



Marseille
Medical
Genetics



Faculté
de Médecine
Aix+Marseille Université



Faculté
de Pharmacie
Aix+Marseille Université

Aix-Marseille Université
Faculté des Sciences Médicales et Paramédicales
École Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé
INSERM/AMU U1251 - Centre de Génétique Médicale de Marseille

----oOo----

THÈSE

Progeria de Hutchinson-Gilford : rôle des microARNs dans la régulation du cycle cellulaire et de l'induction de la sénescence

----oOo----

Valérie DELECOURT

Présentée et soutenue publiquement pour obtenir
le grade de Doctorat d'Aix-Marseille Université

Le 29 Octobre 2019

Mention : Pathologie Humaine

Spécialité : Génétique Humaine et Médicale

Devant les Membres du Jury de Thèse :

Rapporteur : Madame le Docteur Florence SOLARI
(INMG : Institut Neuromyogène)

Rapporteur : Monsieur le Professeur Jérôme LAMARTINE
(LBTI : Laboratoire de Biologie Tissulaire et d'Ingénierie thérapeutique)

Examineur : Madame le Docteur Laurence COLLEAUX
(Marseille Medical Genetics – Unité INSERM/AMU 1251)

Directeur de Thèse : Monsieur le Professeur Patrice ROLL
(Marseille Medical Genetics – Unité INSERM/AMU 1251)

Remerciements

Aux membres du jury

J'adresse mes remerciements à Madame le Docteur Florence Solari et à Monsieur le Professeur Jérôme Lamartine de l'honneur qu'ils m'ont fait en acceptant d'être rapporteurs de cette thèse. J'exprime ma gratitude à Madame le Docteur Laurence Colleaux qui a bien voulu être examinateur de cette thèse.

Je tiens également à remercier Monsieur le Professeur Patrice Roll de m'avoir encadré tout au long de cette thèse.

Professeur Nicolas Lévy, merci de m'avoir permis de passer mon internat au sein de votre Unité.

À l'équipe PR

Élise et Diane, je vous suis reconnaissante d'avoir participé à mon encadrement au cours de cette thèse et d'avoir eu beaucoup de patience.

Aux membres de l'Unité U-1251

Je remercie du fond du cœur les personnes avec qui j'ai pu travailler et/ou partager des moments de complicité : Alexandra S., Natacha, Aurélia, Nathalie P., Pauline, Fabien

À ma famille,

À mes amis de l'Unité U-1251 : Karima, Morgane, Sandy, Claire, Armand, Audrey, Kévin, Cathy, Alice, Clovis, Clothilde, Karim, Guy, Pascale, Sophie, Camille, Corine, Valérie G.

J'ai trouvé la chanson (de Céline Dion évidemment !) qui résume parfaitement ce que je veux vous exprimer.

À vous

C'est grâce à votre amour
Que j'ai trouvé mon chemin
Et quand j'ai eu des doutes
Vous n'étiez jamais loin
Quand j'avais le cœur lourd
Vous m'avez tendu la main
Et c'est ensemble que nous
L'écriront demain

J'ai ouvert devant vous les pages de ma vie
Et j'ai chanté tant de refrains, de récits
Mais celui-ci c'est à vous que je le dédie
Et c'est pour ça que je vous dis merci

Tout au long de ma route
Vous étiez mon repère
Vous m'avez redonné le souffle
Dès que je manquais d'air
Tous ces moments de bonheur
M'ont rendu tellement fière
Et c'est ensemble que nous
Exaucerons nos prières

J'ai ouvert devant vous les pages de ma vie
Et j'ai chanté tant de refrains, de récits
Mais celui-ci c'est à vous que je le dédie
Et c'est pour ça que je vous dis merci

Et j'ai chanté pour vous
Je suis tombée, me suis relevée devant vous
Et encore là

J'ai ouvert devant vous les pages de ma vie
Et j'ai chanté tant de refrains, de récits
Mais celui-ci c'est à vous que je le dédie
Et c'est pour ça que je vous dis merci

J'ai ouvert devant vous les pages de ma vie
Et j'ai chanté tant de refrains, de récits
Mais celui-ci c'est à vous que je le dédie
Et c'est pour ça que je vous dis merci

Table des matières

CHAPITRE I : Introduction	1
I . A) Protéines lamines : de la physiologie à la pathologie	2
A . 1) Les protéines lamines	2
1 . a) Généralités	2
1 . b) Structure	2
1 . c) Synthèse	5
1 . d) Localisation	7
1 . e) Rôles	8
e . i) Les lamines, architectes du noyau cellulaire	8
e . ii) Les lamines, supports des fonctions nucléaires	10
A . 2) Laminopathies d'origine génétique	12
2 . a) Progeria de Hutchinson-Gilford	12
a . i) Historique et épidémiologie	12
a . ii) Phénotype clinique	13
a . iii) Mutation génique et conséquences cellulaires	15
a . iv) Modèles animaux de Progeria	28
a . v) Stratégies thérapeutiques	34
2 . b) Autres syndromes progéroïdes	42
b . i) HGPS-like	43
b . ii) Syndrome Progéroïde Atypique (ou APS pour <i>Atypical Progeroid Syndrome</i>)	43
b . iii) Dermopathie restrictive (DR)	44
b . iv) Syndrome de Werner Atypique (SWA)	44
a . vi) Dysplasie acro-mandibulaire de type A	45
2 . c) Laminopathies tissu-spécifiques	45
I . B) Cycle cellulaire et sénescence	49
B . 1) Le cycle cellulaire	49
1 . a) Différentes phases	49
a . i) Phase G ₀	50
a . ii) Phases G ₁ et G ₂	50
a . iii) Phase S	51
a . iv) Phase M	52
1 . b) Régulation du cycle cellulaire	54
b . i) Généralités sur les protéines majeures du cycle cellulaire	55
b . ii) Mise en jeu de protéines spécifiques selon la phase du cycle	62
B . 2) La sénescence cellulaire	68
2 . a) Généralités	68
2 . b) Mécanismes de la sénescence cellulaire	70
b . i) Activation des inhibiteurs de CDKs	70
b . ii) Quelques-uns des acteurs clés de la sénescence	72
2 . c) Caractéristiques de la cellule sénescence	79
c . i) Modifications cytomorphologiques	79
c . ii) Modifications de l'expression des cyclines et des CDKs	80
c . iii) Expression de la β -galactosidase acide (pH = 6)	80
c . iv) Dysfonctionnement mitochondrial	81
c . v) Modifications chromatinienne	83
c . vi) Expression de GeromiRs	83
c . vii) Inflamm'aging	84
c . viii) SASP (Senescence-Associated Secretory Phenotype)	85

I . C)	MicroARNs : rôles physiologiques et implication en pathologie humaine	86
C . 1)	Définition	86
C . 2)	Synthèse	86
2 . a)	Synthèse canonique des miRNAs (Figures 44 et 45)	86
2 . b)	Synthèse non-canonique des miRNAs	89
b . i)	Processus indépendants de DROSHA	89
b . ii)	Processus indépendants de DICER	91
C . 3)	Mécanisme d'action	92
C . 4)	Sécrétion et signalisation des miRNAs dans le milieu extracellulaire	94
C . 5)	Rôles des miRNAs dans les processus physiologiques	96
C . 6)	Rôles des miRNAs dans le vieillissement	98
6 . a)	Les miRNAs au cours du vieillissement physiologique	98
6 . b)	Les miRNAs au cours du vieillissement pathologique	101
C . 7)	Les miRNAs : vers une stratégie thérapeutique ?	102
7 . a)	Les antimirs	102
7 . b)	Les mimics	104
7 . c)	Les Small RNA zippers	106
7 . d)	Les bloqueurs de sites (TSB pour <i>Target Site Blocker</i>)	106
CHAPITRE II : Résultats et discussion		108
II)	Dérégulation de miRNAs dans la Progeria : quelle implication dans les processus physiopathologiques ?	109
II . A)	Intérêt, hypothèse et objectifs de l'étude	109
ARTICLE		111
II . B)	Résultats complémentaires de l'article	112
B . 1)	Le miR-376a-3p et le miR-376b-3p altèrent l'expression de protéines intervenant dans la régulation du cycle cellulaire	112
B . 2)	Le miR-376a-3p induit une diminution du transcrit de CDK2	114
B . 3)	Impact des antimirs après une surexpression des miRNAs d'intérêts	115
B . 4)	Étude <i>ex vivo</i> de la sénescence de cellules hépatiques et rénales de souris HGPS	117
B . 5)	Discussion et perspectives	119
II . C)	Rôle des microARNs dans la Progeria de Hutchinson-Gilford et les syndromes apparentés : Analyses en NGS (<i>Next-Generation Sequencing</i>)	123
C . 1)	Résultats du miRNome réalisé à partir de fibroblastes issus de patients HGPS, HGPS-like et de témoins	125
C . 2)	Résultats du Transcriptome réalisé à partir de fibroblastes issus de patients HGPS, HGPS-like et de témoins	129
C . 3)	Discussion et perspectives	134
CHAPITRE III : Conclusion générale		138
ANNEXE : Revue scientifique publiée		140
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES		141

CHAPITRE I : *Introduction*

I . A) Protéines lamines : de la physiologie à la pathologie

A . 1) Les protéines lamines

1 . a) Généralités

Les lamines appartiennent à la famille des filaments intermédiaires de type V. Il s'agit de protéines nucléaires codées par 3 gènes et réparties en 2 classes :

- Les lamines de type A, codées par le gène *LMNA* : lamine A et lamine C (principales isoformes, essentiellement exprimées dans les cellules différenciées); lamine C₂ (uniquement exprimée dans les cellules germinales mâles) et la lamine AΔ10 (mise en évidence dans la lignée tumorale GLC-A1 correspondant à un adénocarcinome pulmonaire (Lin and Worman, 1993; Machiels et al., 1996)).
- Les lamines de type B : lamine B1 codée par *LMNB1* (Lin and Worman, 1995), lamine B2 codée par *LMNB2* (expression constitutive et apparaissant très tôt au cours du développement) (Biamonti et al., 1992; Höger et al., 1990) et lamine B3 également codée par *LMNB2* (uniquement exprimée dans les spermatoocytes) (Elkhatib et al., 2015).

1 . b) Structure

Les lamines, exclusivement nucléaires, possèdent des similitudes structurales avec les filaments intermédiaires cytoplasmiques, mais se distinguent néanmoins de ces derniers par quelques particularités. Ainsi, on retrouve (Figure 1) :

- Un domaine en N-terminal correspondant à la « tête » globulaire de la lamine (*Head*).
- Un domaine central correspondant à la partie « tige » de la lamine (*Road*) constituée de 4 sous-domaines organisés en super-hélices alpha (1A, 1B, 2A et 2B) séparés entre eux par des régions « de liaison » (L1, L12, L2). Ces dernières ont une séquence qui est différente de celle des filaments intermédiaires cytoplasmiques. Ce domaine central est essentiel pour la polymérisation des lamines.
- Un domaine en C-terminal correspondant à la partie « queue » de la lamine (*Tail*), qui contient un domaine « *Immunoglobuline-like* ». Une séquence d'adressage de la protéine au noyau est retrouvée au sein de cette région : la séquence NLS (*Nuclear Localization*

Sequence). Ce domaine participe à des liaisons de type protéine-protéine et de type protéine-ADN (Dittmer and Misteli, 2011; Stuurman et al., 1998).

