle crucial de ces partenaires soit dans le maintien du cycle de vie du LINE-1, soit dans sa répression, puisque conservé dans ces deux espèces. Mais, ces résultats ouvrent également la voie à une compréhension d'autres mécanismes potentiellement indépendants du cycle de vie des LINE-1 et ayant des fonctions physiologiques pour les neurones. En effet, de nouveaux interacteurs relatifs au soma et au projection neuronales ont été identifiés. Ce travail est le premier à caractériser les partenaires endogènes d'ORF1p dans le cerveau murin et les neurones humains.

Tous ces résultats concernant ORF1p, à la fois l'étendue de l'expression, la spécificité neuronale, la différence de niveau d'expression entre neurones et les partenaires neuronaux d'ORF1p dans le cerveau en condition physiologique, bousculent la vision préétablie : un élément destiné uniquement à se rétrotransposer dans le génome d'une cellule qui tente coûte que coûte de le réprimer. Il serait donc pertinent de s'intéresser à la physiologie du neurone lorsque le niveau d'ORF1p est abaissé en dessous du niveau d'expression physiologique (par utilisation de siRNA dirigé contre ORF1), notamment en regardant la morphologie du neurone par microscopie, la réponse interféron par RT-qPCR, ou l'intégrité des transcrits géniques, tant sur le plan quantitatif (up/down régulation : impact sur le turnover des ARNm) que qualitatif (défaut d'épissage).

Dans le contexte du vieillissement, nous avons observé une augmentation de l'expression d'ORF1p dans ces neurones murins ainsi qu'une dérégulation des LINE-1s au niveau ARN dans le cerveau humain. Nous avons trouvé que les sous-familles de LINE-1 contenant les dernières séquences intactes et codantes de notre génome se retrouvaient davantage exprimées dans les neurones dopaminergiques des individus âgés de plus de 65 ans. Cette dérégulation s'applique aussi sur le plan qualitatif puisque certains UIDs se retrouvent surexprimés et d'autre sous-exprimés. Ces observations pourraient impliquer une surexpression des deux protéines ORF1p et ORF2p, induisant des cassures doubles brins due à l'activité endonucléase d'ORF2p et mener à la neurodégénérescence de ces neurones comme cela a été montré dans ces cellules au sein de modèle murin (Blaudin de Thé et al.,

2018). Dans le contexte de la MA et de la MP, nous observons également la dérégulation des LINE-1s ainsi que d'autres éléments transposables comme les SINEs et les HERVs.

Nous avons aussi montré que ORF1p interagit avec de nombreux RBPs dont l'interactome est modifié en cas de stress dans les neurones dopaminergiques en culture. D'autre part, ORF1p s'associe à la membrane nucléaire et transloque dans le noyau en cas de stress. Cette association a été ensuite montrée par l'équipe comme pathogénique pour ces neurones (Znaidi et al., 2023).

Mit bout à bout, ces travaux pointent du doigt le génome non codant et en particulier le LINE-1 et sa protéine ORF1p comme un acteur non négligeable à prendre en compte pour décrypter l'étiologie des MNs. Ces pathologies liées au vieillissement pourraient être, chez certains malades, la conséquence d'une activation de ces transcrits non-codants qui par de multiples aspects affectent l'intégrité des neurones. Cependant, si des cibles thérapeutiques visant à contrer cette dérégulation pourrait s'avérer prometteuse, les conséquences d'un abaissement sous le seuil d'expression physiologique des neurones restent encore à définir. En effet, ces travaux avancent aussi sur de multiples pistes en faveur d'un rôle physiologique de la protéine ORF1p dans les neurones.

Une fonction physiologique ne peut s'exercer que par la régulation d'effecteurs à des niveaux d'expression adéquate. Ainsi, la dérégulation des LINE-1 dans le contexte du vieillissement ne pourrait-il pas refléter une fonction physiologique altérée ?

BIBLIOGRAPHIE

- Alcazer, V., Bonaventura, P., & Depil, S. (2020). Human Endogenous Retroviruses (HERVs) : Shaping the Innate Immune Response in Cancers. *Cancers*, 12(3), Article 3. <https://doi.org/10.3390/cancers12030610>
- Appocher, C., Mohagheghi, F., Cappelli, S., Stuani, C., Romano, M., Feiguin, F., & Buratti, E. (2017). Major hnRNP proteins act as general TDP-43 functional modifiers both in Drosophila and human neuronal cells. *Nucleic Acids Research*, 45(13), 8026-8045. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx477>
- Ardeljan, D., Wang, X., Oghbaie, M., Taylor, M. S., Husband, D., Deshpande, V., Steranka, J. P., Gorbounov, M., Yang, W. R., Sie, B., Larman, H. B., Jiang, H., Molloy, K. R., Altukhov, I., Li, Z., McKerrow, W., Fenyo, D., Burns, K. H., & LaCava, J. (2020). LINE-1 ORF2p expression is nearly imperceptible in human cancers. *Mobile DNA*, 11(1), Article 1. <https://doi.org/10.1186/s13100-019-0191-2>
- Arroyo, M., Bautista, R., Larrosa, R., Cobo, M. Á., & Claros, M. G. (2019). Biomarker potential of repetitive-element transcriptome in lung cancer. *PeerJ*, 7, e8277. <https://doi.org/10.7717/peerj.8277>
- Azam, S., Haque, M. E., Balakrishnan, R., Kim, I.-S., & Choi, D.-K. (2021). The Ageing Brain : Molecular and Cellular Basis of Neurodegeneration. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9, 683459. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.683459>
- Baeken, M. W., Moosmann, B., & Hajieva, P. (2020). Retrotransposon activation by distressed mitochondria in neurons. *Biochemical and biophysical research communications*, 1-6. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.02.106>
- Baillie, J. K., Barnett, M. W., Upton, K. R., Gerhardt, D. J., Richmond, T. A., De Sapio, F., Brennan, P. M., Rizzu, P., Smith, S., Fell, M., Talbot, R. T., Gustincich, S., Freeman, T. C., Mattick, J. S., Hume, D. A., Heutink, P., Carninci, P., Jeddeloh, J. A., & Faulkner, G. J. (2011). Somatic retrotransposition alters the genetic landscape of the human brain. *Nature*, 479(7374), Article 7374. <https://doi.org/10.1038/nature10531>
- Balusu, S., Prashberger, R., Lauwers, E., De Strooper, B., & Verstreken, P. (2023). Neurodegeneration cell per cell. *Neuron*, S0896627323000648. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2023.01.016>
- Bates, G. P., Dorsey, R., Gusella, J. F., Hayden, M. R., Kay, C., Leavitt, B. R., Nance, M., Ross, C. A., Scahill, R. I., Wetzel, R., Wild, E. J., & Tabrizi, S. J. (2015). Huntington disease. *Nature Reviews. Disease Primers*, 1, 15005. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.5>
- Beck, C. R., Garcia-Perez, J. L., Badge, R. M., & Moran, J. V. (2011). LINE-1 elements in structural variation and disease. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 12, 187-215. <https://doi.org/10.1146/annurev-genom-082509-141802>
- Bedrosian, T. A., Quayle, C., Novaresi, N., & Gage, F. H. (2018). Early life experience drives structural variation of neural genomes in mice. *Science*, 359(6382), Article 6382. <https://doi.org/10.1126/science.aah3378>
- Belancio, V. P., Roy-Engel, A. M., & Deininger, P. (2008). The impact of multiple splice sites in human L1 elements. *Gene*, 411(1-2), Article 1-2. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2007.12.022>
- Belgnaoui, S. M., Gosden, R. G., Semmes, O. J., & Haoudi, A. (2006). Human LINE-1 retrotransposon induces DNA damage and apoptosis in cancer cells. *Cancer Cell International*, 6, 13. <https://doi.org/10.1186/1475-2867-6-13>
- Bénil, L., Calteau, A., & Heidmann, T. (2003). Characterization of the low-copy HERV-Fc family : Evidence for

- recent integrations in primates of elements with coding envelope genes. *Virology*, 312(1), Article 1. [https://doi.org/10.1016/s0042-6822\(03\)00163-6](https://doi.org/10.1016/s0042-6822(03)00163-6)
- Bennett, J. P., & Keeney, P. M. (2018). RNA-Sequencing Reveals Similarities and Differences in Gene Expression in Vulnerable Brain Tissues of Alzheimer's and Parkinson's Diseases. *Journal of Alzheimer's Disease Reports*, 2(1), Article 1. <https://doi.org/10.3233/ADR-180072>
- Bhat, R., Crowe, E. P., Bitto, A., Moh, M., Katsetos, C. D., Garcia, F. U., Johnson, F. B., Trojanowski, J. Q., Sell, C., & Torres, C. (2012). Astrocyte senescence as a component of Alzheimer's disease. *PLoS One*, 7(9), e45069. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045069>
- Bhatt, V., & Tiwari, A. K. (2023). Sirtuins, a key regulator of ageing and age-related neurodegenerative diseases. *The International Journal of Neuroscience*, 133(10), 1167-1192. <https://doi.org/10.1080/00207454.2022.2057849>
- Blaudin de Thé, F.-X., Rekaik, H., Peze-Heidsieck, E., Massiani-Beaudoin, O., Joshi, R. L., Fuchs, J., & Prochiantz, A. (2018). Engrailed homeoprotein blocks degeneration in adult dopaminergic neurons through LINE-1 repression. *The EMBO Journal*, 37(15), Article 15. <https://doi.org/10.15252/embj.201797374>
- Blennow, K., de Leon, M. J., & Zetterberg, H. (2006). Alzheimer's disease. *Lancet (London, England)*, 368(9533), 387-403. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(06\)69113-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(06)69113-7)
- Bobkova, N. V., Evgen'ev, M., Garbuz, D. G., Kulikov, A. M., Morozov, A., Samokhin, A., Velmeshev, D., Medvinskaya, N., Nesterova, I., Pollock, A., & Nudler, E. (2015). Exogenous Hsp70 delays senescence and improves cognitive function in aging mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(52), 16006-16011. <https://doi.org/10.1073/pnas.1516131112>
- Bodea, G. O., McKelvey, E. G. Z., & Faulkner, G. J. (2018). Retrotransposon-induced mosaicism in the neural genome. *Open Biology*, 8(7), Article 7. <https://doi.org/10.1098/rsob.180074>
- Boeke, J. D., & Fenyo, D. (2015). Much Ado about Zero. *Cell*, 163(3), Article 3. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.10.033>
- Boissinot, S., Chevret, P., & Furano, A. V. (2000). L1 (LINE-1) retrotransposon evolution and amplification in recent human history. *Molecular Biology and Evolution*, 17(6), Article 6. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026372>
- Braak, H., Alafuzoff, I., Arzberger, T., Kretschmar, H., & Del Tredici, K. (2006). Staging of Alzheimer disease-associated neurofibrillary pathology using paraffin sections and immunocytochemistry. *Acta Neuropathologica*, 112(4), 389-404. <https://doi.org/10.1007/s00401-006-0127-z>
- Braak, H., Del Tredici, K., Rüb, U., de Vos, R. A. I., Jansen Steur, E. N. H., & Braak, E. (2003). Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiology of Aging*, 24(2), Article 2.
- Bradley-Whitman, M. A., & Lovell, M. A. (2013). Epigenetic changes in the progression of Alzheimer's disease. *Mechanisms of Ageing and Development*, 134(10), 486-495. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2013.08.005>
- Branco, M. R., & Chuong, E. B. (2020). Crossroads between transposons and gene regulation. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 375(1795), Article 1795. <https://doi.org/10.1098/rstb.2019.0330>
- Briggs, E. M., McKerrow, W., Mita, P., Boeke, J. D., Logan, S. K., & Fenyo, D. (2021). RIP-seq reveals LINE-1 ORF1p association with p-body enriched mRNAs. 1-13. <https://doi.org/10.1186/s13100-021-00233-3>
- Brouha, B., Schustak, J., Badge, R. M., Lutz-Prigge, S., Farley, A. H., Moran, J. V., & Kazazian, H. H. (2003). Hot L1s account for the bulk of retrotransposition in the human population. *Proceedings of the National*