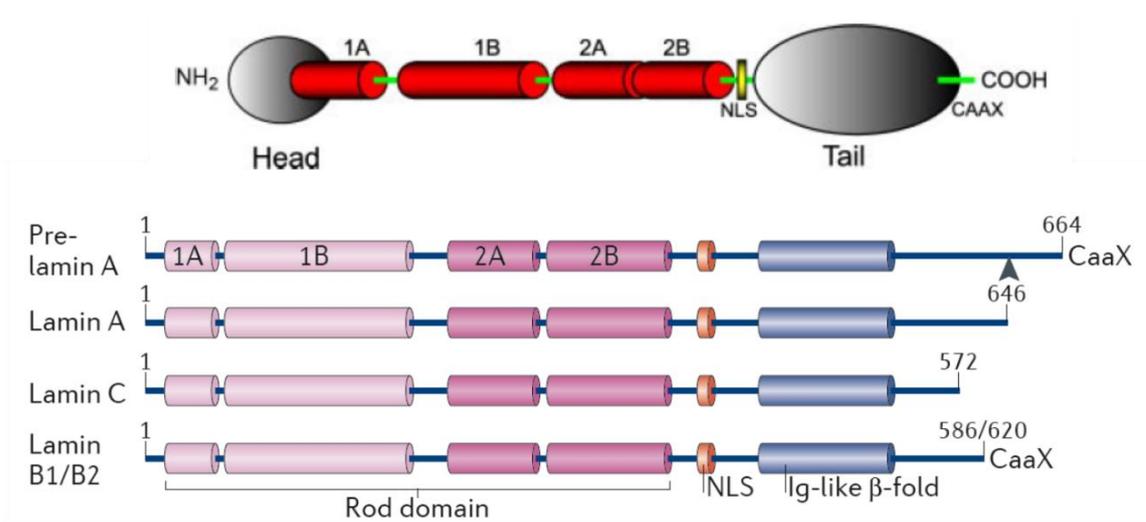


Figure 1 : Structure schématique des lamines (Broers et al., 2006; Burke and Stewart, 2013)

De la même manière que les filaments intermédiaires cytoplasmiques, les monomères de lamines s'assemblent, dans un premier temps, sous la forme de dimères *via* leur domaine central. Puis, ces dimères vont se positionner en parallèle et en « tête-à-queue » afin de former des polymères ou protofilaments. Ces protofilaments vont ensuite s'assembler entre eux et former des filaments intermédiaires de lamines (Figure 2) (Dittmer and Misteli, 2011; Stuurman et al., 1998).

Les filaments intermédiaires de lamines ont un diamètre inférieur à celui des filaments intermédiaires cytoplasmiques. En effet, il a été montré récemment que les microtubules, les microfilaments d'actine et les filaments intermédiaires de vimentine mesurent respectivement 24, 8 et 10 nm de diamètre, alors que les filaments intermédiaires de lamines ne mesurent que 3,5 nm de diamètre (Figure 3).

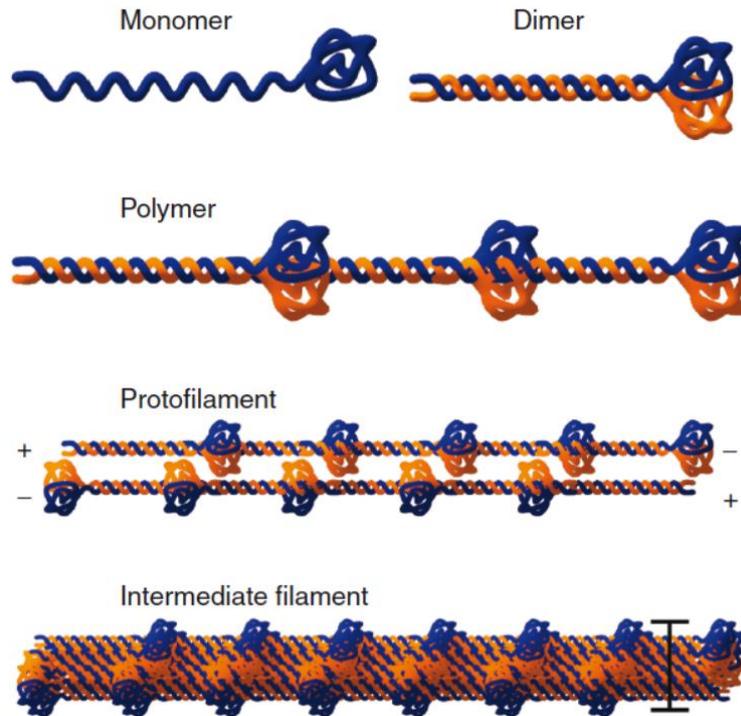


Figure 2 : Représentation schématique de la formation des filaments intermédiaires de lamines (Modifié à partir de (Dittmer and Misteli, 2011))

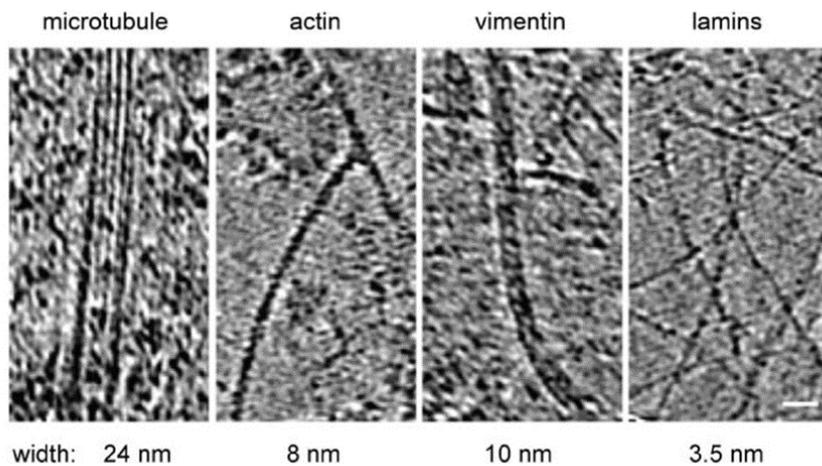


Figure 3 : Exemples d'éléments du cytosquelette avec leur diamètre respectif : microtubule, actine, vimentine et lamines (Turgay et al., 2017)

1. c) Synthèse

Les lamines de type A sont codées par le gène *LMNA* situé sur le chromosome 1q21.2-q21.3. Ce gène a une taille de 25 kb et contient 12 exons (Lin and Worman, 1993). L'épissage alternatif du gène *LMNA* produit 2 transcrits majoritaires codant la prélamine A et la lamine C. Une séquence protéique commune aux lamines A et C est générée à partir des exons 1 à 9. Pour la suite de sa séquence, la lamine A est générée à partir d'une partie seulement de l'exon 10, suivie des exons 11 et 12 (Navarro et al., 2008). La lamine C est générée à partir des exons 1 à 10, l'exon 10 étant inclus quasi-entièrement comme partie codante, suivie de sa séquence 3' non-codante (Figure 4) (Burke and Stewart, 2013).

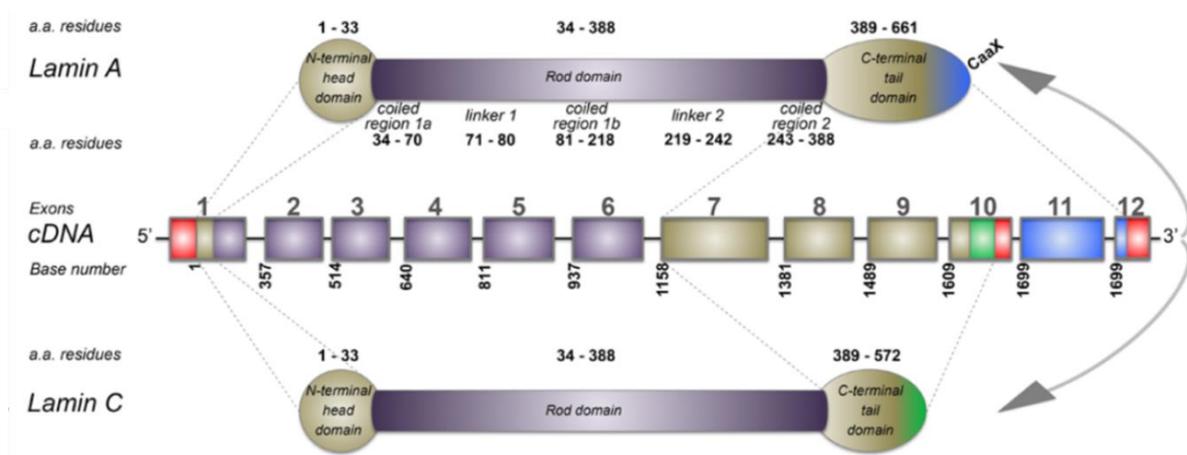


Figure 4 : Représentation schématique du gène *LMNA* (12 exons) codant les lamines A et C (Captur et al., 2018)

La lamine B1 est codée par le gène *LMNB1* situé sur le chromosome 5q.23.3-q.31.1 (Lin and Worman, 1995), et la lamine B2 et la lamine B3 par le gène *LMNB2* situé sur le chromosome 19p13.3, via un épissage alternatif (Furukawa and Hotta, 1993).

La lamine A et les lamines B sont synthétisées sous la forme d'un précurseur appelé prélamine, contrairement à la lamine C, directement produite sous forme mature. La synthèse des protéines matures nécessite plusieurs étapes post-traductionnelles (3 pour les lamines B et 4 pour la lamine A) se déroulant dans le cytoplasme et impliquant différentes enzymes.

La prélamine est farnésylée^a par la Farnésyl-Transférase (FT) au niveau de l'extrémité C-terminale sur une séquence de type CaaX^b. Le groupement farnésyl entraîne l'ancrage de la

^a La farnésylation est une réaction au cours de laquelle un groupement farnésyl vient se greffer à une protéine.

^b C = cystéine; a = résidu aliphatique; X = méthionine

prélamine sur le versant cytosolique de la membrane du réticulum endoplasmique (RE). Puis, 3 acides aminés sont clivés en C-terminal par la métalloprotéase ZMPSTE24/FACE 1 pour la lamine A et FACE2 pour les lamines B. Il s'ensuit une carboxy-méthylation de la cystéine en C-terminal par la Isoprényl-Cystéine-Carboxy-Méthyl-Transférase (ICMT). A ce stade, les lamines de type B sont matures, et sont importées dans le noyau, où elles sont ancrées à la face nucléoplasmique de l'enveloppe nucléaire (EN). Pour la lamine A, une étape supplémentaire de clivage en C-terminal par ZMPSTE24 entraîne la suppression des 15 derniers acides aminés incluant le groupement farnésyl. Ainsi, la lamine A mature n'est plus farnésylée, elle devient soluble, et est importée ainsi dans le noyau où elle y reste localisée (Figure 5) (Burke and Stewart, 2013).

La lamine C est directement produite sous forme mature. Ne contenant pas la séquence CaaX, elle n'est pas ancrée directement à l'enveloppe nucléaire et est donc soluble.

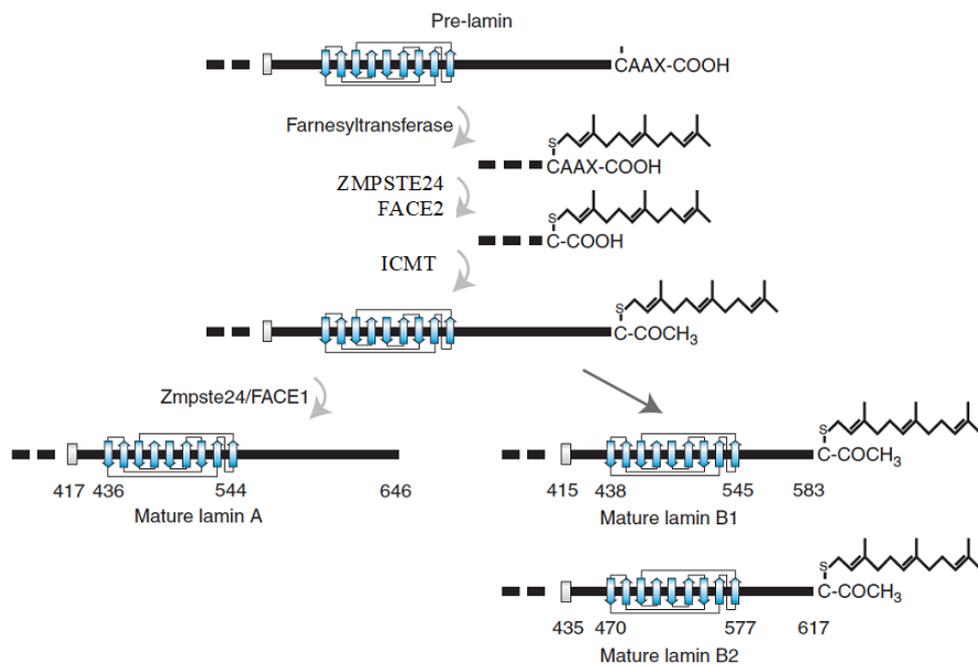


Figure 5 : Modifications post-traductionnelles de l'extrémité C-terminale des prélamines (Modifié à partir de (Dechat et al., 2010))

La lamine A est constituée de 646 acides aminés et possède un poids moléculaire de 70 kDa, alors que celui de la lamine C est de 65 kDa (572 acides aminés). La structure de la lamine C est très proche de celle de la lamine A (Figure 6) puisque les 566 premiers résidus sont communs (ses 6 derniers acides aminés C-terminaux spécifiques proviennent de l'épissage alternatif).

Les lamines B1 et B2 ont un poids moléculaire de 67 et 68 kDa respectivement (Broers et al., 2006).

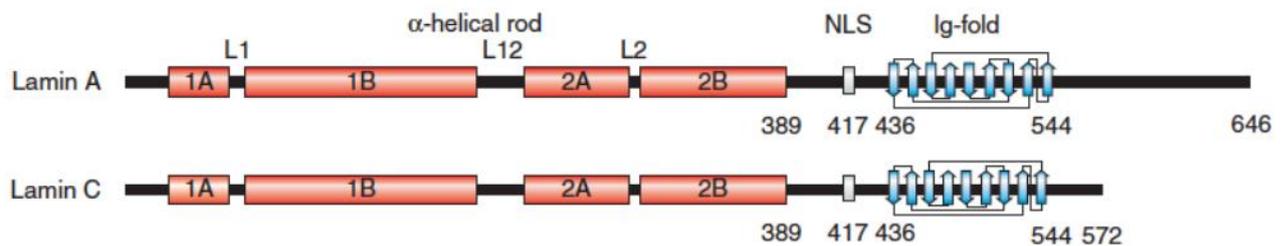


Figure 6 : Représentation schématique de la lamine A et de la lamine C (Dechat et al., 2010)

1. d) Localisation

Dans une cellule, l'enveloppe nucléaire permet de délimiter un volume, le **nucléoplasme**, qui renferme la presque totalité de l'information génétique des cellules eucaryotes. Le nucléoplasme est un espace compartimenté contenant : la chromatine (hétérochromatine et euchromatine), un ou des nucléoles (site(s) de transcription de certains ARN ribosomiaux), la matrice nucléaire et d'autres compartiments impliqués dans diverses fonctions (réplication de l'ADN, maturation des ARNm...).

La matrice nucléaire ou nucléosquelette correspond à l'ensemble du matériel restant dans le nucléoplasme après action de divers traitements (DNase, détergents, tampons concentrés...) enlevant une grande partie de l'ADN, les ARNs de grande taille et les protéines solubles qui sont associées à l'ADN et aux ARNs. La matrice nucléaire comporte : les lamines nucléaires, des constituants fibreux autres (par exemple : des protéines NuMA (*Nuclear Mitotic Apparatus*)) ; des protéines situées sur la face nucléoplasmique des pores nucléaires) et des molécules « insolubles » (Cau and Seite, 2012).

Les lamines nucléaires sont soit ancrées à l'EN au niveau de sa face nucléoplasmique, formant la *lamina* (structure filamenteuse dense), soit dispersées dans le reste du nucléoplasme (sans être en relation directe avec l'enveloppe nucléaire) (Stuurman et al., 1998).

La *lamina* est une condensation de lamines au contact de la face nucléoplasmique de l'EN. Elle contient les 3 catégories de lamines : les lamines B, ancrées par leur groupement farnésyl au feuillet de la face nucléoplasmique de l'EN ; les lamines A et C, solubles, qui interagissent entre elles et avec les lamines B. La *lamina* contient également le domaine nucléoplasmique de protéines transmembranaires de l'EN qui agissent comme les récepteurs pour les lamines (*Lamin Binding Protein*), mais aussi pour les histones, l'ADN...

Le reste du nucléoplasme contient aussi des lamines A et C, mais pas de lamines B dont la localisation est limitée à la *lamina* en raison de leur ancrage à l'EN *via* leur groupement farnésyl (Cau and Seïte, 2012).

1. e) Rôles

Les lamines sont des constituants de la matrice nucléaire qui, en interagissant directement ou indirectement avec d'autres protéines, participent à l'architecture de l'enveloppe nucléaire, à l'organisation des pores nucléaires, à celle de la chromatine, et au niveau fonctionnel, aux processus de réplication et de réparation de l'ADN, de transcription et de régulation de l'expression des gènes (mécanismes épigénétiques).

Ainsi, la *lamina* peut interagir avec la chromatine, avec des facteurs régulant la transcription de gènes, avec des protéines du cytosquelette, mais également avec des protéines des voies de signalisation (Figure 7). Ces nombreuses interactions lui confèrent différents rôles majeurs au sein de la cellule eucaryote.

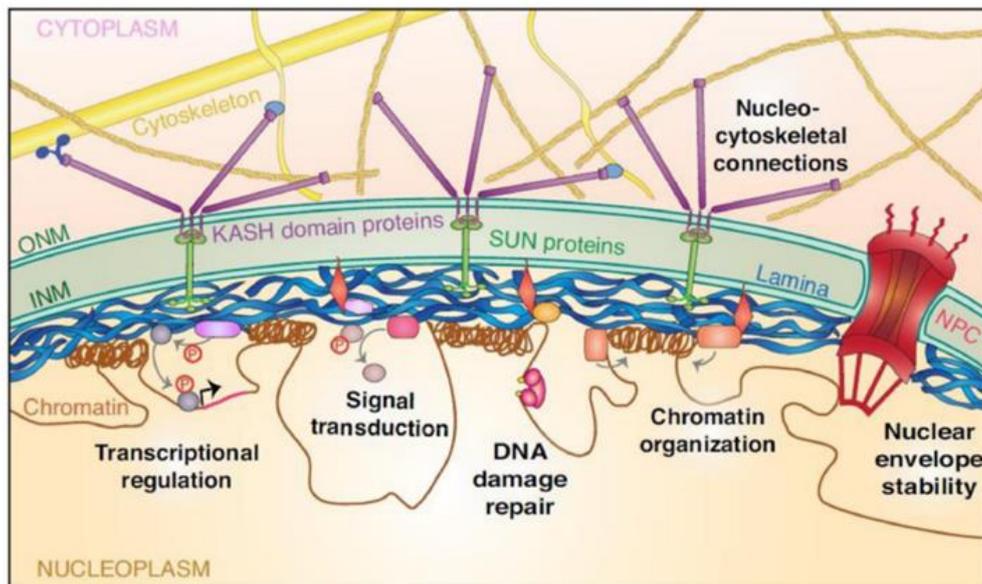


Figure 7 : Représentation schématique des rôles physiologiques de la lamina nucléaire (Bell and Lammerding, 2016)

e . i) Les lamines, architectes du noyau cellulaire

La *lamina* nucléaire est impliquée dans la morphologie (forme, taille) et la rigidité du noyau ainsi que dans la mécano-transduction intra-nucléaire. Des études sur des fibroblastes embryonnaires de souris (MEFs pour *Mouse Embryonic Fibroblasts*) « knockout »

homozygotes pour le gène *Lmna* (MEF^{*Lmna*^{-/-}}) ont montré une altération de la forme des noyaux, ainsi qu'une diminution de leur rigidité (Broers et al., 2004; Guo et al., 2014; Prokocimer et al., 2009). Des MEFs de génotype *Lmna*^{LCO/LCO} (LCO pour *Lamin C-Only*), n'exprimant pas la lamine A mais exprimant la lamine C, présentent des anomalies mineures de forme et de rigidité nucléaires. Des MEFs de génotype *Lmb1*^{A/A}, n'exprimant pas la lamine B1, présentent seulement une altération de la forme du noyau (Lammerding et al., 2006; Prokocimer et al., 2009). Des altérations au niveau des interactions entre le nucléosquelette et le cytosquelette peuvent induire des changements dans les propriétés mécaniques du noyau et ainsi altérer le fonctionnement de la cellule. En effet, Corne *et al.*, montrent que l'inhibition des lamines de type A par un siRNA (*small interfering RNA*: petit ARN pouvant se lier à une séquence d'ARNm et empêcher l'expression génique par clivage de cet ARNm) dans des fibroblastes dermiques humains induit notamment une altération de l'expression de protéines impliquées dans l'organisation du cytosquelette en particulier celles jouant un rôle dans l'adhérence focale (par exemple ACTR2/3 pour *Actin-related protein 2/3*, FSCN1 pour *Fascin actin-bundling protein 1*). La perte des lamines A et C diminue les zones d'adhérence focale, la capacité d'adhérence et augmente la mobilité cellulaire et les forces de tension cytosquelettique (Corne et al., 2017).

Au cours de la mitose, les lamines sont phosphorylées par diverses protéines dont le complexe Cycline B/CDK1 (phase M du cycle cellulaire). Cette phosphorylation permet une dépolymérisation du réseau de lamines et facilite ainsi la fragmentation de l'enveloppe nucléaire lors de la prophase. Puis, en fin de mitose, le réseau des lamines se reconstitue afin de recréer la *lamina* dans le noyau des 2 cellules filles nouvellement formées (Peter et al., 1990). Au cours de la cytokinèse, les lamines B interviennent dans la formation de l'anneau contractile (Burke and Stewart, 2013).

Les lamines interagissent avec des régions de l'hétérochromatine appelées LADs (*Lamina-Associated Domains*) (Naetar et al., 2017; van Steensel and Belmont, 2017) *via* des protéines intermédiaires (ou LBP pour *Lamin-Binding Protein*). Par exemple, LBR (*Lamin B Receptor*) est une protéine transmembranaire de la face nucléoplasmique de l'enveloppe nucléaire qui interagit avec la lamine B, l'ADN et la HP1 (*Human Heterochromatin Protein 1*); LAP2 α (*Lamina-Associated Polypeptide 2*) et LAP2 β interagissent avec la chromatine ainsi qu'avec les lamines de type A et les lamines de type B, respectivement (Dechat et al., 2008). Parmi les nombreuses fonctions induites par ces interactions, on peut citer celle permettant le positionnement de l'hétérochromatine au niveau de la périphérie du noyau (Vigouroux et al., 2004) avec par exemple l'interaction des lamines A avec ING1 (*Inhibitor-of-Growth-protein1*),

un régulateur épigénétique, qui est réduite dans les cellules HGPS pouvant expliquer, en partie, la perte de chromatine périphérique dans les cellules HGPS. Cette interaction lamines/LADS pourrait réguler des protéines et des enzymes agissant sur le remodelage de la chromatine et contribuer ainsi à la localisation de la chromatine en périphérie du noyau (Prokocimer et al., 2013).

Le réseau de lamines nucléaires participe également au positionnement des chromosomes au sein du noyau. Par exemple, dans les noyaux de fibroblastes dermiques d'individus sains, les chromosomes 13 et 18 sont localisés en périphérie du noyau alors que dans les cellules issues de patients atteints de laminopathies (avec mutations dans le gène *LMNA* ou bien dans celui de l'émerine), ces chromosomes se retrouvent localisés vers l'intérieur du noyau (Dechat et al., 2008).