- Academy of Sciences of the United States of America*, 100(9), Article 9. <https://doi.org/10.1073/pnas.0831042100>
- Brown, K., Xie, S., Qiu, X., Mohrin, M., Shin, J., Liu, Y., Zhang, D., Scadden, D. T., & Chen, D. (2013). SIRT3 reverses aging-associated degeneration. *Cell Reports*, 3(2), 319-327. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.01.005>
- Brown, W. R. A., MacKinnon, P. J., Villasanté, A., Spurr, N., Buckle, V. J., & Dobson, M. J. (1990). Structure and polymorphism of human telomere-associated DNA. *Cell*, 63(1), 119-132. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90293-N](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90293-N)
- Burrinha, T., & Guimas Almeida, C. (2022). Aging impact on amyloid precursor protein neuronal trafficking. *Current Opinion in Neurobiology*, 73, 102524. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2022.102524>
- Callahan, K. E., Hickman, A. B., Jones, C. E., Ghirlando, R., & Furano, A. V. (2012). Polymerization and nucleic acid-binding properties of human L1 ORF1 protein. *Nucleic Acids Research*, 40(2), Article 2. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr728>
- Camandola, S., & Mattson, M. P. (2017). Brain metabolism in health, aging, and neurodegeneration. *The EMBO Journal*. <https://doi.org/10.15252/emboj.201695810>
- Carey, H., Pegios, M., Martin, L., Saleeba, C., Turner, A. J., Everett, N. A., Bjerke, I. E., Puchades, M. A., Bjaalie, J. G., & McMullan, S. (2023). DeepSlice : Rapid fully automatic registration of mouse brain imaging to a volumetric atlas. *Nature Communications*, 14(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-41645-4>
- Carey, J. L., & Guo, L. (2022). Liquid-Liquid Phase Separation of TDP-43 and FUS in Physiology and Pathology of Neurodegenerative Diseases. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 9, 826719. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2022.826719>
- Cavanaugh, S. E., Holmgren, A. M., & Rall, G. F. (2015). Homeostatic interferon expression in neurons is sufficient for early control of viral infection. *Journal of neuroimmunology*, 279, 11-19. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2014.12.012>
- Chinta, S. J., Woods, G., Demaria, M., Rane, A., Zou, Y., McQuade, A., Rajagopalan, S., Limbad, C., Madden, D. T., Campisi, J., & Andersen, J. K. (2018). Cellular Senescence Is Induced by the Environmental Neurotoxin Paraquat and Contributes to Neuropathology Linked to Parkinson's Disease. *Cell Reports*, 22(4), Article 4. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.12.092>
- Ciccarone, F., Tagliatesta, S., Caiafa, P., & Zampieri, M. (2018). DNA methylation dynamics in aging : How far are we from understanding the mechanisms? *Mechanisms of Ageing and Development*, 174, 3-17. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2017.12.002>
- Conlon, E. G., & Manley, J. L. (2017). RNA-binding proteins in neurodegeneration : Mechanisms in aggregate. *Genes & Development*, 31(15), 1509-1528. <https://doi.org/10.1101/gad.304055.117>
- Cook, P. R., Jones, C. E., & Furano, A. V. (2015). Phosphorylation of ORF1p is required for L1 retrotransposition. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(14), Article 14. <https://doi.org/10.1073/pnas.1416869112>
- Copley, K. E., & Shorter, J. (2023). Repetitive elements in aging and neurodegeneration. *Trends in Genetics*, S0168952523000343. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2023.02.008>
- Cost, G. J., Feng, Q., Jacquier, A., & Boeke, J. D. (2002). Human L1 element target-primed reverse transcription in vitro. *The EMBO Journal*, 21(21), 5899-5910. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdf592>
- Coufal, N. G., Garcia-Perez, J. L., Peng, G. E., Marchetto, M. C. N., Muotri, A. R., Mu, Y., Carson, C. T., Macia, A., Moran, J. V., & Gage, F. H. (2011). Ataxia telangiectasia mutated (ATM) modulates long interspersed

- element-1 (L1) retrotransposition in human neural stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(51), Article 51. <https://doi.org/10.1073/pnas.1100273108/-/DCSupplemental>
- Coufal, N. G., Garcia-Perez, J. L., Peng, G. E., Yeo, G. W., Mu, Y., Lovci, M. T., Morell, M., O'Shea, K. S., Moran, J. V., & Gage, F. H. (2009). L1 retrotransposition in human neural progenitor cells. *Nature*, 460(7259), Article 7259. <https://doi.org/10.1038/nature08248>
- Dai, L., Taylor, M. S., O'Donnell, K. A., & Boeke, J. D. (2012). Poly(A) Binding Protein C1 Is Essential for Efficient L1 Retrotransposition and Affects L1 RNP Formation. *Molecular and Cellular Biology*, 32(21), 4323-4336. <https://doi.org/10.1128/MCB.06785-11>
- De Cecco, M., Criscione, S. W., Peckham, E. J., Hillenmeyer, S., Hamm, E. A., Manivannan, J., Peterson, A. L., Kreiling, J. A., Neretti, N., & Sedivy, J. M. (2013). Genomes of replicatively senescent cells undergo global epigenetic changes leading to gene silencing and activation of transposable elements. *Aging Cell*, 12(2), Article 2. <https://doi.org/10.1111/accel.12047>
- De Cecco, M., Ito, T., Petrashen, A. P., Elias, A. E., Skvir, N. J., Criscione, S. W., Caligiana, A., Broccoli, G., Adney, E. M., Boeke, J. D., Le, O., Beauséjour, C., Ambati, J., Ambati, K., Simon, M., Seluanov, A., Gorbunova, V., Slagboom, P. E., Helfand, S. L., ... Sedivy, J. M. (2019). L1 drives IFN in senescent cells and promotes age-associated inflammation. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1350-9>
- De Felice, F., & Lourenco, M. (2015). Brain metabolic stress and neuroinflammation at the basis of cognitive impairment in Alzheimer's disease. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 7. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnagi.2015.00094>
- De Luca, C., Gupta, A., & Bortvin, A. (2023). Retrotransposon LINE-1 bodies in the cytoplasm of piRNA-deficient mouse spermatocytes : Ribonucleoproteins overcoming the integrated stress response. *PLoS Genetics*, 19(6), Article 6. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1010797>
- Della Valle, F., Reddy, P., Yamamoto, M., Liu, P., Saera-Vila, A., Bensaddek, D., Zhang, H., Prieto Martinez, J., Abassi, L., Celii, M., Ocampo, A., Nuñez Delicado, E., Mangiavacchi, A., Aiese Cigliano, R., Rodriguez Esteban, C., Horvath, S., Izpisua Belmonte, J. C., & Orlando, V. (2022). LINE-1 RNA causes heterochromatin erosion and is a target for amelioration of senescent phenotypes in progeroid syndromes. *Science Translational Medicine*, 14(657), Article 657. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abl6057>
- Deng, J., Chen, X., Chen, A., & Zheng, X. (2022). m6A RNA methylation in brain injury and neurodegenerative disease. *Frontiers in Neurology*, 13. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fneur.2022.995747>
- Denli, A. M., Narvaiza, I., Kerman, B. E., Pena, M., Benner, C., Marchetto, M. C. N., Diedrich, J. K., Aslanian, A., Ma, J., Moresco, J. J., Moore, L., Hunter, T., Saghatelian, A., & Gage, F. H. (2015). Primate-Specific ORF0 Contributes to Retrotransposon-Mediated Diversity. *Cell*, 163(3), Article 3. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.09.025>
- Dolivo, D., Hernandez, S., & Dominko, T. (2016). Cellular lifespan and senescence : A complex balance between multiple cellular pathways. *Inside the Cell*, 1(1), 36-47. <https://doi.org/10.1002/icl3.1036>
- Dueva, R., Akopyan, K., Pederiva, C., Trevisan, D., Dhanjal, S., Lindqvist, A., & Farnebo, M. (2019). Neutralization of the Positive Charges on Histone Tails by RNA Promotes an Open Chromatin Structure. *Cell Chemical Biology*, 26(10), Article 10. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2019.08.002>
- El Hajjar, J., Chato, W., Hanna, R., Nkanza, P., Tétreault, N., Tse, Y. C., Wong, T. P., Abdouh, M., & Bernier, G. (2019). Heterochromatic genome instability and neurodegeneration sharing similarities with Alzheimer's disease in old Bmi1^{+/-} mice. *Scientific Reports*, 9(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37444-3>
- Elbarbary, R. A., Lucas, B. A., & Maquat, L. E. (2016). Retrotransposons as regulators of gene expression.

Science, 351(6274), Article 6274. <https://doi.org/10.1126/science.aac7247>

Evrony, G. D., Cai, X., Lee, E., Hills, L. B., Elhosary, P. C., Lehmann, H. S., Parker, J. J., Atabay, K. D., Gilmore, E. C., Poduri, A., Park, P. J., & Walsh, C. A. (2012). Single-neuron sequencing analysis of L1 retrotransposition and somatic mutation in the human brain. *Cell*, 151(3), Article 3. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.09.035>

Ewing, A. D., & Kazazian, H. H. (2010). High-throughput sequencing reveals extensive variation in human-specific L1 content in individual human genomes. *Genome Research*, 20(9), 1262-1270. <https://doi.org/10.1101/gr.106419.110>

Faulkner, G. J., & Garcia-Perez, J. L. (2017). L1 Mosaicism in Mammals: Extent, Effects, and Evolution. *Trends in genetics : TIG*, 33(11), Article 11. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2017.07.004>

Flamier, A., El Hajjar, J., Adjaye, J., Fernandes, K. J., Abdouh, M., & Bernier, G. (2018). Modeling Late-Onset Sporadic Alzheimer's Disease through BMI1 Deficiency. *Cell Reports*, 23(9), 2653-2666. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.04.097>

Fornito, A., Zalesky, A., & Breakspear, M. (2015). The connectomics of brain disorders. *Nature Reviews. Neuroscience*, 16(3), 159-172. <https://doi.org/10.1038/nrn3901>

Förstl, H., & Kurz, A. (1999). Clinical features of Alzheimer's disease. *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience*, 249(6), 288-290. <https://doi.org/10.1007/s004060050101>

Fu, H., Hardy, J., & Duff, K. E. (2018). Selective vulnerability in neurodegenerative diseases. *Nature Neuroscience*, 21(10), Article 10. <https://doi.org/10.1038/s41593-018-0221-2>

Furano, A. V., & Cook, P. R. (2016). The challenge of ORF1p phosphorylation : Effects on L1 activity and its host. *Mobile Genetic Elements*, 6(1), e1119927. <https://doi.org/10.1080/2159256X.2015.1119927>

Garcia-Perez, J. L., Widmann, T. J., & Adams, I. R. (2016). The impact of transposable elements on mammalian development. *Development*, 143(22), Article 22. <https://doi.org/10.1242/dev.132639>

Gasior, S. L., Roy-Engel, A. M., & Deininger, P. L. (2008). ERCC1/XPF limits L1 retrotransposition. *DNA Repair*, 7(6), Article 6. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2008.02.006>