Les lamines, en plus de former un cadre structural pour le nucléoplasme, jouent un rôle important dans la régulation épigénétique, dans la réplication et la réparation de l'ADN, dans la transcription de gènes (Robin and Magdinier, 2016), ainsi que dans la modulation des voies de signalisation cellulaire.

e . ii) Les lamines, supports des fonctions nucléaires

Comme vu précédemment, les lamines nucléaires interagissaient avec les LADs. Ces domaines d'hétérochromatine sont associés à une **activité transcriptionnelle** réduite, avec enrichissement en histones ayant une activité répressive sur la transcription des gènes (H3K9me2, H3K9me3 et H3K27me3), ainsi qu'à des régions dépourvues de gènes (Naetar et al., 2017; van Steensel and Belmont, 2017). Une altération des lamines peut induire une réorganisation de l'hétérochromatine et, par conséquent, une modification de l'activité transcriptionnelle des gènes associés (Burke and Stewart, 2013). Dans les cellules de patients atteints de Progeria (pathologie induite par une mutation du gène *LMNA* - traitée dans la partie A.2.a), une modification de l'organisation de la chromatine périphérique est décrite et est liée à des variations de plusieurs marqueurs de l'hétérochromatine (Sujet détaillé dans la partie A.2.a.ii) (H3K9me3, H4K20me3, H3K27me3, HP1 α) (Dechat et al., 2008). Par ailleurs, certains facteurs de transcription sont préférentiellement localisés au niveau de la *lamina* nucléaire. Par exemple, le facteur de transcription Oct-1^a est lié à la lamine B. Lors de l'entrée en sénescence de la cellule, Oct-1 se dissocie de la lamine B et n'exerce plus son activité

^a Oct-1 est un facteur de transcription qui réprime la collagénase.

répressive sur ses gènes cibles (Gruenbaum et al., 2003). Ainsi, une perturbation dans l'organisation ou l'expression de la lamine B pourrait modifier la transcription de gènes ciblés par des facteurs de transcription en lien avec les protéines lamines. Les lamines de type A participent à la régulation de l'activité de la pRb (protéine du Rétinoblastome) *via* une protéine partenaire : LAP2- α (*Lamina-Associated polypeptide 2 alpha*) (Dechat et al., 2008). La pRb est une protéine qui se lie au facteur de transcription E2F et qui le régule négativement. Le facteur de transcription E2F est fortement impliqué dans la prolifération des cellules, en particulier au cours de la phase G₁ du cycle cellulaire (décrit plus loin). Par exemple, dans des fibroblastes humains, une sous-expression des lamines A/C ou de LAP2- α peut induire un arrêt du cycle cellulaire en phase G₁ (Dechat et al., 2008).

Les pores nucléaires font partie des complexes protéiques membranaires avec lesquelles les lamines de type A et B peuvent se lier et participer aux **échanges nucléo-cytoplasmiques** (Busch et al., 2009; Maeshima et al., 2006). Dans des fibroblastes humains de patients atteints de Progeria, une altération dans le gradient de concentration de la protéine Ran, régulant le transport d'ARNs et de protéines entre ces 2 compartiments, a été décrite. Cette anomalie conduit à une perturbation dans les échanges de protéines impliquées dans des mécanismes cellulaires importants, comme par exemple la réparation de l'ADN *via* les protéines ATR et ATM (décrites plus loin) (Dworak et al., 2019; Kelley et al., 2011).

Au début de la phase de **réplication de l'ADN**, les lamines A et C forment des foci où se localisent les protéines impliquées dans l'initiation de la réplication telles que la PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) (Musich and Zou, 2009) et l'ADN polymérase δ (Wheaton et al., 2017). Ainsi, une altération de l'organisation des lamines de type A pourrait avoir un impact sur le phénomène de réplication de l'ADN et induire une instabilité génomique dans les cellules. Il a été montré que l'injection de lamine A humaine dépourvue de son extrémité N-terminale dans des extraits d'œufs de *Xenopus* (grenouille africaine), induisait une importante inhibition (plus de 90 %) de la synthèse d'ADN, ainsi qu'une perturbation de l'organisation de facteurs impliqués dans l'étape d'élongation : RFC (*Replication Factor C*) et PCNA. Ces derniers sont des cofacteurs de l'ADN polymérase δ , enzyme responsable de la synthèse de l'ADN lors de l'étape d'élongation. A l'inverse, des facteurs impliqués dans l'initiation de la synthèse d'ADN ne semblent pas perturbés (Moir et al., 2000).

Les lamines jouent également un rôle dans la **réparation de l'ADN**. En effet, dans des MEFs *Zmpste24*^{-/-}, Liu *et al.*, décrivent une augmentation des dommages à l'ADN, une sensibilité accrue aux agents endommageant l'ADN, des aberrations chromosomiques. Le

recrutement de protéines impliquées dans la réparation de l'ADN (53BP1 pour *p53-binding protein 1* et Rad51) est également altéré dans ces MEFs et dans des fibroblastes dermiques humains de patients atteints de Progeria (Liu et al., 2005).

A . 2) Laminopathies d'origine génétique

Les laminopathies rassemblent les pathologies causées par une anomalie des lamines ou de leurs partenaires. Des mutations dans le gène *LMNA* ont été associées à plusieurs phénotypes très hétérogènes, comme par exemple des dystrophies musculaires, des cardiopathies, des lipodystrophies, des neuropathies périphériques, des syndromes de vieillissement prématuré...

On distingue classiquement 2 groupes de laminopathies selon le(s) tissu(s) touché(s) : systémiques (touchant de nombreux tissus) ou tissu-spécifiques (un seul tissu atteint).

Nous détaillerons, dans un premier temps, la Progeria de Hutchinson-Gilford, qui correspond à une laminopathie systémique d'origine génétique caractérisée par un vieillissement prématuré et accéléré chez les patients atteints.

Il sera abordé dans un second temps d'autres exemples de laminopathies systémiques ou tissu-spécifiques.

2 . a) Progeria de Hutchinson-Gilford

a . i) Historique et épidémiologie

La Progeria de Hutchinson-Gilford ou HGPS (pour *Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome*) a été décrite initialement par les Dr. Jonathan Hutchinson^a en 1886 et Dr. Hastings Gilford^b en 1897. Le premier observa chez un enfant âgé de 3,5 ans, une absence de cheveux ainsi qu'une atrophie cutanée et de ses appendices. En 1895, il reporta un second cas. H. Gilford s'intéressa à ces 2 mêmes patients en décrivant les symptômes d'un vieillissement précoce (DeBusk, 1972) (Hennekam, 2006).

La Progeria est une maladie génétique extrêmement rare : DeBusk^c rapporta 18 cas de HGPS sur 145 000 000 de naissances aux Etats-Unis de 1915 à 1967, soit une incidence de 1

^a Médecin anglais exerçant dans divers domaines tels que la dermatologie, la chirurgie, l'ophtalmologie ... (1828-1913)

^b Chirurgien anglais (1861-1941)

^c D^r Franklin Lafayette DeBusk (1923-2007) – médecin américain

cas pour 8 000 000 de nouveau-nés (Hennekam, 2006) (DeBusk, 1972). De 1900 à 2005, aux Pays-Bas, 5 nouveaux cas de HGPS sur 19 981 000 naissances ont été rapportés.

La prévalence de cette pathologie avoisine 1 cas pour 4-8 millions de nouveau-nés et on dénombre 162 cas d'enfants atteints de HGPS dans le monde en Juillet 2019 (Figure 8). En décembre 2017, 144 cas de patients atteints de Progeria avaient été décrits dans le monde.



Figure 8 : 162 cas de Progeria et syndromes apparentés décrits dans le monde (mise à jour en Juillet 2019) dont 125 enfants atteints de la forme classique de HGPS et 37 enfants atteints d'un syndrome progéroïde caractérisé par une absence de production de progérine (<https://www.progeriaresearch.org/>).

a . ii) Phénotype clinique

Le nom « Progeria », où les termes grecs « *pro* » et « *geras* » signifient respectivement « précoce » et « âge avancé », a été proposé par Gilford, car la Progeria correspond à un syndrome de vieillissement prématuré (Hennekam, 2006).

Les enfants atteints de la forme classique sont asymptomatiques à la naissance et développent progressivement des signes spécifiques de la maladie après quelques mois de vie (Figure 9) : retard de croissance staturo-pondéral sévère, alopecie, hypoplasie faciale, ostéoporose généralisée, atteinte dégénérative des cartilages et ostéolyse (les clavicules et les phalanges sont principalement touchées), lipotrophie générale progressive, aspect pseudo-sclérodermique de la peau... La plupart de ces signes cliniques rappellent ceux observés au cours du vieillissement physiologique chez des personnes âgées. Cependant, certains signes cliniques retrouvés chez des personnes âgées ne sont pas décrits chez les patients HGPS : cancers, altérations cognitives et maladie d'Alzheimer, cataracte (Strandgren et al., 2017).

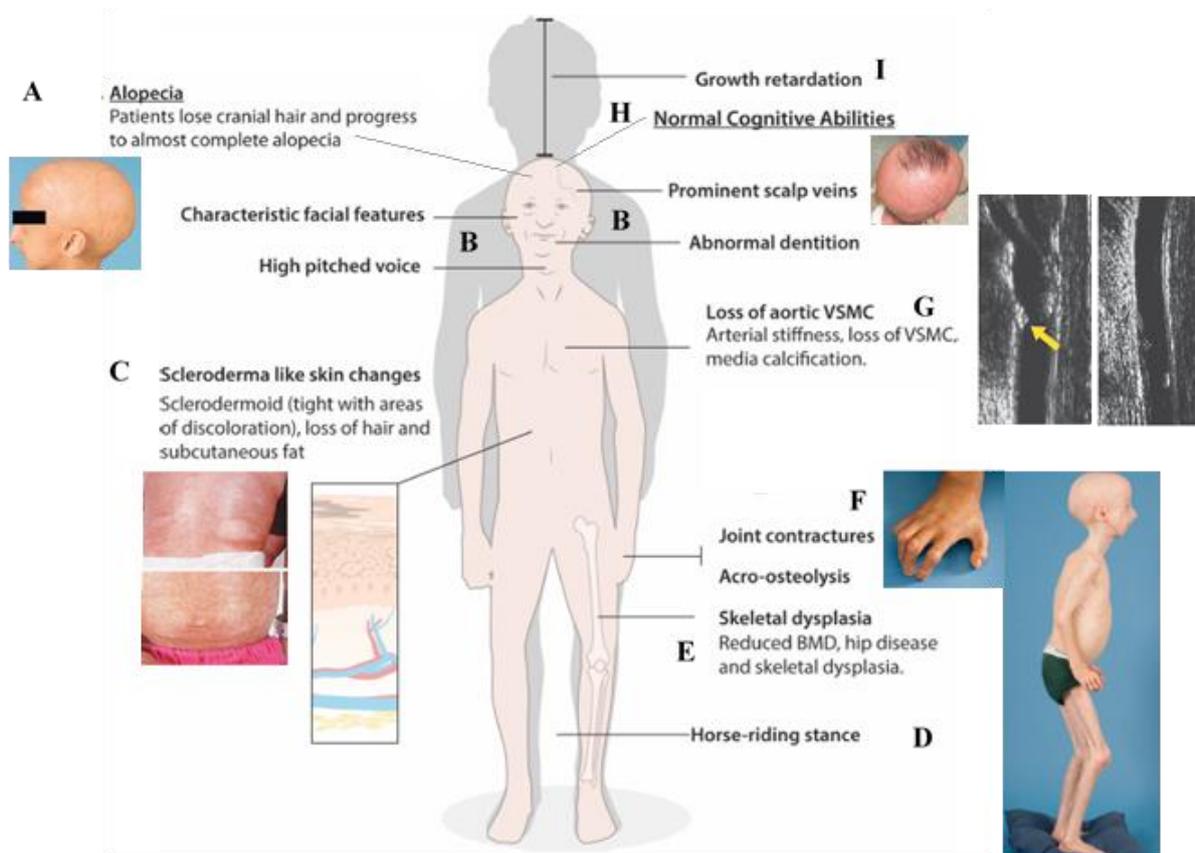


Figure 9 : Signes cliniques observés dans la Progeria de Hutchinson-Gilford **A) Alopecie** : les patients perdent leurs cheveux jusqu'à une alopecie presque complete ; **B) Caracteristiques faciales** : voix aigüe, veines du crane proeminentes, dentition anormale ; **C) Changements d'aspect de la peau** : sclerodermie (lésions sclereuses en forme de tâches serrées avec des zones de decoloration), perte de poils et de graisse sous-cutanée ; **D) Posture** : en position « d'équitation » ; **E) Dysplasie du squelette** : diminution de la densité minérale osseuse (DMO), atteintes de la hanche ; **F) Contractures articulaires, acro-ostéolyse** ; **G) Perte de Cellules Musculaires Lisses Vasculaires (VSMC) aortiques** : rigidité artérielle, calcification de la media artérielle ; **H) Capacités cognitives normales** ; **I) Retard de croissance** (Modifié à partir de Gonzalo et al., 2017; Strandgren et al., 2017; Ullrich and Gordon, 2015).

L'espérance de vie des patients atteints de Progeria est estimée à 14,6 ans (Hennekam, 2006). Le décès des patients survient généralement par infarctus du myocarde lié à des complications cardiovasculaires : plaques d'athérome localisées dans des vaisseaux de gros diamètre (aorte, carotides, coronaires), calcifications des valves cardiaques, fibrose du myocarde, hypertension artérielle, insuffisance cardiaque congestive...

Des troubles du métabolisme lipido-glucidique ont été également rapportés : insulino-résistance, diabète, diminution du taux de HDL (Vigouroux et al., 2004).

a . iii) Mutation génique et conséquences cellulaires

La Progeria de Hutchinson Gilford est causée, dans la grande majorité des cas, par une mutation *de novo* autosomique dominante (c.1824 C>T) dans le gène *LMNA* se traduisant *in silico* au niveau protéique par une mutation isosémantique : p.Gly608Gly. La substitution d'une cytosine par une thymidine dans l'exon 11 du gène *LMNA* entraîne en fait la création, au sein du transcrit primaire (pré-ARNm), d'un site d'épissage cryptique provoquant la perte de 150 nucléotides : l'ARNm obtenu est donc plus court (Figure 10) (Navarro et al., 2008). La protéine traduite à partir de cet ARNm, est tronquée de 50 acides aminés ($\Delta 606-656$) au niveau de la partie C-terminale de la protéine. Ces acides aminés perdus contiennent le site de clivage de l'enzyme ZMPSTE24 permettant, à la dernière étape de maturation de la prélamine A, d'éliminer le groupement farnésyl. Ainsi, la perte de cette séquence d'acides aminés dans la Progeria entraîne la production d'une prélamine A tronquée et farnésylée appelée « progérine » qui va demeurer ancrée à l'enveloppe nucléaire en raison de la persistance du groupement farnésyl. L'accumulation progressive de progérine au sein du noyau est responsable d'une toxicité cellulaire dose-dépendante (Burke and Stewart, 2013) induisant des altérations conséquentes, d'une part de l'architecture de l'enveloppe nucléaire, et d'autre part, des mécanismes cellulaires (Figure 11) (Strandgren et al., 2017).

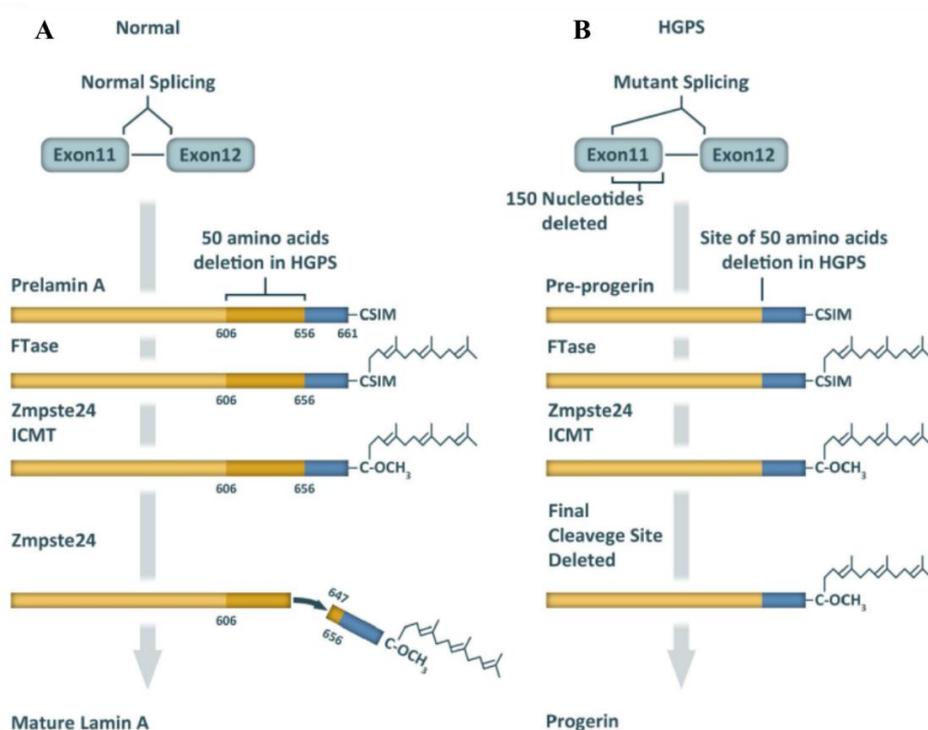


Figure 10 : Synthèse de la lamine A chez un individu normal (A) et Synthèse de la progérine chez un individu atteint de Progeria (B) (Gonzalo et al., 2017)

Des maladies extrêmement rares, comme la Progeria, peuvent être à l'origine de signes cliniques plus fréquemment retrouvés dans d'autres contextes physiologiques ou pathologiques et peuvent alors permettre d'étudier les processus cellulaires impliqués (Gordon et al., 2014). De manière intéressante, il a été démontré qu'il existait, en moindre quantité par rapport à des patients HGPS, de la progérine dans des cellules de sujets sains très âgés, d'environ 90 ans (Scaffidi, 2006). De même, il a été mis en évidence que le taux de progérine augmentait avec l'âge, à la fois dans les fibroblastes de patients HGPS et dans les fibroblastes de sujets sains (Strandgren et al., 2017). Ces observations mettent ainsi en évidence un lien moléculaire entre le vieillissement normal et pathologique de la Progeria.

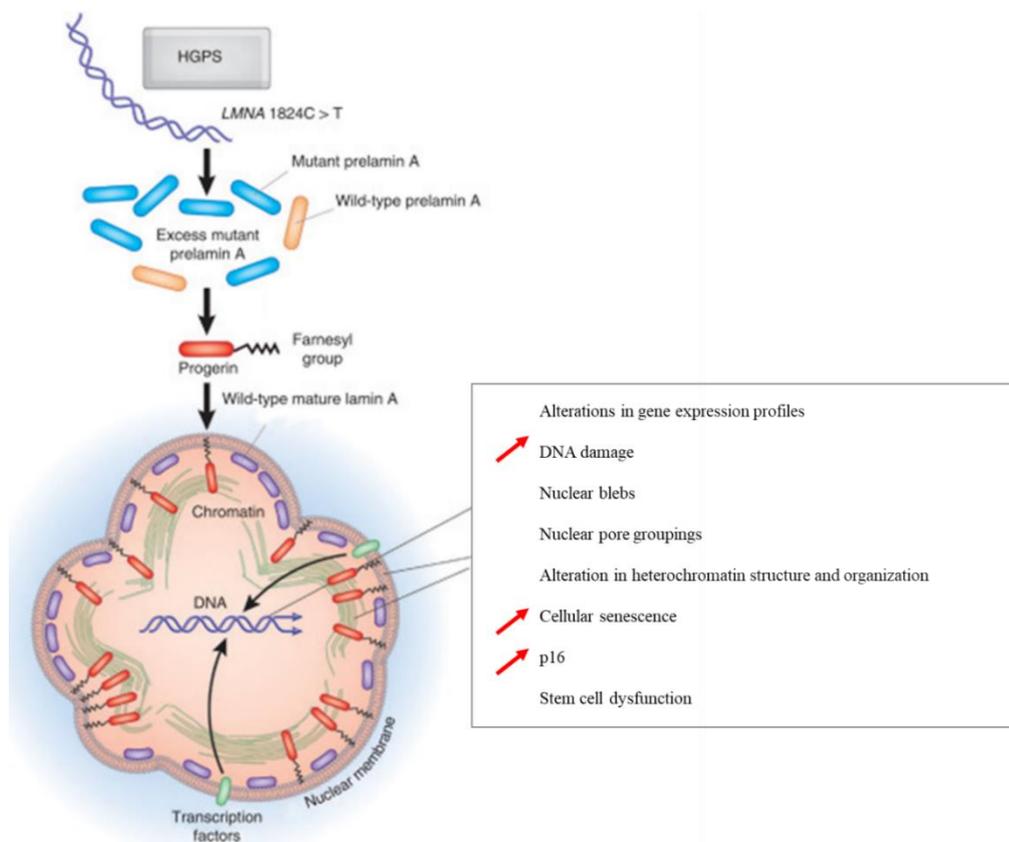


Figure 11 : Anomalies nucléaires induites par l'accumulation de progérine dans les cellules HGPS (Capell et al., 2009)

▪ **Conséquences cellulaires de l'accumulation nucléaire de progérine : Anomalies morphologiques**

La morphologie du noyau des fibroblastes de patients HGPS en culture *in vitro* se modifie au fur et à mesure des passages (Figure 12). En effet, il est progressivement détecté un épaississement de la *lamina* ainsi que des hernies ou "protubérances" (Goldman et al., 2004) donnant ainsi un aspect dysmorphique aux noyaux de ces cellules. Il est également observé une

"rigidité" de l'enveloppe nucléaire la rendant ainsi plus sensible aux évènements mécaniques (Gonzalo et al., 2017).

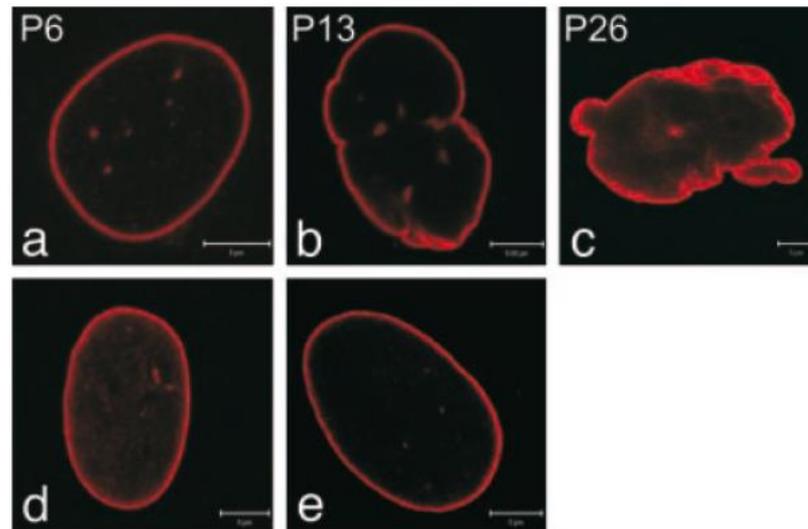


Figure 12 : Altérations morphologiques du noyau de fibroblastes de patients HGPS à différents passages P6, P13 et P26 (**a, b et c**) comparativement aux noyaux de **fibroblastes issus d'un individu sain âgé de 92 ans (d)** et issus **d'un prépuce d'un individu sain (e)**. Marquage anti-lamine A (Goldman et al., 2004)

De plus, au cours des passages, les fibroblastes de patients HGPS présentent progressivement une anomalie de la répartition des pores nucléaires (Figure 13). Leur distribution n'est plus uniforme comparée à celle des fibroblastes de témoins. Des zones dépourvues de pores nucléaires sont décrites dans les cellules HGPS (Figure 13 f) (Goldman et al., 2004).