Gasior, S. L., Wakeman, T. P., Xu, B., & Deininger, P. L. (2006). The human LINE-1 retrotransposon creates DNA double-strand breaks. *Journal of Molecular Biology*, 357(5), Article 5. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.01.089>

Gazquez-Gutierrez, A., Witteveldt, J., R Heras, S., & Macias, S. (2021). Sensing of transposable elements by the antiviral innate immune system. *RNA (New York, N.Y.)*. <https://doi.org/10.1261/rna.078721.121>

Goodier, J. L., Cheung, L. E., & Kazazian, H. H. (2013). Mapping the LINE1 ORF1 protein interactome reveals associated inhibitors of human retrotransposition. *Nucleic Acids Research*, 41(15), Article 15. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt512>

Goodier, J. L., Ostertag, E. M., Du, K., & Kazazian, H. H. (2001). A novel active L1 retrotransposon subfamily in the mouse. *Genome Research*, 11(10), Article 10. <https://doi.org/10.1101/gr.198301>

Goodier, J. L., Pereira, G. C., Cheung, L. E., Rose, R. J., & Jr, H. H. K. (2015). The Broad-Spectrum Antiviral Protein ZAP Restricts Human Retrotransposition. *PLOS Genetics*, 11(5), e1005252. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005252>

Goodier, J. L., Zhang, L., Vetter, M. R., & Kazazian, H. H. (2007). LINE-1 ORF1 protein localizes in stress granules with other RNA-binding proteins, including components of RNA interference RNA-induced silencing complex. *Molecular and Cellular Biology*, 27(18), Article 18. <https://doi.org/10.1128/MCB.00332-07>

- Gorbunova, V., Seluanov, A., Mita, P., McKerrow, W., Fenyo, D., Boeke, J. D., Linker, S. B., Gage, F. H., Kreiling, J. A., Petrashen, A. P., Woodham, T. A., Taylor, J. R., Helfand, S. L., & Sedivy, J. M. (2021). The role of retrotransposable elements in ageing and age-associated diseases. *Nature*, 1-11. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03542-y>
- Grundman, J., Spencer, B., Sarsoza, F., & Rissman, R. A. (2021). Transcriptome analyses reveal tau isoform-driven changes in transposable element and gene expression. *PLoS ONE*, 16(9), Article 9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0251611>
- Guo, C., Jeong, H.-H., Hsieh, Y.-C., Klein, H.-U., Bennett, D. A., De Jager, P. L., Liu, Z., & Shulman, J. M. (2018). Tau Activates Transposable Elements in Alzheimer's Disease. *Cell Reports*, 23(10), Article 10. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.05.004>
- Hamdorf, M., Idica, A., Zisoulis, D. G., Gamelin, L., Martin, C., Sanders, K. J., & Pedersen, I. M. (2015). miR-128 represses L1 retrotransposition by binding directly to L1 RNA. *Nature Structural & Molecular Biology*, 1-10. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3090>
- Harada, A., Oguchi, K., Okabe, S., Kuno, J., Terada, S., Ohshima, T., Sato-Yoshitake, R., Takei, Y., Noda, T., & Hirokawa, N. (1994). Altered microtubule organization in small-calibre axons of mice lacking tau protein. *Nature*, 369(6480), 488-491. <https://doi.org/10.1038/369488a0>
- Hata, K., & Sakaki, Y. (1997). Identification of critical CpG sites for repression of L1 transcription by DNA methylation. *Gene*, 189(2), 227-234. [https://doi.org/10.1016/s0378-1119\(96\)00856-6](https://doi.org/10.1016/s0378-1119(96)00856-6)
- He, J., Fu, X., Zhang, M., He, F., Li, W., Abdul, M. M., Zhou, J., Sun, L., Chang, C., Li, Y., Liu, H., Wu, K., Babarinde, I. A., Zhuang, Q., Loh, Y.-H., Chen, J., Esteban, M. A., & Hutchins, A. P. (2019). Transposable elements are regulated by context-specific patterns of chromatin marks in mouse embryonic stem cells. *Nature Communications*, 10(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-08006-y>
- Herrmann, M., Pusceddu, I., März, W., & Herrmann, W. (2018). Telomere biology and age-related diseases. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 56(8), 1210-1222. <https://doi.org/10.1515/cclm-2017-0870>
- Hickman, S., Izzy, S., Sen, P., Morsett, L., & El Khoury, J. (2018). Microglia in neurodegeneration. *Nature Neuroscience*, 21(10), Article 10. <https://doi.org/10.1038/s41593-018-0242-x>
- Hiltunen, M., van Groen, T., & Jolkkonen, J. (2009). Functional roles of amyloid-beta protein precursor and amyloid-beta peptides : Evidence from experimental studies. *Journal of Alzheimer's Disease: JAD*, 18(2), 401-412. <https://doi.org/10.3233/JAD-2009-1154>
- Hipp, M. S., Kasturi, P., & Hartl, F. U. (2019). The proteostasis network and its decline in ageing. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 20(7), 421-435. <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0101-y>
- Horvath, S., & Raj, K. (2018). DNA methylation-based biomarkers and the epigenetic clock theory of ageing. *Nature Reviews. Genetics*, 19(6), 371-384. <https://doi.org/10.1038/s41576-018-0004-3>
- Hou, Y., Dan, X., Babbar, M., Wei, Y., Hasselbalch, S. G., Croteau, D. L., & Bohr, V. A. (2019). Ageing as a risk factor for neurodegenerative disease. *Nature Reviews. Neurology*, 15(10), Article 10. <https://doi.org/10.1038/s41582-019-0244-7>
- Hsiao, K., Chapman, P., Nilsen, S., Eckman, C., Harigaya, Y., Younkin, S., Yang, F., & Cole, G. (1996). Correlative memory deficits, Abeta elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. *Science (New York, N.Y.)*, 274(5284), 99-102. <https://doi.org/10.1126/science.274.5284.99>
- Hu, S., Li, J., Xu, F., Mei, S., Le Duff, Y., Yin, L., Pang, X., Cen, S., Jin, Q., Liang, C., & Guo, F. (2015). SAMHD1 Inhibits LINE-1 Retrotransposition by Promoting Stress Granule Formation. *PLoS Genetics*, 11(7), Article 7. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005367>

- Huang, Z., Sun, S., Lee, M., Maslov, A. Y., Shi, M., Waldman, S., Marsh, A., Siddiqui, T., Dong, X., Peter, Y., Sadoughi, A., Shah, C., Ye, K., Spivack, S. D., & Vijg, J. (2022). Single-cell analysis of somatic mutations in human bronchial epithelial cells in relation to aging and smoking. *Nature Genetics*, *54*(4), 492-498. <https://doi.org/10.1038/s41588-022-01035-w>
- Hwang, J.-Y., Aromolaran, K. A., & Zukin, R. S. (2017). The emerging field of epigenetics in neurodegeneration and neuroprotection. *Nature Reviews Neuroscience*, *18*(6), Article 6. <https://doi.org/10.1038/nrn.2017.46>
- Ishak, C. A., Marshall, A. E., Passos, D. T., White, C. R., Kim, S. J., Cecchini, M. J., Ferwati, S., MacDonald, W. A., Howlett, C. J., Welch, I. D., Rubin, S. M., Mann, M. R. W., & Dick, F. A. (2016). An RB-EZH2 Complex Mediates Silencing of Repetitive DNA Sequences. *Molecular Cell*, *64*(6), Article 6. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.10.021>
- Jazurek, M., Ciesiolka, A., Starega-Roslan, J., Bilinska, K., & Krzyzosiak, W. J. (2016). Identifying proteins that bind to specific RNAs—Focus on simple repeat expansion diseases. *Nucleic Acids Research*, *44*(19), 9050-9070. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw803>
- Jo, M., Lee, S., Jeon, Y.-M., Kim, S., Kwon, Y., & Kim, H.-J. (2020). The role of TDP-43 propagation in neurodegenerative diseases : Integrating insights from clinical and experimental studies. *Experimental & Molecular Medicine*, *52*(10), Article 10. <https://doi.org/10.1038/s12276-020-00513-7>
- Kalia, L. V., & Lang, A. E. (2015). Parkinson's disease. *Lancet (London, England)*, *386*(9996), Article 9996. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)61393-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)61393-3)
- Kano, H., Godoy, I., Courtney, C., Vetter, M. R., Gerton, G. L., Ostertag, E. M., & Kazazian, H. H. (2009). L1 retrotransposition occurs mainly in embryogenesis and creates somatic mosaicism. *Genes & Development*, *23*(11), Article 11. <https://doi.org/10.1101/gad.1803909>
- KARAKÜLAH, G., & YANDIM, C. (2021). Identification of differentially expressed genomic repeats in primary hepatocellular carcinoma and their potential links to biological processes and survival. *Turkish Journal of Biology*, *45*(5), 599-612. <https://doi.org/10.3906/biy-2104-13>
- Karimzadeh, M., Ernst, C., Kundaje, A., & Hoffman, M. M. (2018). Umap and Bismap : Quantifying genome and methylome mappability. *Nucleic Acids Research*, *46*(20), Article 20. <https://doi.org/10.1093/nar/gky677>
- Kassiotis, G., & Stoye, J. P. (2016). Immune responses to endogenous retroelements : Taking the bad with the good. *Nature Reviews Immunology*, *16*(4), Article 4. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.27>
- Katyal, S., Lee, Y., Nitiss, K. C., Downing, S. M., Li, Y., Shimada, M., Zhao, J., Russell, H. R., Petrini, J. H. J., Nitiss, J. L., & McKinnon, P. J. (2014). Aberrant topoisomerase-1 DNA lesions are pathogenic in neurodegenerative genome instability syndromes. *Nature Neuroscience*, *17*(6), Article 6. <https://doi.org/10.1038/nn.3715>
- Kawahara, T. L. A., Michishita, E., Adler, A. S., Damian, M., Berber, E., Lin, M., McCord, R. A., Ongaigui, K. C. L., Boxer, L. D., Chang, H. Y., & Chua, K. F. (2009). SIRT6 links histone H3 lysine 9 deacetylation to NF-kappaB-dependent gene expression and organismal life span. *Cell*, *136*(1), 62-74. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.10.052>
- Kelaini, S., Chan, C., Cornelius, V. A., & Margariti, A. (2021). RNA-Binding Proteins Hold Key Roles in Function, Dysfunction, and Disease. *Biology*, *10*(5), 366. <https://doi.org/10.3390/biology10050366>
- Khazina, E., Truffault, V., Büttner, R., Schmidt, S., Coles, M., & Weichenrieder, O. (2011). Trimeric structure and flexibility of the L1ORF1 protein in human L1 retrotransposition. *Nature Structural & Molecular Biology*, *18*(9), Article 9. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2097>