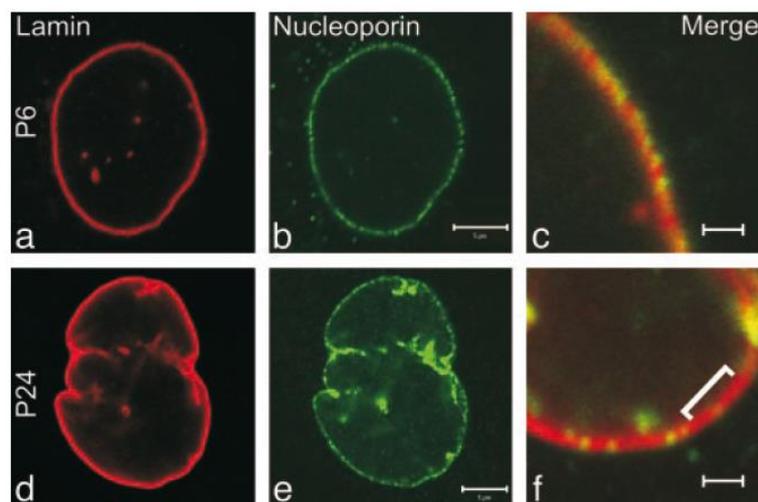


Figure 13 : Organisation de l'enveloppe nucléaire (anticorps anti-lamine A : a et d), répartition des pores nucléaires (anticorps anti-nucléoporine : b et e) dans des fibroblastes HGPS à P6 et P24 et superposition des deux marquages (c et f) (Goldman et al., 2004)

- **Conséquences cellulaires de l'accumulation nucléaire de progérine : Anomalies fonctionnelles**

- **Raccourcissement des télomères**

Les télomères sont des structures nucléoprotéiques protégeant les extrémités des chromosomes des phénomènes de dégradation et de fusion. Au cours du cycle cellulaire, les télomères se raccourcissent progressivement. A terme, lorsqu'ils atteignent une longueur critique (ou seuil critique), la division cellulaire s'arrête car, à ce stade, cette taille de télomères est considérée comme une cassure double-brin de l'ADN. Les fibroblastes HGPS présentent un phénotype dans lequel l'augmentation de la progérine est associée à une altération des télomères (anomalies de structure, de longueur et de fonction ; anomalie de distribution au niveau du noyau) (Prokocimer et al., 2013). Des études ont montré qu'il existait un lien entre quantité de progérine accumulée et la diminution de longueur des télomères : dans des fibroblastes humains sains, le raccourcissement progressif des télomères au cours de la sénescence cellulaire participe à l'activation de la production de progérine, et, de manière réciproque, l'expression de la progérine participe au raccourcissement des télomères (Cao et al., 2011a). Wood et al (2014) montrent que, dans les fibroblastes dermiques de patients HGPS, la protéine TRF2 (*Telomeric Repeat-binding Factor 2*) n'interagit plus avec les lamines A/C comparativement à des fibroblastes issus de poumons de sujets sains. Cette perte d'interaction causée par la présence de progérine dans les cellules HGPS participe à l'instabilité télomérique. En effet, la protéine TRF2 joue notamment un rôle dans le maintien de l'intégrité des télomères et la protection contre la fusion des chromosomes entre eux.

Par ailleurs, comme abordé ci-après, les télomères étant des régions enrichies en marques H3K9me3 et H4K20me3, des changements dans la méthylation des histones de ces télomères pourraient être, en partie, la cause du raccourcissement des télomères observés dans les cellules HGPS (Dechat et al., 2008).

- **Modifications épigénétiques**

L'hétérochromatine correspond à de la chromatine très condensée avec une moins bonne accessibilité de l'ADN et donc une expression génique quasiment inactive. Elle peut être divisée en deux types : constitutive et facultative. L'hétérochromatine constitutive est retrouvée au niveau de séquences répétées d'ADN, comme par exemple autour des centromères et des télomères et n'est pratiquement pas exprimée. L'hétérochromatine facultative apparaît lors de modifications intervenant au sein de la cellule et abrite en général des gènes

transcriptionnellement "éteints". L'expression et l'accumulation de progérine participent à la perte de l'hétérochromatine constitutive *via* des modifications au niveau des histones spécifiques de l'hétérochromatine et des protéines associées (comme par exemple HP1) (Arancio et al., 2014) (Carrero et al., 2016), en particulier, les histones H3K9me3, H4K20me3 et H3K27me3 qui ont une activité répressive de la transcription.

L'histone **H3K9me3** est un marqueur de l'hétérochromatine constitutive que l'on retrouve à la fois dans la zone péricentrique des chromosomes et au niveau des télomères. Cette marque est diminuée dans les cellules HGPS (Arancio et al., 2014), mais également dans des cellules issues d'individus sains âgés exprimant de la progérine (Dechat et al., 2008). La protéine HP1 α est l'un des composants de l'hétérochromatine péricentrique qui se lie à H3K9me3. HP1 α permet le maintien de cette hétérochromatine à activité transcriptionnelle réprimée (Zeng et al., 2010). Dans les cellules HGPS, l'altération de H3K9me3 est associée, d'une part à une diminution de l'interaction entre la *lamina* nucléaire et l'hétérochromatine, et d'autre part à celle entre HP1 α et H3K9me3.

L'histone **H4K20me3** est un autre marqueur de l'hétérochromatine constitutive que l'on retrouve au niveau des télomères des chromosomes (Arancio et al., 2014). Dans les cellules HGPS, une surexpression de cette marque est observée (Pal and Tyler, 2016), conduisant à un raccourcissement des télomères (Arancio et al., 2014).

Il est également observé une dérégulation négative de l'histone **H3K27me3** dans les fibroblastes dermiques humains HGPS. Cette histone est un marqueur de l'hétérochromatine facultative, qui, dans ces cellules HGPS est retrouvée sous-exprimée dans les régions pauvres en gènes et surexprimée dans les régions riches en gènes (McCord et al., 2013).

- **Anomalies de la réplication de l'ADN**

L'accumulation de progérine conduit à une perturbation de la structure nucléaire des cellules, ainsi que celle des foyers nucléoplasmiques de lamine A/C contenant des protéines impliquées dans la réplication de l'ADN, notamment le PCNA, l'ADN polymérase δ et le RCF (*Replication Factor C*). Une altération de la distribution de ces protéines pourrait conduire d'une part, à un arrêt de la progression de la fourche de réplication et d'autre part, induire la formation de dommages à l'ADN double-brin (Musich and Zou, 2009) (Figure 14). Ces derniers activent diverses protéines clefs dans la voie de signalisation des dommages à l'ADN comme par exemple ATR (*Ataxia Telangiectasia and Rad3-related*) et ATM (*Ataxia Telangiectasia-mutated*) (cf. paragraphe Anomalies de réparation de l'ADN), qui vont par la suite induire

l'activation d'une protéine suppresseur de tumeur, p53 (traitée plus loin), jouant un rôle dans le cycle cellulaire, la réparation de l'ADN, l'apoptose, les réponses cellulaires au stress.

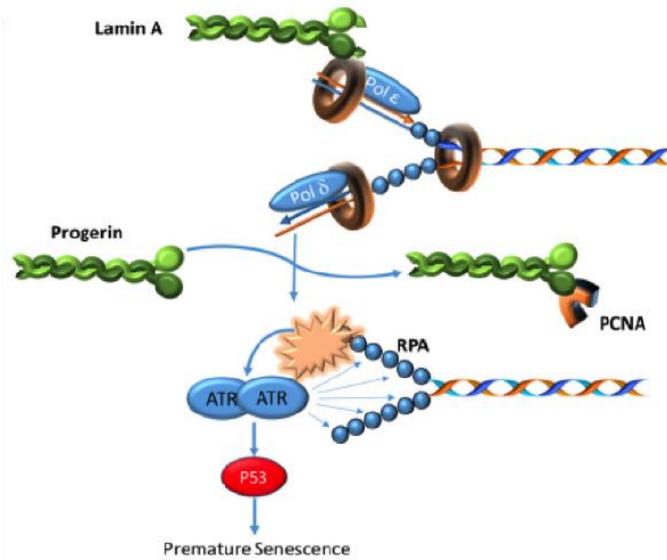


Figure 14 : L'accumulation de progérine conduit à la séquestration de PCNA loin des sites de réplication. La diminution de la progression de la fourche de réplication constitue un signal d'activation de p53 : la cellule entre en sénescence prématurément (Wheaton et al., 2017)

- **Anomalies de la transcription de l'ADN**

Dans les cellules HGPS, le processus de transcription est altéré en lien notamment avec des anomalies d'expression ou de localisation de facteurs de transcription (Tableau 1).

TFs	Known status in HGPS	Resultant cellular characteristics	Proposed related clinical characteristics
pRb	Dysfunction	Genomic instability: mitotic defects, chromosomal mis-segregation HC disorganization histone modifications Increased apoptosis (via E2F1,E2F3) Impaired osteogenesis Impaired adipogenesis Increased fibrosis	Premature aging Cancer rarity Bone abnormalities Lipodystrophy Fibrosis: skin, blood vessels Premature aging
ING1	Aberrant cytoplasmic sequestration Reduced nuclear levels	HC disorganization and loss of peripheral HC Compromised DNA repair	Premature aging
SREBP1	Altered localization Impaired PPAR γ signaling	Impaired adipogenesis	Lipodystrophy CVD – PPAR γ related
Notch	Altered pathway activation	Stem cell exhaustion Mesenchymal stem cells dys: impaired adipogenesis impaired osteogenesis	Premature aging Lipodystrophy bone abnormalities
NF κ B	Altered response to mechanical strain (in LA-deficient cells)	VSMCs pathology Increased mechanosensitivity Increased apoptosis /necrosis VSMCs pathology	Vasculopathy, CVD atherosclerosis Premature aging atherosclerosis Vasculopathy, CVD, atherosclerosis
Wnt- β -catenin	Down-regulated Altered LEF1 localization & activity	Stem cells exhaustion Mesenchymal stem cells dys: impaired adipogenesis impaired osteogenesis Defective ECM	Premature aging Lipodystrophy bone abnormalities
Prx1	Preferential progerin binding Down-regulated interaction with Tenascin-C	Decreased tumorigenesis Defective ECM Altered skeletogenesis VSMCs pathology	Premature aging Skin abnormalities Abnormal dentition Vasculopathy Cancer rarity See above: in Wnt Bone abnormalities
MEOX2/GAX	Up-regulated	VSMCs pathology	Vasculopathy, CVD, atherosclerosis
TWIST 2	Down-regulated	Impaired osteogenesis	Vasculopathy, CVD, atherosclerosis Bone abnormalities

CVD, cardiovascular disease; ECM, extra cellular matrix; HC, heterochromatin; HGPS, Hutchinson–Gilford progeria syndrome; ING1, inhibitor-of-growth-protein1; VSMCs, vascular smooth muscle cells.