- Khazina, E., & Weichenrieder, O. (2009). Non-LTR retrotransposons encode noncanonical RRM domains in their first open reading frame. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *106*(3), 731-736. <https://doi.org/10.1073/pnas.0809964106>
- Kojima, K. K. (2020). Structural and sequence diversity of eukaryotic transposable elements. *Genes & Genetic Systems*, *94*(6), 233-252. <https://doi.org/10.1266/ggs.18-00024>
- Kubo, S., Seleme, M. D. C., Soifer, H. S., Perez, J. L. G., Moran, J. V., Kazazian, H. H., & Kasahara, N. (2006). L1 retrotransposition in nondividing and primary human somatic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *103*(21), Article 21. <https://doi.org/10.1073/pnas.0601954103>
- Kulpa, D. A., & Moran, J. V. (2005). Ribonucleoprotein particle formation is necessary but not sufficient for LINE-1 retrotransposition. *Human Molecular Genetics*, *14*(21), Article 21. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddi354>
- Lagunas-Rangel, F. A. (2022). SIRT7 in the aging process. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, *79*(6), 297. <https://doi.org/10.1007/s00018-022-04342-x>
- Lander, E. S., Linton, L. M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M. C., Baldwin, J., Devon, K., Dewar, K., Doyle, M., FitzHugh, W., Funke, R., Gage, D., Harris, K., Heaford, A., Howland, J., Kann, L., Lehoczky, J., LeVine, R., McEwan, P., ... International Human Genome Sequencing Consortium. (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, *409*(6822), Article 6822. <https://doi.org/10.1038/35057062>
- LaRocca, T. J., Cavalier, A. N., & Wahl, D. (2020). Repetitive elements as a transcriptomic marker of aging : Evidence in multiple datasets and models. *Aging Cell*, *13*(1), 13167-6. <https://doi.org/10.1111/acer.13167>
- Larson, K., Yan, S.-J., Tsurumi, A., Liu, J., Zhou, J., Gaur, K., Guo, D., Eickbush, T. H., & Li, W. X. (2012). Heterochromatin Formation Promotes Longevity and Represses Ribosomal RNA Synthesis. *PLOS Genetics*, *8*(1), e1002473. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002473>
- Lesbirel, S., Viphakone, N., Parker, M., Parker, J., Heath, C., Sudbery, I., & Wilson, S. A. (2018). The m6A-methylase complex recruits TREX and regulates mRNA export. *Scientific Reports*, *8*(1), 13827. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-32310-8>
- Lesné, S., Koh, M. T., Kotilinek, L., Kaye, R., Glabe, C. G., Yang, A., Gallagher, M., & Ashe, K. H. (2006). A specific amyloid- β protein assembly in the brain impairs memory. *Nature*, *440*(7082), Article 7082. <https://doi.org/10.1038/nature04533>
- Li, T. D., Murano, K., Kitano, T., Guo, Y., Negishi, L., & Siomi, H. (2022). TDP-43 safeguards the embryo genome from L1 retrotransposition. *Science Advances*, *8*(47), eabq3806. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abq3806>
- Li, W., Jin, Y., Prazak, L., Hammell, M., & Dubnau, J. (2012). Transposable elements in TDP-43-mediated neurodegenerative disorders. *PLoS ONE*, *7*(9), Article 9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044099>
- Liu, E. Y., Russ, J., Cali, C. P., Phan, J. M., Amlie-Wolf, A., & Lee, E. B. (2019). Loss of Nuclear TDP-43 Is Associated with Decondensation of LINE Retrotransposons. *Cell Reports*, *27*(5), Article 5. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.04.003>
- Liu, H., Zhou, J., Tian, W., Luo, C., Bartlett, A., Aldridge, A., Lucero, J., Osteen, J. K., Nery, J. R., Chen, H., Rivkin, A., Castanon, R. G., Clock, B., Li, Y. E., Hou, X., Poirion, O. B., Preissl, S., Pinto-Duarte, A., O'Connor, C., ... Ecker, J. R. (2021). DNA methylation atlas of the mouse brain at single-cell resolution. *Nature*, *598*(7879), Article 7879. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-03182-8>
- Liu, N., Lee, C. H., Swigut, T., Grow, E., Gu, B., Bassik, M. C., & Wysocka, J. (2018). Selective silencing of euchromatic L1s revealed by genome-wide screens for L1 regulators. *Nature*, *553*(7687), Article 7687.

<https://doi.org/10.1038/nature25179>

Lopez-Otin, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M., & Kroemer, G. (2013). The hallmarks of aging. *Cell*, *153*(6), Article 6. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.05.039>

Lopez-Otin, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M., & Kroemer, G. (2023). Hallmarks of aging : An expanding universe. *Cell*, S0092867422013770. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.11.001>

Lu, J. Y., Chang, L., Li, T., Wang, T., Yin, Y., Zhan, G., Han, X., Zhang, K., Tao, Y., Percharde, M., Wang, L., Peng, Q., Yan, P., Zhang, H., Bi, X., Shao, W., Hong, Y., Wu, Z., Ma, R., ... Shen, X. (2021). Homotypic clustering of L1 and B1/Alu repeats compartmentalizes the 3D genome. *Cell Research*, 1-18. <https://doi.org/10.1038/s41422-020-00466-6>

Luqman-Fatah, A., Watanabe, Y., Uno, K., Ishikawa, F., Moran, J. V., & Miyoshi, T. (2023). The interferon stimulated gene-encoded protein HELZ2 inhibits human LINE-1 retrotransposition and LINE-1 RNA-mediated type I interferon induction. *Nature Communications*, *14*(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-35757-6>

Macia, A., Widmann, T. J., Heras, S. R., Ayllon, V., Sanchez, L., Benkaddour-Boumzaouad, M., Muñoz-Lopez, M., Rubio, A., Amador-Cubero, S., Blanco-Jimenez, E., Garcia-Castro, J., Menendez, P., Ng, P., Muotri, A. R., Goodier, J. L., & Garcia-Perez, J. L. (2017). Engineered LINE-1 retrotransposition in nondividing human neurons. *Genome Research*, *27*(3), Article 3. <https://doi.org/10.1101/gr.206805.116>

Madabhushi, R., Pan, L., & Tsai, L.-H. (2014). DNA damage and its links to neurodegeneration. *Neuron*, *83*(2), Article 2. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.06.034>

Mahley, R. W., Weisgraber, K. H., & Huang, Y. (2006). Apolipoprotein E4 : A causative factor and therapeutic target in neuropathology, including Alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *103*(15), 5644-5651. <https://doi.org/10.1073/pnas.0600549103>

Mao, Z., Tian, X., Van Meter, M., Ke, Z., Gorbunova, V., & Seluanov, A. (2012). Sirtuin 6 (SIRT6) rescues the decline of homologous recombination repair during replicative senescence. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *109*(29), 11800-11805. <https://doi.org/10.1073/pnas.1200583109>

March, Z. M., King, O. D., & Shorter, J. (2016). Prion-like domains as epigenetic regulators, scaffolds for subcellular organization, and drivers of neurodegenerative disease. *Brain Research*, *1647*, 9-18. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2016.02.037>

Martin, S. L. (2010). Nucleic acid chaperone properties of ORF1p from the non-LTR retrotransposon, LINE-1. *RNA Biology*, *7*(6), 706-711. <https://doi.org/10.4161/rna.7.6.13766>

Martin, S. L., Bushman, D., Wang, F., Li, P. W.-L., Walker, A., Cumiskey, J., Branciforte, D., & Williams, M. C. (2008). A single amino acid substitution in ORF1 dramatically decreases L1 retrotransposition and provides insight into nucleic acid chaperone activity. *Nucleic Acids Research*, *36*(18), 5845-5854. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn554>

Martin, S. L., Cruceanu, M., Branciforte, D., Wai-Lun Li, P., Kwok, S. C., Hodges, R. S., & Williams, M. C. (2005). LINE-1 retrotransposition requires the nucleic acid chaperone activity of the ORF1 protein. *Journal of Molecular Biology*, *348*(3), Article 3. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.03.003>

Martincorena, I., Fowler, J. C., Wabik, A., Lawson, A. R. J., Abascal, F., Hall, M. W. J., Cagan, A., Murai, K., Mahbubani, K., Stratton, M. R., Fitzgerald, R. C., Handford, P. A., Campbell, P. J., Saeb-Parsy, K., & Jones, P. H. (2018). Somatic mutant clones colonize the human esophagus with age. *Science (New York, N.Y.)*, *362*(6417), 911-917. <https://doi.org/10.1126/science.aau3879>

Mathavarajah, S., & Dellaire, G. (2023). LINE-1 : An emerging initiator of cGAS-STING signalling and

- inflammation that is dysregulated in disease. *Biochemistry and Cell Biology*, bcb-2023-0134. <https://doi.org/10.1139/bcb-2023-0134>
- Mattson, M. P., & Arumugam, T. V. (2018). Hallmarks of Brain Aging : Adaptive and Pathological Modification by Metabolic States. *Cell Metabolism*, 27(6), 1176-1199. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2018.05.011>
- Mattson, M. P., & Magnus, T. (2006). Ageing and neuronal vulnerability. *Nature Reviews Neuroscience*, 7(4), Article 4. <https://doi.org/10.1038/nrn1886>
- McClintock, B. (1950). The Origin and Behavior of Mutable Loci in Maize. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 36(6), 344-355.
- McClintock, B. (1961). Some Parallels Between Gene Control Systems in Maize and in Bacteria. *The American Naturalist*. <https://doi.org/10.1086/282188>
- McKerrow, W., Kagermazova, L., Doudican, N., Frazzette, N., Kaparos, E. I., Evans, S. A., Rocha, A., Sedivy, J. M., Neretti, N., Carucci, J., Boeke, J. D., & Fenyö, D. (2023). LINE-1 retrotransposon expression in cancerous, epithelial and neuronal cells revealed by 5' single-cell RNA-Seq. *Nucleic Acids Research*, 51(5), Article 5. <https://doi.org/10.1093/nar/gkad049>
- McKinnon, P. J. (2004). ATM and ataxia telangiectasia. *EMBO Reports*, 5(8), 772-776. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400210>
- Menzies, F. M., Fleming, A., Caricasole, A., Bento, C. F., Andrews, S. P., Ashkenazi, A., Füllgrabe, J., Jackson, A., Jimenez Sanchez, M., Karabiyik, C., Licitra, F., Lopez Ramirez, A., Pavel, M., Puri, C., Renna, M., Ricketts, T., Schlotawa, L., Vicinanza, M., Won, H., ... Rubinsztein, D. C. (2017). Autophagy and Neurodegeneration : Pathogenic Mechanisms and Therapeutic Opportunities. *Neuron*, 93(5), 1015-1034. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.01.022>
- Mertens, J., Paquola, A. C. M., Ku, M., Hatch, E., Böhnke, L., Ladjevardi, S., McGrath, S., Campbell, B., Lee, H., Herdy, J. R., Gonçalves, J. T., Toda, T., Kim, Y., Winkler, J., Yao, J., Hetzer, M. W., & Gage, F. H. (2015). Directly Reprogrammed Human Neurons Retain Aging-Associated Transcriptomic Signatures and Reveal Age-Related Nucleocytoplasmic Defects. *Cell Stem Cell*, 17(6), Article 6. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2015.09.001>
- Milicevic, K., Rankovic, B., Andjus, P. R., Bataveljic, D., & Milovanovic, D. (2022). Emerging Roles for Phase Separation of RNA-Binding Proteins in Cellular Pathology of ALS. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 10. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcell.2022.840256>
- Millicamps, S., & Julien, J.-P. (2013). Axonal transport deficits and neurodegenerative diseases. *Nature Reviews Neuroscience*, 14(3), 161-176. <https://doi.org/10.1038/nrn3380>
- Miller, K. N., Victorelli, S. G., Salmonowicz, H., Dasgupta, N., Liu, T., Passos, J. F., & Adams, P. D. (2021). Cytoplasmic DNA: sources, sensing, and role in aging and disease. *Cell*, 184(22), Article 22. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.09.034>
- Mita, P., Sun, X., Fenyö, D., Kahler, D. J., Li, D., Agmon, N., Wudzinska, A., Keegan, S., Bader, J. S., Yun, C., & Boeke, J. D. (2020). BRCA1 and S phase DNA repair pathways restrict LINE-1 retrotransposition in human cells. *Nature Structural & Molecular Biology*, 1-18. <https://doi.org/10.1038/s41594-020-0374-z>
- Mita, P., Wudzinska, A., Sun, X., Andrade, J., Nayak, S., Kahler, D. J., Badri, S., LaCava, J., Ueberheide, B., Yun, C. Y., Fenyö, D., & Boeke, J. D. (2018). LINE-1 protein localization and functional dynamics during the cell cycle. *eLife*, 7. <https://doi.org/10.7554/eLife.30058>
- Moldovan, J. B., & Moran, J. V. (2015). The Zinc-Finger Antiviral Protein ZAP Inhibits LINE and Alu