Tableau 1 : Exemples de facteurs de transcription (TFs) dont la régulation est altérée dans la Progeria (Prokocimer et al., 2013)

○ **Anomalies de réparation de l'ADN**

Les fibroblastes HGPS présentent, à l'état basal, une accumulation de foyers contenant l'histone γ H2AX (marqueur de lésion de l'ADN non réparé) associés à une activation persistante de kinases impliquées dans les DDR (*DNA Damage Response* ou Réponses aux Dommages de l'ADN), telles que : ATM, ATR et Chk1 (voir plus loin). De plus, les cellules HGPS sont particulièrement sensibles à des dommages de l'ADN induits par des ROS (*Reactive Oxygen Species*) ou par des radiations ionisantes, et présentent une capacité de réparation de l'ADN sévèrement réduite (Carrero et al., 2016). Les mécanismes de réparation de l'ADN sont complexes faisant notamment appel au recrutement de nombreux facteurs protéiques de réparation au niveau des sites de lésions de l'ADN. Dans les cellules HGPS, une modification de l'expression et du recrutement de ces protéines altèrent deux mécanismes majeurs de réparation de l'ADN double-brin : HR (*Homologous Repair* pour Recombinaison Homologue) et NHEJ (*Non-Homologous End Joining* pour Jonction d'extrémités non homologues) induisant

une activation des points de contrôle du cycle cellulaire (voir plus loin) et un arrêt de la prolifération (Gonzalo and Kreienkamp, 2015) (Figure 15).

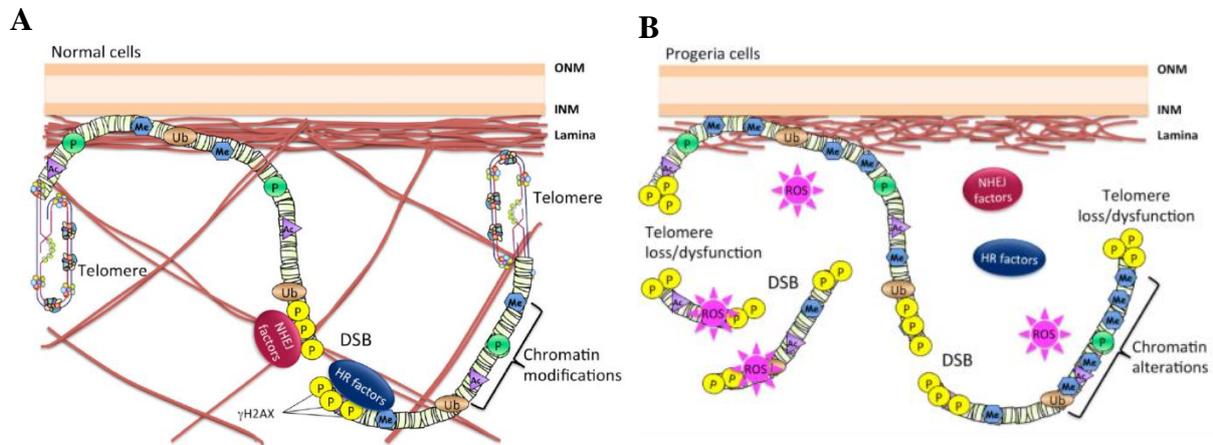


Figure 15 : Altération des mécanismes de réparation des dommages de l'ADN dans les cellules HGPS. A) Dans les cellules d'individus sains, les télomères sont longs, fonctionnels et des facteurs de réparation (NHEJ factors et HR factors) sont recrutés au niveau des sites de cassures de l'ADN double-brin (DSB pour *Double-Strand Breaks*). **B)** Dans les cellules HGPS, les télomères sont raccourcis et les facteurs de réparation ne sont plus recrutés de manière efficace. Les ROS s'accumulent dans les cellules HGPS et endommagent l'ADN (**Gonzalo and Kreienkamp, 2015**)

Une étude menée sur des fibroblastes humains HGPS, a montré que l'expression de γ H2AX était augmentée après un traitement induisant la production de ROS : le H₂O₂ (peroxyde d'hydrogène). Cette étude montre qu'un pré-traitement par un anti-oxydant qui empêche la production de ROS en présence de H₂O₂, la N-Acétyl-Cystéine ou NAC, induit une diminution de ces foyers contenant l'histone γ H2AX et semble empêcher leur accumulation. Cette étude suggère également que l'accumulation de γ H2AX dans les fibroblastes HGPS participe à la diminution de la prolifération de ces cellules (Richards et al., 2011).

o Anomalies de voies de signalisation

Parmi les voies de signalisation altérées dans les cellules HGPS, nous pouvons citer par exemple : **la voie ERK-MAPK** (survie, prolifération, différenciation...) ; **la voie Wnt/ β -caténine** (prolifération, survie, différenciation, angiogenèse, migration...) ; **la voie NF- κ B^a** (inflammation, cycle cellulaire, sénescence, stress oxydant...) ; la voie mettant en jeu **le facteur de transcription NRF2** (résistance au stress oxydant).

^a Facteur de transcription dimérique généré à partir des protéines : Rel (p-Rel), p65 (RelA), RelB, p50/p105 (NFKB1) et p52/p100 (NFKB2). Les homodimères de p50 et les hétérodimères contenant RelB sont associés à une inhibition de la transcription génique (Oakley et al., 2005)

Des études ont montré que le vieillissement physiologique de fibroblastes de sujets sains et le vieillissement prématuré de fibroblastes de patients HGPS impliquaient des voies de signalisation similaires. Par exemple, dans des fibroblastes de sujets sains âgés de plus de 60 ans, il est décrit une diminution de l'expression de l'EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*), un récepteur à activité tyrosine kinase impliqué dans la voie des MAPKinases, comparativement à des fibroblastes de sujets sains jeunes (15-30 ans). Ce profil d'expression est comparable dans les fibroblastes HGPS. De même, dans les fibroblastes de sujets sains âgés et de patients HGPS, il est décrit une **activation de la voie ERK**, ainsi qu'une **activation** d'une protéine intervenant dans la voie MAPK, la protéine **p38** (Aliper et al., 2015).

Plusieurs études menées sur le modèle murin *Zmpste24*^{-/-} (accumulation de prélamine A farnésylée secondaire à l'absence de clivage par *Zmpste24* – voir plus loin) ont montré une altération de la voie Wnt canonique. Espada *et al.*, montrent que dans les cellules épidermiques de ce modèle, une **diminution intracellulaire de la forme active de la β -caténine (Act- β -caténine)** est associée à celle de la Cycline D1 (une des cibles directes) (Espada et al., 2008). La β -caténine est le principal acteur de la voie Wnt canonique : elle agit comme un co-activateur transcriptionnel. De manière très schématique, en l'absence de Wnt, la β -caténine est dégradée dans le cytoplasme par le protéasome. À l'inverse, en présence de Wnt, sa dégradation est inhibée : elle s'accumule dans le cytoplasme et est importée dans le noyau dans lequel elle va participer à la transcription de gènes cibles (Clevers, 2006). Au cours de la 4^{ème} et dernière étape de la différenciation ostéogénique, Choi *et al.*, montrent que des cellules progénitrices dérivées d'iPSC HGPS présentent une diminution du rapport entre la forme active de la β -caténine nucléaire et cytoplasmique. Cette étude montre également que l'étape de farnésylation de la progérine est impliquée dans la diminution de la β -caténine : au bout d'une semaine de différenciation ostéogénique, des hBM-MSCs (*human Bone Marrow-MSCs*), exprimant une progérine ne pouvant pas être farnésylée^a, présentent une accumulation de la β -caténine active comparativement à des hBM-MSCs exprimant de la progérine (Choi et al., 2018).

L'étude de 2 modèles murins (*Zmpste24*^{-/-} et *Lmna*^{G606G/G609G} – voir plus loin) a montré par ailleurs que l'accumulation de prélamine A farnésylée et de progérine, respectivement, induisait une **hyperactivation de la voie NF- κ B** (augmentation de NF- κ B, diminution du facteur inhibiteur de NF- κ B : I κ B α) qui est dépendante des protéines ATM (augmentation de la forme phosphorylée active de la protéine ATM) et NEMO (*NF- κ B Essential Modulator* : sous-unité régulatrice qui permet la libération de I κ B α) (accumulation dans le noyau) (Figure 16)

^a Mutation induisant le remplacement du résidu cystéine du motif C-terminal en sérine

(Osorio et al., 2012). Le facteur NF- κ B régule de très nombreux gènes notamment ceux liés à l'inflammation (interleukines, chimiokines, cytokines, molécules d'adhérence...). L'altération de son expression est impliquée dans la sénescence cellulaire. Par exemple, des souris *NFKB1*^{-a} présentent une inflammation systémique chronique (grossissement de la rate, taux d'Il-6 plasmatique élevé, infiltration hépatique de cellules immunitaires) progressant avec l'âge et qui est associée à un vieillissement prématuré (perte de poids, hypertrophie cardiaque, perte de tissu adipeux sous-cutané, taux de décès précoce plus élevé...) (Jurk et al., 2014). On parle d'inflamma'aging (notion développée page 82).

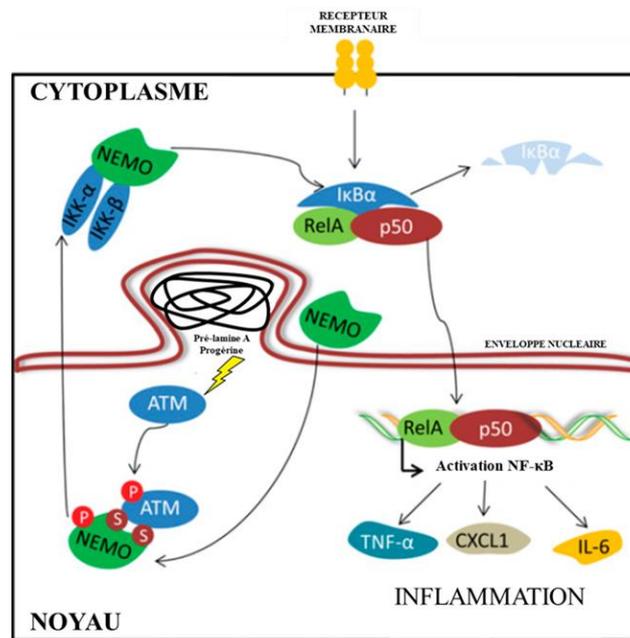


Figure 16 : Modèle d'activation de NF- κ B par l'intermédiaire d'ATM et NEMO lors de l'accumulation de prélimine A farnésylée ou de progérine (Modifié à partir de (Osorio et al., 2012))

Enfin, des études menées sur des fibroblastes WT et HGPS ont montré que la protéine **NRF2** (*Nuclear Factor Erythroid 2 (NFE2) - Related Factor 2*) était délocalisée au niveau de la périphérie des noyaux des fibroblastes HGPS. Dans ces cellules, la progérine séquestre NRF2 et empêche ainsi son activité de transcription de gènes impliqués notamment dans la protection contre le stress oxydant (Figure 17). L'inhibition de ce facteur de transcription par un siRNA (*Small Interfering RNA*) induit, dans les fibroblastes HGPS, une aggravation des anomalies moléculaires avec par exemple : une augmentation des foci γ H2AX et une diminution de HP1 γ et de H3K27me3. De même, il a été montré que la restauration de la voie impliquant NRF2^b

^a Souris dépourvues de p105 et p50

^b La voie NRF2 a été restaurée à l'aide de caNRF2 (pour *Constitutively Activated NRF2*).

dans les fibroblastes HGPS, induisait une diminution des anomalies moléculaires : augmentation de HP1 γ et H3K27me3 et diminution des foci γ H2AX (Kubben et al., 2016).