- Retrotransposition. *PLoS Genetics*, *11*(5), Article 5. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005121>
- Moran, J. V., Holmes, S. E., Naas, T. P., DeBerardinis, R. J., Boeke, J. D., & Kazazian, H. H. (1996). High frequency retrotransposition in cultured mammalian cells. *Cell*, *87*(5), Article 5.
- Mostoslavsky, R., Chua, K. F., Lombard, D. B., Pang, W. W., Fischer, M. R., Gellon, L., Liu, P., Mostoslavsky, G., Franco, S., Murphy, M. M., Mills, K. D., Patel, P., Hsu, J. T., Hong, A. L., Ford, E., Cheng, H.-L., Kennedy, C., Nunez, N., Bronson, R., ... Alt, F. W. (2006). Genomic instability and aging-like phenotype in the absence of mammalian SIRT6. *Cell*, *124*(2), 315-329. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.11.044>
- Moszczynska, A. (2020). Differential Responses of LINE-1 in the Dentate Gyrus, Striatum and Prefrontal Cortex to Chronic Neurotoxic Methamphetamine: A Study in Rat Brain. *Genes*, *11*(4), 364. <https://doi.org/10.3390/genes11040364>
- Mouse Genome Sequencing Consortium, Waterston, R. H., Lindblad-Toh, K., Birney, E., Rogers, J., Abril, J. F., Agarwal, P., Agarwala, R., Ainscough, R., Alexandersson, M., An, P., Antonarakis, S. E., Attwood, J., Baertsch, R., Bailey, J., Barlow, K., Beck, S., Berry, E., Birren, B., ... Lander, E. S. (2002). Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature*, *420*(6915), 520-562. <https://doi.org/10.1038/nature01262>
- Mumford, P. W., Romero, M. A., Osburn, S. C., Roberson, P. A., Vann, C. G., Mobley, C. B., Brown, M. D., Kavazis, A. N., Young, K. C., & Roberts, M. D. (2019). Skeletal muscle LINE-1 retrotransposon activity is upregulated in older versus younger rats. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, *317*(3), R397-R406. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00110.2019>
- Muotri, A. R., Chu, V. T., Marchetto, M. C. N., Deng, W., Moran, J. V., & Gage, F. H. (2005). Somatic mosaicism in neuronal precursor cells mediated by L1 retrotransposition. *Nature*, *435*(7044), Article 7044. <https://doi.org/10.1038/nature03663>
- Muotri, A. R., Marchetto, M. C. N., Coufal, N. G., Oefner, R., Yeo, G., Nakashima, K., & Gage, F. H. (2010). L1 retrotransposition in neurons is modulated by MeCP2. *Nature*, *468*(7322), Article 7322. <https://doi.org/10.1038/nature09544>
- Naskar, A., Nayak, A., Salaikumar, M. R., Vishal, S. S., & Gopal, P. P. (2023). Phase separation and pathologic transitions of RNP condensates in neurons: Implications for amyotrophic lateral sclerosis, frontotemporal dementia and other neurodegenerative disorders. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, *16*, 1242925. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2023.1242925>
- Naufer, M. N., Furano, A. V., & Williams, M. C. (2019). Protein-nucleic acid interactions of LINE-1 ORF1p. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, *86*, 140-149. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2018.03.019>
- Nelson, P. T., Alafuzoff, I., Bigio, E. H., Bouras, C., Braak, H., Cairns, N. J., Castellani, R. J., Crain, B. J.... Beach, T. G. (2012). Correlation of Alzheimer disease neuropathologic changes with cognitive status: A review of the literature. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, *71*(5), 362-381. <https://doi.org/10.1097/NEN.0b013e31825018f7>
- Newton, J. C., Naik, M. T., Li, G. Y., Murphy, E. L., Fawzi, N. L., Sedivy, J. M., & Jogle, G. (2021). Phase separation of the LINE-1 ORF1 protein is mediated by the N-terminus and coiled-coil domain. *Biophysical Journal*, *120*(11), Article 11. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2021.03.028>
- Nik-Zainal, S., & Hall, B. A. (2019). Cellular survival over genomic perfection. *Science (New York, N.Y.)*, *366*(6467), 802-803. <https://doi.org/10.1126/science.aax8046>
- Nilaver, B. I., & Urbanski, H. F. (2023). Mechanisms underlying TDP-43 pathology and neurodegeneration: An updated Mini-Review. *Frontiers in Aging Neuroscience*, *15*, 1142617. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2023.1142617>

- Nurk, S., Koren, S., Rhie, A., Rautiainen, M., Bzikadze, A. V., Mikheenko, A., Vollger, M. R., Altemose, N., Uralsky, L., Gershman, A., Aganezov, S., Hoyt, S. J., Diekhans, M., Logsdon, G. A., Alonge, M., Antonarakis, S. E., Borchers, M., Bouffard, G. G., Brooks, S. Y., ... Phillippy, A. M. (2022). The complete sequence of a human genome. *Science*, 376(6588), 44-53. <https://doi.org/10.1126/science.abj6987>
- Oberdoerffer, P., & Sinclair, D. A. (2007). The role of nuclear architecture in genomic instability and ageing. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 8(9), Article 9. <https://doi.org/10.1038/nrm2238>
- Osburn, S. C., Mesquita, P. H. C., Neal, F. K., Rumbley, M. N., Holmes, M. T., Ruple, B. A., Mobley, C. B., Brown, M. D., McCullough, D. J., Kavazis, A. N., & Roberts, M. D. (2022). Long-term voluntary wheel running effects on markers of long interspersed nuclear element-1 in skeletal muscle, liver, and brain tissue of female rats. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 323(3), C907-C919. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00234.2022>
- Pacelli, C., Giguère, N., Bourque, M.-J., Lévesque, M., Slack, R. S., & Trudeau, L.-É. (2015). Elevated Mitochondrial Bioenergetics and Axonal Arborization Size Are Key Contributors to the Vulnerability of Dopamine Neurons. *Current Biology*, 25(18), 2349-2360. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.07.050>
- Pandya, V. A., & Patani, R. (2021). Region-specific vulnerability in neurodegeneration : Lessons from normal ageing. *Ageing Research Reviews*, 67, 101311. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2021.101311>
- Parker, R., & Sheth, U. (2007). P bodies and the control of mRNA translation and degradation. *Molecular Cell*, 25(5), Article 5. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.02.011>
- Patel, A., Lee, H. O., Jawerth, L., Maharana, S., Jahnel, M., Hein, M. Y., Stoynov, S., Mahamid, J., Saha, S., Franzmann, T. M., Pozniakovski, A., Poser, I., Maghelli, N., Royer, L. A., Weigert, M., Myers, E. W., Grill, S., Drechsel, D., Hyman, A. A., & Alberti, S. (2015). A Liquid-to-Solid Phase Transition of the ALS Protein FUS Accelerated by Disease Mutation. *Cell*, 162(5), 1066-1077. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.07.047>
- Peddigari, S., Li, P. W.-L., Rabe, J. L., & Martin, S. L. (2013). hnRNPL and nucleolin bind LINE-1 RNA and function as host factors to modulate retrotransposition. *Nucleic Acids Research*, 41(1), Article 1. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1075>
- Penzkofer, T., Jäger, M., Figlerowicz, M., Badge, R., Mundlos, S., Robinson, P. N., & Zemojtel, T. (2017). L1Base 2 : More retrotransposition-active LINE-1s, more mammalian genomes. *Nucleic Acids Research*, 45(D1), Article D1. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw925>
- Percharde, M., Lin, C.-J., Yin, Y., Guan, J., Peixoto, G. A., Bulut-Karslioglu, A., Biechele, S., Huang, B., Shen, X., & Ramalho-Santos, M. (2018). A LINE1-Nucleolin Partnership Regulates Early Development and ESC Identity. *Cell*, 1-35. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.05.043>
- Pereira, G. C., Sanchez, L., Schaughency, P. M., Rubio-Roldán, A., Choi, J. A., Planet, E., Batra, R., Turelli, P., Trono, D., Ostrow, L. W., Ravits, J., Kazazian, H. H., Wheelan, S. J., Heras, S. R., Mayer, J., Garcia-Perez, J. L., & Goodier, J. L. (2018). Properties of LINE-1 proteins and repeat element expression in the context of amyotrophic lateral sclerosis. *Mobile DNA*, 9(1), Article 1. <https://doi.org/10.1186/s13100-018-0138-z>
- Peze-Heidsieck, E., Bonnifet, T., Znaidi, R., Ravel-Godreuil, C., Massiani-Beaudoin, O., Joshi, R. L., & Fuchs, J. (2021). Retrotransposons as a Source of DNA Damage in Neurodegeneration. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 13, 786897. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2021.786897>
- Philippe, C., Vargas-Landin, D. B., Doucet, A. J., van Essen, D., Vera-Otarola, J., Kuciak, M., Corbin, A., Nigumann, P., & Cristofari, G. (2016). Activation of individual L1 retrotransposon instances is restricted to cell-type dependent permissive loci. *eLife*, 5. <https://doi.org/10.7554/eLife.13926>
- Pizarro, J. G., & Cristofari, G. (2016). Post-Transcriptional Control of LINE-1 Retrotransposition by Cellular Host Factors in Somatic Cells. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 4, 14.

<https://doi.org/10.3389/fcell.2016.00014>

Portz, B., Lee, B. L., & Shorter, J. (2021). FUS and TDP-43 Phases in Health and Disease. *Trends in Biochemical Sciences*, *46*(7), 550-563. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2020.12.005>

Poullet, P., Carpentier, S., & Barillot, E. (2007). myProMS, a web server for management and validation of mass spectrometry-based proteomic data. *Proteomics*, *7*(15), 2553-2556. <https://doi.org/10.1002/pmic.200600784>

Prasad, A., Bharathi, V., Sivalingam, V., Girdhar, A., & Patel, B. K. (2019). Molecular Mechanisms of TDP-43 Misfolding and Pathology in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, *12*. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnmol.2019.00025>

Protasova, M. S., Andreeva, T. V., & Rogaev, E. I. (2021). Factors Regulating the Activity of LINE1 Retrotransposons. *Genes*, *12*(10), Article 10. <https://doi.org/10.3390/genes12101562>

Prudencio, M., Gonzales, P. K., Cook, C. N., Gendron, T. F., Daugherty, L. M., Song, Y., Ebbert, M. T. W., Van Blitterswijk, M., Zhang, Y.-J., Jansen-West, K., Baker, M. C., DeTure, M., Rademakers, R., Boylan, K. B., Dickson, D. W., Petrucelli, L., & Link, C. D. (2017). Repetitive element transcripts are elevated in the brain of C9orf72 ALS/FTLD patients. *Human Molecular Genetics*, *26*(17), Article 17. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddx233>

Quesada, V., Freitas-Rodríguez, S., Miller, J., Pérez-Silva, J. G., Jiang, Z.-F., Tapia, W., Santiago-Fernández, O., Campos-Iglesias, D., Kuderna, L. F. K., Quinzin, M., Álvarez, M. G., Carrero, D., Beheregaray, L. B., Gibbs, J. P., Chiari, Y., Glaberman, S., Ciofi, C., Araujo-Voces, M., Mayoral, P., ... López-Otín, C. (2019). Giant tortoise genomes provide insights into longevity and age-related disease. *Nature Ecology & Evolution*, *3*(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41559-018-0733-x>

Rajagopalan, M., Balasubramanian, S., & Ramaswamy, A. (2017). Insights into the RNA binding mechanism of human L1-ORF1p: A molecular dynamics study. *Molecular bioSystems*, *13*(9), 1728-1743. <https://doi.org/10.1039/c7mb00358g>

Ramirez, P., Zuniga, G., Sun, W., Beckmann, A., Ochoa, E., DeVos, S. L., Hyman, B., Chiu, G., Roy, E. R., Cao, W., Orr, M., Buggia-Prevot, V., Ray, W. J., & Frost, B. (2022). Pathogenic tau accelerates aging-associated activation of transposable elements in the mouse central nervous system. *Progress in Neurobiology*, *208*, 102181. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2021.102181>

Ramos, K. S., Bojang, P., & Bowers, E. (2021). Role of long interspersed nuclear element-1 in the regulation of chromatin landscapes and genome dynamics. *Experimental Biology and Medicine (Maywood, N.J.)*, *246*(19), 2082-2097. <https://doi.org/10.1177/15353702211031247>

Rangwala, S. H., Zhang, L., & Kazazian, H. H. (2009). Many LINE1 elements contribute to the transcriptome of human somatic cells. *Genome Biology*, *10*(9), Article 9. <https://doi.org/10.1186/gb-2009-10-9-r100>

Ravel-Godreuil, C., Massiani-Beaudoin, O., Mailly, P., Prochiantz, A., Joshi, R. L., & Fuchs, J. (2021). Perturbed DNA methylation by Gadd45b induces chromatin disorganization, DNA strand breaks and dopaminergic neuron death. *ISCIENCE*, *24*(7), Article 7. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.102756>

Reeve, A., Simcox, E., & Turnbull, D. (2014). Ageing and Parkinson's disease : Why is advancing age the biggest risk factor? *Ageing Research Reviews*, *14*(100), 19-30. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2014.01.004>

Rekaik, H., Blaudin de Thé, F.-X., Fuchs, J., Massiani-Beaudoin, O., Prochiantz, A., & Joshi, R. L. (2015). Engrailed Homeoprotein Protects Mesencephalic Dopaminergic Neurons from Oxidative Stress. *Cell Reports*, *13*(2), Article 2. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.08.076>

Ren, W., Fan, H., Grimm, S. A., Kim, J. J., Li, L., Guo, Y., Petell, C. J., Tan, X.-F., Zhang, Z.-M., Coan, J. P., Yin,

- J., Kim, D. I., Gao, L., Cai, L., Khudaverdyan, N., Çetin, B., Patel, D. J., Wang, Y., Cui, Q., ... Song, J. (2021). DNMT1 reads heterochromatic H4K20me3 to reinforce LINE-1 DNA methylation. *Nature communications*, 1-16. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-22665-4>
- Richardson, S. R., Morell, S., & Faulkner, G. J. (2014). L1 retrotransposons and somatic mosaicism in the brain. *Annual Review of Genetics*, 48, 1-27. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-120213-092412>
- Rodic, N. (2018). LINE-1 activity and regulation in cancer. *Frontiers in Bioscience (Landmark Edition)*, 23(9), 1680-1686. <https://doi.org/10.2741/4666>
- Romerio, F. (2023). Origin and functional role of antisense transcription in endogenous and exogenous retroviruses. *Retrovirology*, 20(1), 6. <https://doi.org/10.1186/s12977-023-00622-x>
- Rookhuizen, D. C., Bonte, P.-E., Ye, M., Hoyle, T., Gentili, M., Burgdorf, N., Durand, S., Aprahamian, F., Kroemer, G., Manel, N., Waterfall, J. J., Milne, R., Goudot, C., Towers, G. J., & Amigorena, S. (2021). Induction of transposable element expression is central to innate sensing. *bioRxiv*, 2021.09.10.457789-60. <https://doi.org/10.1101/2021.09.10.457789>
- Russ, E., & Iordanskiy, S. (2023). Endogenous Retroviruses as Modulators of Innate Immunity. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 12(2), 162. <https://doi.org/10.3390/pathogens12020162>
- Rybacki, K., Xia, M., Ahsan, M. U., Xing, J., & Wang, K. (2023). Assessing the Expression of Long INterspersed Elements (LINEs) via Long-Read Sequencing in Diverse Human Tissues and Cell Lines. *Genes*, 14(10), Article 10. <https://doi.org/10.3390/genes14101893>
- Sahakyan, A. B., Murat, P., Mayer, C., & Balasubramanian, S. (2017). G-quadruplex structures within the 3' UTR of LINE-1 elements stimulate retrotransposition. *Nature Structural & Molecular Biology*, 24(3), Article 3. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3367>
- Sameri, S., Samadi, P., Dehghan, R., Salem, E., Fayazi, N., & Amini, R. (2020). Stem Cell Aging in Lifespan and Disease: A State-of-the-Art Review. *Current Stem Cell Research & Therapy*, 15(4), 362-378. <https://doi.org/10.2174/1574888X15666200213105155>
- Sato, S., Gillette, M., de Santiago, P. R., Kuhn, E., Burgess, M., Doucette, K., Feng, Y., Mendez-Dorantes, C., Ippoliti, P. J., Hobday, S., Mitchell, M. A., Doberstein, K., Gysler, S. M., Hirsch, M. S., Schwartz, L., Birrer, M. J., Skates, S. J., Burns, K. H., Carr, S. A., & Drapkin, R. (2023). LINE-1 ORF1p as a candidate biomarker in high grade serous ovarian carcinoma. *Scientific Reports*, 13(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-28840-5>
- Savage, A. L., Schumann, G. G., Breen, G., Bubb, V. J., Al-Chalabi, A., & Quinn, J. P. (2019). Retrotransposons in the development and progression of amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 90(3), Article 3. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2018-319210>
- Schieweck, R., Ninkovic, J., & Kiebler, M. A. (2021). RNA-binding proteins balance brain function in health and disease. *Physiological Reviews*, 101(3), 1309-1370. <https://doi.org/10.1152/physrev.00047.2019>
- Schneider, B. K., Sun, S., Lee, M., Li, W., Skvir, N., Neretti, N., Vijg, J., & Secombe, J. (2023). Expression of retrotransposons contributes to aging in Drosophila. *Genetics*, 224(2), iyad073. <https://doi.org/10.1093/genetics/iyad073>
- Seale, K., Horvath, S., Teschendorff, A., Eynon, N., & Voisin, S. (2022). Making sense of the ageing methylome. *Nature Reviews. Genetics*, 23(10), 585-605. <https://doi.org/10.1038/s41576-022-00477-6>
- Sharma, R., Rodić, N., Burns, K. H., & Taylor, M. S. (2016). Immunodetection of Human LINE-1 Expression in Cultured Cells and Human Tissues. In *RNA-Protein Complexes and Interactions* (p. 261-280). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3372-3_17

- Sienski, G., Narayan, P., Bonner, J. M., Kory, N., Boland, S., Arczewska, A. A., Ralvenius, W. T., Akay, L., Lockshin, E., He, L., Milo, B., Graziosi, A., Baru, V., Lewis, C. A., Kellis, M., Sabatini, D. M., Tsai, L.-H., & Lindquist, S. (2021). APOE4 disrupts intracellular lipid homeostasis in human iPSC-derived glia. *Science Translational Medicine*, *13*(583), eaaz4564. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaz4564>
- Sikora, E., Bielak-Zmijewska, A., Dudkowska, M., Krzystyniak, A., Mosieniak, G., Wesierska, M., & Wlodarczyk, J. (2021). Cellular Senescence in Brain Aging. *Frontiers in Aging Neuroscience*, *13*, 646924. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2021.646924>
- Simon, M., Van Meter, M., Ablaeva, J., Ke, Z., Gonzalez, R. S., Taguchi, T., De Cecco, M., Leonova, K. I., Kogan, V., Helfand, S. L., Neretti, N., Roichman, A., Cohen, H. Y., Meer, M. V., Gladyshev, V. N., Antoch, M. P., Gudkov, A. V., Sedivy, J. M., Seluanov, A., & Gorbunova, V. (2019). LINE1 Derepression in Aged Wild-Type and SIRT6-Deficient Mice Drives Inflammation. *Cell Metabolism*, *29*(4), Article 4. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2019.02.014>
- Simon, M., Yang, J., Gigas, J., Earley, E. J., Hillpot, E., Zhang, L., Zagorulya, M., Tomblin, G., Gilbert, M., Yuen, S. L., Pope, A., Van Meter, M., Emmrich, S., Firsanov, D., Athreya, A., Biashad, S. A., Han, J., Ryu, S., Tare, A., ... Gorbunova, V. (2022). A rare human centenarian variant of SIRT6 enhances genome stability and interaction with Lamin A. *The EMBO Journal*. <https://doi.org/10.15252/embj.2021110393>
- Siomi, M. C., Sato, K., Pezic, D., & Aravin, A. A. (2011). PIWI-interacting small RNAs : The vanguard of genome defence. *Nature Publishing Group*, *12*(4), Article 4. <https://doi.org/10.1038/nrm3089>
- Sookdeo, A., Hepp, C. M., McClure, M. A., & Boissinot, S. (2013). Revisiting the evolution of mouse LINE-1 in the genomic era. *Mobile DNA*, *4*(1), Article 1. <https://doi.org/10.1186/1759-8753-4-3>
- Speek, M. (2001). Antisense promoter of human L1 retrotransposon drives transcription of adjacent cellular genes. *Molecular and Cellular Biology*, *21*(6), Article 6. <https://doi.org/10.1128/MCB.21.6.1973-1985.2001>
- St Laurent, G., Hammell, N., & Mccaffrey, T. A. (2010). A LINE-1 component to human aging : Do LINE elements exact a longevity cost for evolutionary advantage? *Mechanisms of Ageing and Development*, *131*(5), Article 5. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2010.03.008>
- Steiner, J. P., Bachani, M., Malik, N., DeMarino, C., Li, W., Sampson, K., Lee, M., Kowalak, J., Bhaskar, M., Doucet-O'Hare, T., Garcia-Montojo, M., Cowen, M., Smith, B., Reoma, L. B., Medina, J., Brunel, J., Pierquin, J., Charvet, B., Perron, H., & Nath, A. (2022). Human Endogenous Retrovirus K Envelope in Spinal Fluid of Amyotrophic Lateral Sclerosis Is Toxic. *Annals of Neurology*, *92*(4), Article 4. <https://doi.org/10.1002/ana.26452>
- Stenz, L. (2021). The L1-dependant and Pol III transcribed Alu retrotransposon, from its discovery to innate immunity. *Molecular Biology Reports*, *48*(3), 2775-2789. <https://doi.org/10.1007/s11033-021-06258-4>
- Stow, E. C., Kaul, T., DeHaro, D. L., Dem, M. R., Beletsky, A. G., Morales, M. E., Du, Q., LaRosa, A. J., Yang, H., Smither, E., Baddoo, M., Ungerleider, N., Deininger, P., & Belancio, V. P. (2021). Organ-, sex- and age-dependent patterns of endogenous L1 mRNA expression at a single locus resolution. 1-19. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab369>
- Suarez, N. A., Macia, A., & Muotri, A. R. (2017). LINE-1 retrotransposons in healthy and diseased human brain. *Developmental Neurobiology*, *78*(5), Article 5. <https://doi.org/10.1002/dneu.22567>
- Sun, J., Wang, L., Bao, H., Premi, S., Das, U., Chapman, E. R., & Roy, S. (2019). Functional cooperation of α -synuclein and VAMP2 in synaptic vesicle recycling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *116*(23), 11113-11115. <https://doi.org/10.1073/pnas.1903049116>
- Sun, W., Samimi, H., Gamez, M., Zare, H., & Frost, B. (2018). Pathogenic tau-induced piRNA depletion promotes neuronal death through transposable element dysregulation in neurodegenerative tauopathies.

Nature Neuroscience, 21(8), Article 8. <https://doi.org/10.1038/s41593-018-0194-1>

Sur, D., Kustwar, R. K., Budania, S., Mahadevan, A., Hancks, D. C., Yadav, V., Shankar, S. K., & Mandal, P. K. (2017). Detection of the LINE-1 retrotransposon RNA-binding protein ORF1p in different anatomical regions of the human brain. *Mobile DNA*, 1-12. <https://doi.org/10.1186/s13100-017-0101-4>

Surmeier, D. J., Obeso, J. A., & Halliday, G. M. (2017). Selective neuronal vulnerability in Parkinson disease. *Nature Reviews Neuroscience*, 18(2), Article 2. <https://doi.org/10.1038/nrn.2016.178>

Suzuki, H., Shibagaki, Y., Hattori, S., & Matsuoka, M. (2015). Nuclear TDP-43 causes neuronal toxicity by escaping from the inhibitory regulation by hnRNPs. *Human Molecular Genetics*, 24(6), 1513-1527. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddu563>

Swergold, G. D. (1990). Identification, characterization, and cell specificity of a human LINE-1 promoter. *Molecular and Cellular Biology*, 10(12), Article 12.

Takahashi, F., Zhang, C., Hohjoh, H., Raveney, B., Yamamura, T., Hayashi, N., & Oki, S. (2022). Immune-mediated neurodegenerative trait provoked by multimodal derepression of long-interspersed nuclear element-1. *iScience*, 25(5), 104278. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2022.104278>

Takahashi, T., Stoiljkovic, M., Song, E., Gao, X.-B., Yasumoto, Y., Kudo, E., Carvalho, F., Kong, Y., Park, A., Shanabrough, M., Szigeti-Buck, K., Liu, Z.-W., Kristant, A., Zhang, Y., Sulkowski, P., Glazer, P. M., Kaczmarek, L. K., Horvath, T. L., & Iwasaki, A. (2022). LINE-1 activation in the cerebellum drives ataxia. *Neuron*, 1-19. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2022.08.011>

Tam, O. H., Rozhkov, N. V., Shaw, R., Kim, D., Hubbard, I., Fennessey, S., Propp, N., Consortium, T. N. A., Phatnani, H., Kwan, J., Sareen, D., Broach, J. R., Simmons, Z., Arcila-Londono, X., Lee, E. B., Van Deerlin, V. M., Shneider, N. A., Fraenkel, E., Ostrow, L. W., ... Hammell, M. G. (2019). Postmortem Cortex Samples Identify Distinct Molecular Subtypes of ALS: Retrotransposon Activation, Oxidative Stress, and Activated Glia. *Cell Reports*, 29(5), Article 5. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.09.066>

Tan, H., Wu, C., & Jin, L. (2018). A Possible Role for Long Interspersed Nuclear Elements-1 (LINE-1) in Huntington's Disease Progression. *Medical Science Monitor : International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*, 24, 3644-3652. <https://doi.org/10.12659/MSM.907328>

Tanaka, K., & Matsuda, N. (2014). Proteostasis and neurodegeneration: The roles of proteasomal degradation and autophagy. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1843(1), 197-204. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.03.012>

Taylor, M. P., & Enquist, L. W. (2015). Axonal spread of neuroinvasive viral infections. *Trends in microbiology*, 23(5), 283-288. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2015.01.002>

Taylor, M. S., Altukhov, I., Molloy, K. R., Mita, P., Jiang, H., Adney, E. M., Wudzinska, A., Badri, S., Ischenko, D., Eng, G., Burns, K. H., Fenyo, D., Chait, B. T., Alexeev, D., Rout, M. P., Boeke, J. D., & LaCava, J. (2018). Dissection of affinity captured LINE-1 macromolecular complexes. *eLife*, 7, 210-241. <https://doi.org/10.7554/eLife.30094>

Taylor, M. S., LaCava, J., Mita, P., Molloy, K. R., Huang, C. R. L., Li, D., Adney, E. M., Jiang, H., Burns, K. H., Chait, B. T., Rout, M. P., Boeke, J. D., & Dai, L. (2013). Affinity proteomics reveals human host factors implicated in discrete stages of LINE-1 retrotransposition. *Cell*, 155(5), Article 5. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.10.021>

Teissandier, A., Servant, N., Barillot, E., & Bourc'his, D. (2019). Tools and best practices for retrotransposon analysis using high-throughput sequencing data. *Mobile DNA*, 10(1), Article 1. <https://doi.org/10.1186/s13100-019-0192-1>

- Terry, D. M., & Devine, S. E. (2020). Aberrantly High Levels of Somatic LINE-1 Expression and Retrotransposition in Human Neurological Disorders. *Frontiers in genetics*, *10*, 36-14. <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.01244>
- Thakur, J., Packiaraj, J., & Henikoff, S. (2021). Sequence, Chromatin and Evolution of Satellite DNA. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(9), 4309. <https://doi.org/10.3390/ijms22094309>
- Thomas, C. A., Paquola, A. C. M., & Muotri, A. R. (2012). LINE-1 Retrotransposition in the Nervous System. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, *28*, 555-573. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-101011-155822>
- Thomas, C. A., Tejwani, L., Trujillo, C. A., Negraes, P. D., Herai, R. H., Mesci, P., Macia, A., Crow, Y. J., & Muotri, A. R. (2017). Modeling of TREX1-Dependent Autoimmune Disease using Human Stem Cells Highlights L1 Accumulation as a Source of Neuroinflammation. *Cell Stem Cell*, *21*(3), Article 3. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2017.07.009>
- Tian, X., Firsanov, D., Zhang, Z., Cheng, Y., Luo, L., Tomblin, G., Tan, R., Simon, M., Henderson, S., Steffan, J., Goldfarb, A., Tam, J., Zheng, K., Cornwell, A., Johnson, A., Yang, J.-N., Mao, Z., Manta, B., Dang, W., ... Gorbunova, V. (2019). SIRT6 Is Responsible for More Efficient DNA Double-Strand Break Repair in Long-Lived Species. *Cell*, *177*(3), 622-638.e22. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.03.043>
- Traxler, L., Lucciola, R., Herdy, J. R., Jones, J. R., Mertens, J., & Gage, F. H. (2023). Neural cell state shifts and fate loss in ageing and age-related diseases. *Nature Reviews Neurology*, *19*(7), Article 7. <https://doi.org/10.1038/s41582-023-00815-0>
- Tremblay, C., François, A., Delay, C., Freland, L., Vandal, M., Bennett, D. A., & Calon, F. (2017). Association of Neuropathological Markers in the Parietal Cortex With Antemortem Cognitive Function in Persons With Mild Cognitive Impairment and Alzheimer Disease. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, *76*(2), 70-88. <https://doi.org/10.1093/jnen/nlw109>
- Tunbak, H., Enriquez-Gasca, R., Tie, C. H. C., Gould, P. A., Mlcochova, P., Gupta, R. K., Fernandes, L., Holt, J., Veen, A. G., Giampazolias, E., Burns, K. H., Maillard, P. V., & Rowe, H. M. (2020). The HUSH complex is a gatekeeper of type I interferon through epigenetic regulation of LINE-1s. *Nature communications*, 1-15. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19170-5>
- Unger, J. W. (1998). Glial reaction in aging and Alzheimer's disease. *Microscopy Research and Technique*, *43*(1), Article 1. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0029\(19981001\)43:1<24::AID-JEMT4>3.0.CO;2-P](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0029(19981001)43:1<24::AID-JEMT4>3.0.CO;2-P)
- Urban, L. A., Trinh, A., Pearlman, E., Siryaporn, A., & Downing, T. L. (2021). The impact of age-related hypomethylated DNA on immune signaling upon cellular demise. *Trends in Immunology*, *42*(6), 464-468. <https://doi.org/10.1016/j.it.2021.04.005>
- Van Den Berge, N., Ferreira, N., Mikkelsen, T. W., Alstrup, A. K. O., Tamgüney, G., Karlsson, P., Terkelsen, A. J., Nyengaard, J. R., Jensen, P. H., & Borghammer, P. (2021). Ageing promotes pathological alpha-synuclein propagation and autonomic dysfunction in wild-type rats. *Brain: A Journal of Neurology*, *144*(6), 1853-1868. <https://doi.org/10.1093/brain/awab061>
- Van Meter, M., Kashyap, M., Rezazadeh, S., Geneva, A. J., Morello, T. D., Seluanov, A., & Gorbunova, V. (2014). SIRT6 represses LINE1 retrotransposons by ribosylating KAP1 but this repression fails with stress and age. *Nature Communications*, *5*, 5011. <https://doi.org/10.1038/ncomms6011>
- Vance, C., Rogelj, B., Hortobágyi, T., De Vos, K. J., Nishimura, A. L., Sreedharan, J., Hu, X., Smith, B., Ruddy, D., Wright, P., Ganesalingam, J., Williams, K. L., Tripathi, V., Al-Saraj, S., Al-Chalabi, A., Leigh, P. N., Blair, I. P., Nicholson, G., de Belleruche, J., ... Shaw, C. E. (2009). Mutations in FUS, an RNA processing protein, cause familial amyotrophic lateral sclerosis type 6. *Science*, *323*(5918), Article 5918.

<https://doi.org/10.1126/science.1165942>

Vazquez, B. N., Thackray, J. K., Simonet, N. G., Chahar, S., Kane-Goldsmith, N., Newkirk, S. J., Lee, S., Xing, J., Verzi, M. P., An, W., Vaquero, A., Tischfield, J. A., & Serrano, L. (2019). *SIRT7 mediates L1 elements transcriptional repression and their association with the nuclear lamina*. 1-16. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz519>

Vazquez, B. N., Thackray, J. K., Simonet, N. G., Kane-Goldsmith, N., Martinez-Redondo, P., Nguyen, T., Bunting, S., Vaquero, A., Tischfield, J. A., & Serrano, L. (2016). SIRT7 promotes genome integrity and modulates non-homologous end joining DNA repair. *The EMBO Journal*, 35(14), 1488-1503. <https://doi.org/10.15252/embj.201593499>

Vivar, C. (2015). Adult Hippocampal Neurogenesis, Aging and Neurodegenerative Diseases : Possible Strategies to Prevent Cognitive Impairment. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 15(21), 2175-2192. <https://doi.org/10.2174/1568026615666150610141524>

Vizziello, M., Borellini, L., Franco, G., & Ardolino, G. (2021). Disruption of Mitochondrial Homeostasis : The Role of PINK1 in Parkinson's Disease. *Cells*, 10(11), 3022. <https://doi.org/10.3390/cells10113022>

Vogt, B. A. (2019). Cingulate cortex in Parkinson's disease. *Handbook of Clinical Neurology*, 166, 253-266. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64196-0.00013-3>

Volkman, B., Wittmann, S., Lagisquet, J., Deutschmann, J., Eissmann, K., Ross, J. J., Biesinger, B., & Gramberg, T. (2020). Human TRIM5 α senses and restricts LINE-1 elements. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 17, 201922366. <https://doi.org/10.1073/pnas.1922366117>

Vuong, L. M., Pan, S., & Donovan, P. J. (2019). Proteome Profile of Endogenous Retrotransposon-Associated Complexes in Human Embryonic Stem Cells. *Proteomics*, 19(15), e1900169. <https://doi.org/10.1002/pmic.201900169>

Wahl, D., Cavalier, A. N., Smith, M., Seals, D. R., & LaRocca, T. J. (2021). Healthy Aging Interventions Reduce Repetitive Element Transcripts. *The Journals of Gerontology: Series A*, 76(5), Article 5. <https://doi.org/10.1093/gerona/glaa302>

Wahl, D., Smith, M. E., McEntee, C. M., Cavalier, A. N., Osburn, S. C., Burke, S. D., Grant, R. A., Nerguizian, D., Lark, D. S., Link, C. D., & LaRocca, T. J. (2023). The reverse transcriptase inhibitor 3TC protects against age-related cognitive dysfunction. *Aging Cell*, 22(5), e13798. <https://doi.org/10.1111/accel.13798>

Wang, D., Eraslan, B., Wieland, T., Hallström, B., Hopf, T., Zolg, D. P., Zecha, J., Asplund, A., Li, L., Meng, C., Frejno, M., Schmidt, T., Schnatbaum, K., Wilhelm, M., Ponten, F., Uhlen, M., Gagneur, J., Hahne, H., & Kuster, B. (2019). A deep proteome and transcriptome abundance atlas of 29 healthy human tissues. *Molecular Systems Biology*, 15(2), e8503. <https://doi.org/10.15252/msb.20188503>

Wang, E., Thombre, R., Shah, Y., Latanich, R., & Wang, J. (2021). G-Quadruplexes as pathogenic drivers in neurodegenerative disorders. *Nucleic Acids Research*, 49(9), Article 9. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab164>

Wang, Q., Liu, Y., & Zhou, J. (2015). Neuroinflammation in Parkinson's disease and its potential as therapeutic target. *Translational Neurodegeneration*, 4, 19. <https://doi.org/10.1186/s40035-015-0042-0>

Wang, W., Zheng, Y., Sun, S., Li, W., Song, M., Ji, Q., Wu, Z., Liu, Z., Fan, Y., Liu, F., Li, J., Esteban, C. R., Wang, S., Zhou, Q., Belmonte, J. C. I., Zhang, W., Qu, J., Tang, F., & Liu, G.-H. (2021). A genome-wide CRISPR-based screen identifies KAT7 as a driver of cellular senescence. *Science Translational Medicine*, 13(575), eabd2655. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abd2655>

Ward, J. R., Vasu, K., Deutschman, E., Halawani, D., Larson, P. A., Zhang, D., Willard, B., Fox, P. L., Moran, J. V., & Longworth, M. S. (2017). Condensin II and GAIT complexes cooperate to restrict LINE-1

retrotransposition in epithelial cells. *PLOS Genetics*, 13(10), e1007051. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007051>

Warkocki, Z. (2023). An update on post-transcriptional regulation of retrotransposons. *FEBS Letters*, 597(3), 380-406. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.14551>

Wilson, D. M., Cookson, M. R., Van Den Bosch, L., Zetterberg, H., Holtzman, D. M., & Dewachter, I. (2023). Hallmarks of neurodegenerative diseases. *Cell*, 186(4), Article 4. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.12.032>

Wood, J. G., Jones, B. C., Jiang, N., Chang, C., Hosier, S., Wickremesinghe, P., Garcia, M., Hartnett, D. A., Burhenn, L., Neretti, N., & Helfand, S. L. (2016). Chromatin-modifying genetic interventions suppress age-associated transposable element activation and extend life span in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(40), Article 40. <https://doi.org/10.1073/pnas.1604621113>

Wu, Y., Liu, W., Chen, J., Liu, S., Wang, M., Yang, L., Chen, C., Qi, M., Xu, Y., Qiao, Z., Yan, R., Kou, X., Zhao, Y., Shen, B., Yin, J., Wang, H., Gao, Y., & Gao, S. (2019). Nuclear Exosome Targeting Complex Core Factor Zcchc8 Regulates the Degradation of LINE1 RNA in Early Embryos and Embryonic Stem Cells. *Cell Reports*, 29(8), Article 8. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.10.055>

Xiang, L., Wang, Y., Liu, S., Liu, B., Jin, X., & Cao, X. (2023). Targeting Protein Aggregates with Natural Products: An Optional Strategy for Neurodegenerative Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(14), 11275. <https://doi.org/10.3390/ijms241411275>

Xiong, F., Wang, R., Lee, J.-H., Li, S., Chen, S.-F., Liao, Z., Hasani, L. A., Nguyen, P. T., Zhu, X., Krakowiak, J., Lee, D.-F., Han, L., Tsai, K.-L., Liu, Y., & Li, W. (2021). RNA m6A modification orchestrates a LINE-1-host interaction that facilitates retrotransposition and contributes to long gene vulnerability. *Cell Research*, 31(8), Article 8. <https://doi.org/10.1038/s41422-021-00515-8>

Xu, M., You, Y., Hunsicker, P., Hori, T., Small, C., Griswold, M. D., & Hecht, N. B. (2008). Mice deficient for a small cluster of Piwi-interacting RNAs implicate Piwi-interacting RNAs in transposon control. *Biology of Reproduction*, 79(1), Article 1. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.108.068072>

Zhang, A., Dong, B., Doucet, A. J., Moldovan, J. B., Moran, J. V., & Silverman, R. H. (2014). RNase L restricts the mobility of engineered retrotransposons in cultured human cells. *Nucleic Acids Research*, 42(6), 3803-3820. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1308>

Zhang, C., Raveney, B., Takahashi, F., Yeh, T., Hohjoh, H., Yamamura, T., & Oki, S. (2023). Pathogenic Microglia Orchestrate Neurotoxic Properties of Eomes-Expressing Helper T Cells. *Cells*, 12(6), Article 6. <https://doi.org/10.3390/cells12060868>

Zhang, X., Zhang, R., & Yu, J. (2020). New Understanding of the Relevant Role of LINE-1 Retrotransposition in Human Disease and Immune Modulation. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8, 657. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00657>

Zhang, Y., Amaral, M. L., Zhu, C., Grieco, S. F., Hou, X., Lin, L., Buchanan, J., Tong, L., Preissl, S., Xu, X., & Ren, B. (2022). Single-cell epigenome analysis reveals age-associated decay of heterochromatin domains in excitatory neurons in the mouse brain. *Cell Research*, 32(11), 1008-1021. <https://doi.org/10.1038/s41422-022-00719-6>

Zhang, Y., & Yang, Y. (2021). Effects of m6A RNA methylation regulators on endometrial cancer. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 35(9), e23942. <https://doi.org/10.1002/jcla.23942>

Zhao, K., Du, J., Peng, Y., Li, P., Wang, S., Wang, Y., Hou, J., Kang, J., Zheng, W., Hua, S., & Yu, X.-F. (2018). LINE1 contributes to autoimmunity through both RIG-I- and MDA5-mediated RNA sensing pathways. *Journal of Autoimmunity*, 90, 105-115. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2018.02.007>

Znaidi, R., Massiani-Beaudoin, O., Mailly, P., Monnet, H., Joshi, R. L., & Fuchs, J. (2023). *Nuclear translocation of LINE-1 encoded ORF1p alters nuclear envelope integrity and disrupts nucleocytoplasmic transport in neurons* (p. 2023.08.10.552479). bioRxiv. <https://doi.org/10.1101/2023.08.10.552479>

Résumé :

Le vieillissement et la dérégulation des éléments transposables sont deux processus intimement liés, caractérisés notamment par une dérégulation des rétrotransposons LINE-1. Ces éléments LINE-1 représentent 21% de notre génome et seulement une minorité de ces séquences conserve un potentiel codant essentiel à leur mobilité. D'un côté, le vieillissement est marqué par la dérégulation des LINE-1, d'un autre côté cette dérégulation entraîne des instabilités génomiques, des altérations épigénétiques et de l'inflammation qui accentuent le vieillissement et mènent à la neurodégénérescence. Ce mécanisme pourrait donc être impliqué dans l'établissement des maladies neurodégénératives. Cependant, nos connaissances sur l'expression et la localisation des protéines encodées par LINE-1 dans le système nerveux central sont limitées. Cette étude explore, dans le cerveau murin et humain, l'expression et les interactions de la protéine endogène ORF1p, une protéine chaperon et de liaison à l'ARN encodée par LINE-1. Une approche novatrice combinant la cartographie du cerveau à des algorithmes de deep-learning pour la segmentation cellulaire sur des images pyramidales à grande échelle a été conçue. Cette approche permet une quantification de l'intensité d'un marqueur, dans le cas présent ORF1p, dans toutes les cellules d'une coupe et de les assigner à une région cérébrale définie. Nous avons ainsi pu caractériser une expression généralisée de ORF1p dans le cerveau murin en condition physiologique. Cette expression touche 20% des cellules et s'avère spécifiquement neuronale avec un niveau variable entre les régions. Chez les souris âgées, la quantité d'ORF1p augmente dans les neurones de plusieurs régions cérébrales dont le mésencéphale et le striatum. Au niveau transcriptomique, en caractérisant une expression à l'échelle individuelle des éléments LINE-1 dans des échantillons post-mortem humains, nous avons montré que les transcrits LINE-1 sont plus élevés chez les individus âgés. Nous observons également une dérégulation de ces transcrits et d'autres familles d'éléments transposables dans le cadre des maladies d'Alzheimer et de Parkinson. Dans le cerveau de la souris et dans les neurones dopaminergiques humains en culture, ORF1p interagit avec plusieurs réseaux protéiques impliqués dans l'épissage et la traduction et qui sont modifiés lors d'un stress in vitro. Ces travaux contribuent à une meilleure compréhension de l'étendue de l'expression de la protéine ORF1p et des LINE-1 dans le cerveau en condition pathophysiologique, notamment en démontrant une expression basale de cette protéine spécifiquement dans les neurones, qui est ensuite accentuée lors du vieillissement.

Abstract :

Aging and dysregulation of transposable elements are two closely linked processes, particularly characterized by the derepression of LINE-1 retrotransposons. These LINE-1 elements constitute 21% of our genome, but only a minority of these sequences retain a coding potential that is essential to their mobility. On the one hand, aging is marked by LINE-1 derepression, and on the other hand, this derepression leads to genomic instabilities, epigenetic alterations and inflammation which are hallmarks of aging and neurodegeneration. LINE-1 could therefore be involved in the establishment of neurodegenerative diseases and indeed is causally implicated in neurodegeneration in model organisms. However, our knowledge of the expression and localization of LINE-1-encoded proteins in the central nervous system is limited. This study investigates, in the mouse and human brain, the expression and interactions of LINE-1 and its encoded protein ORF1p, a chaperone and RNA-binding protein. By establishing a novel approach combining brain mapping with deep-learning algorithms for cell segmentation on large-scale pyramidal images, we were able to characterize widespread ORF1p expression in the murine brain under physiological conditions. This expression spans around 20% of murine brain cells, is neuron-specific and is heterogeneous between regions. In aged mice, ORF1p expression in neurons increased in several brain regions such as midbrain and striatum. At the transcriptional level, by detecting full-length LINE-1 expression at the locus level in human post-mortem samples, LINE-1 transcripts were increased in aged individuals. We also observed dysregulation of these transcripts and other transposable elements families in Alzheimer's and Parkinson's diseases. In mouse brain and human dopaminergic neurons in culture, ORF1p interacts with several networks belonging to mRNA splicing and ribosomal proteins, which were modified during in vitro stress. This work contributes to a better understanding of the extent of ORF1p protein and LINE-1 expression in the brain under pathophysiological and aging conditions, notably by demonstrating a basal expression of this protein specifically in neurons, which is then accentuated during aging.