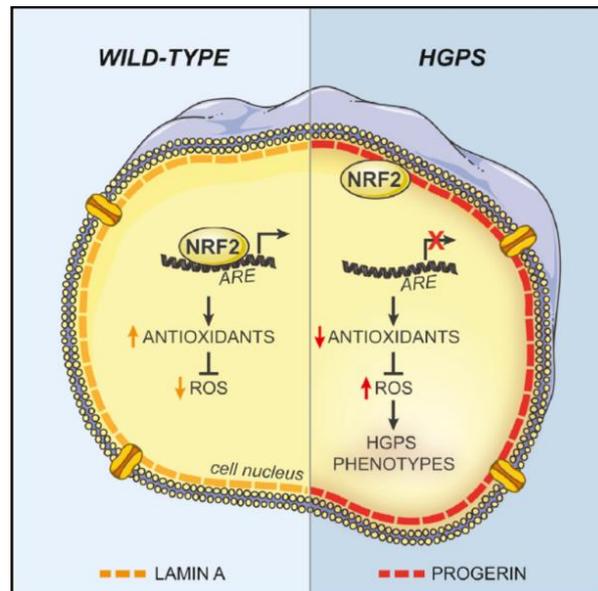


Figure 17 : Dans les cellules HGPS, la progerine séquestre la protéine NRF2 en périphérie du noyau : la progerine altère l'activité transcriptionnelle de NRF2 (Kubben et al., 2016).

○ Dysfonctionnement mitochondrial

Des expériences menées sur des fibroblastes dermiques de témoins et de patients HGPS, appariés en âge, ont révélé un dysfonctionnement mitochondrial dans les cellules HGPS illustré par une diminution de l'expression de composants de la chaîne respiratoire^a, une diminution de la synthèse d'ATP et une diminution de l'activité de phosphorylation oxydative mitochondriale (OXPHOS pour *OXYdative PHOSphorylation*)^b. La diminution de l'activité OXPHOS mitochondriale est également retrouvée au sein de fibroblastes immortalisés issus de souris homozygotes *Lmna*^{G609G/G609G} (exemple de modèle murin HGPS produisant de la progerine, voir plus loin) comparativement à des fibroblastes de souris sauvages (WT). De plus, ces fibroblastes du modèle murin HGPS présentent une diminution de la synthèse mitochondriale d'ATP. Des études menées sur le tissu cardiaque de souris WT, homozygotes *Lmna*^{G609G/G609G} et hétérozygotes *Lmna*^{G609G/+} ont révélé que la progerine avait un effet temps- et dose-dépendant sur l'activité OXPHOS. L'effet dose-dépendant de la progerine sur cette dernière est également démontré dans le muscle squelettique issu de souris WT, homozygotes *Zmpste24*^{-/-} et

^a Par exemple, le cytochrome c (retrouvé dans l'espace intermembranaire mitochondrial) et la sous-unité I du complexe cytochrome c oxydase IV (COXI) (retrouvée dans la membrane interne de la mitochondrie).

^b Activité évaluée grâce au ratio de 2 enzymes : COX (Cytochrome c oxydase) / CS (Citrate Synthase). La CS est utilisée afin de normaliser la COX. Ce ratio permet d'évaluer de manière globale l'activité de la chaîne respiratoire.

homozygotes *Lmna*^{G609G/G609G}. A l'inverse, dans le cerveau de ces mêmes souris, il n'y a pas de différence significative de l'activité OXPHOS mitochondriale (Rivera-Torres et al., 2013).

Le dysfonctionnement de l'activité mitochondriale dans les cellules de modèles murins HGPS décrit ci-dessus, a de nombreuses conséquences cellulaires, dont la production anormale de ROS.

Les ROS sont des molécules oxydantes produites par les cellules aérobies pouvant participer à des voies de signalisation cellulaire et pouvant, si elles sont produites en excès, endommager des macromolécules comme l'ADN (cassure), les protéines (oxydation), les lipides (peroxydation)... (Figure 18). Les cellules ont normalement la capacité de réguler et de maintenir à des taux physiologiques les ROS *via* de multiples mécanismes. Une altération d'un ou plusieurs mécanismes peut induire un rupture de cet équilibre en faveur d'une augmentation de la production de ROS (Mittler, 2017), entraînant un stress oxydant, toxique pour la cellule, pouvant aboutir à l'entrée en sénescence cellulaire prématurée.

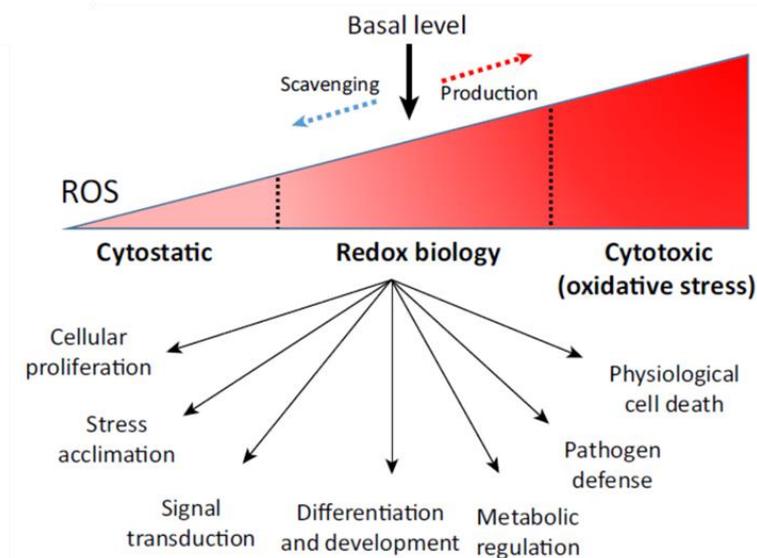


Figure 18 : Exemples de rôles des ROS dans les mécanismes cellulaires en fonction de leur taux (Modifié à partir de (Mittler, 2017))

Richards *et al.*, ont montré que des fibroblastes dermiques HGPS avaient un taux basal de ROS plus élevé ainsi qu'une prolifération cellulaire basale diminuée comparativement aux fibroblastes sains. Il est également décrit qu'après un traitement par H₂O₂, les fibroblastes HGPS produisaient une quantité plus élevée de ROS et avaient une prolifération cellulaire diminuée comparativement aux fibroblastes sains traités par H₂O₂. De même, un pré-traitement par la NAC avant celui par H₂O₂, induit une amélioration de la prolifération cellulaire dans les fibroblastes sains et HGPS comparativement à la condition sans pré-traitement. Ainsi,

l'activation de la production d'espèces réactives de l'oxygène dans les fibroblastes HGPS, participe à la diminution de la prolifération cellulaire. Cependant, la proportion d'anomalies nucléaires observées dans les fibroblastes HGPS semble être indépendante du taux de ROS (Richards et al., 2011).

Une autre étude menée sur le stress oxydant dans les fibroblastes HGPS a montré une augmentation de l'ARNm de l'enzyme MnSOD (Manganèse SuperOxyde Dismutase) dans ces cellules qui s'accroît au fil des passages (Viteri et al., 2010). MnSOD appartient à la famille des superoxyde dismutases qui protège les cellules des dommages oxydatifs et régule le taux d'ion superoxyde (O_2^-).

- **Anomalie de la prolifération cellulaire**

Une étude menée sur des fibroblastes HGPS a montré que les cellules de patients présentaient une sous-expression de la protéine LAP2 α associée à une diminution du taux de lamines de type A nucléoplasmiques. Ces caractéristiques ont été corrélées à la diminution de la prolifération cellulaire observée dans les cellules HGPS. En effet, les fibroblastes « non-proliférants » ont un faible taux de LAP2 α et inversement. Cet article suggère que la perte de LAP2 α contribue à un défaut de prolifération des cellules HGPS (Vidak et al., 2015). Par ailleurs, d'autres protéines et mécanismes cellulaires peuvent participer à la diminution de la prolifération cellulaire.

- **Sénescence cellulaire**

La sénescence cellulaire se définit par un arrêt irréversible du cycle cellulaire accompagné de modifications morphologiques, biochimiques et fonctionnelles. La sénescence cellulaire est la principale caractéristique des cellules HGPS et sera abordée plus en détails dans la partie « I.B.b La sénescence cellulaire ».

Dans des fibroblastes humains HGPS sénescents, l'isoforme $\Delta 133p53^a$ de p53 est diminuée et est impliquée dans le processus de sénescence. En effet, son inhibition par des siRNAs dans des fibroblastes HGPS induit une augmentation du nombre de cellules sénescents et de l'expression des ARNm de p21 (protéine ciblée directement par p53) et d'Il-6 et Il-8, des cytokines inflammatoires impliquées dans le SASP (*Senescence-Associated Secretory*

^a Le gène *TP53* est à l'origine d'au moins 13 isoformes de p53 résultant d'un épissage alternatif, d'une utilisation d'un promoteur alternatif ou bien d'un autre site d'initiation de la transcription. $\Delta 133p53$ est une isoforme tronquée au niveau de l'extrémité N-terminale initié par l'utilisation d'une méthionine dans le codon 133 du transcrit, lui-même issu du promoteur 2 de *TP53*.

Phenotype) (traité plus loin). Cette étude révèle également que STUB1, une protéine empêchant la dégradation de $\Delta 133p53$ par autophagie, est diminuée dans les fibroblastes HGPS sénescents. L'induction de l'expression de $\Delta 133p53$ par un lentivirus induit une augmentation de la prolifération ainsi qu'une diminution de l'ARNm de p21, du miR-34a et de foyers positifs pour γ H2AX (via l'augmentation d'un facteur de réparation de l'ADN : RAD51). Cependant, aucun effet n'a été décrit sur le niveau de progérine et sur les anomalies morphologiques nucléaires (von Muhlinen et al., 2018).

Une étude menée par Varela *et al.*, sur le modèle murin *Zmpste24^{-/-}* a montré que des gènes régulés négativement par p53 étaient surexprimés dans le foie de ces souris dont notamment p21 (décrite dans la partie traitant du cycle cellulaire et de la sénescence). Les anomalies de l'enveloppe nucléaire observées chez ce modèle murin pourraient être un signal d'activation de p53. Par exemple, les altérations de la chromatine peuvent être considérées par la cellule comme un stress dit « génotoxique » et ainsi conduire à une réponse de sénescence cellulaire ou bien d'apoptose médiée par p53. Les fibroblastes des modèles murins entrent en état de sénescence car ils présentent les caractéristiques spécifiques des cellules sénescents : diminution spontanée de la prolifération cellulaire ; arrêt définitif du cycle cellulaire ; diminution de la capacité répliquative ; morphologie altérée (aplatissement et élargissement de la cellule) ; activité accrue de la β -galactosidase acide (Varela et al., 2005).

a . iv) Modèles animaux de Progeria

Parmi les modèles animaux développés ces dernières années pour étudier la Progeria et les syndromes apparentés, le modèle murin est le principal modèle utilisé pour explorer des mécanismes moléculaires *in vivo*, et plus récemment, des approches thérapeutiques. D'autres modèles, comme par exemple *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*), organisme très utilisé pour l'étude du vieillissement de manière générale, ont également émergé.

o Modèles murins

La classification en 2 groupes des syndromes progéroïdes selon Carrero *et al.*, précisée plus haut, est également applicable aux différents modèles murins créés et utilisés non seulement pour l'étude des syndromes progéroïdes humains mais également pour l'étude des mécanismes du processus de vieillissement physiologique.

Les anomalies phénotypiques les plus fréquemment rapportées dans les modèles de souris progéroïdes concernent essentiellement les os, les articulations, les muscles squelettiques, la peau, le système cardiovasculaire, le foie, les reins (Harkema et al., 2016).

Plusieurs modèles murins de la Progeria ont été générés afin de pouvoir mener des études *in vivo* pour mieux comprendre la physiopathologie de cette maladie et tester des approches thérapeutiques. Ces modèles ont été obtenus soit par la modification du gène *Lmna*, soit par celle du gène *Zmpste24* (Köks et al., 2016).

▪ **Souris murin « knock-in » *Lmna*^{HG} ^a**

Dans ce modèle murin, la mutation responsable de la Progeria a été introduite. Les souris hétérozygotes (*Lmna*^{HG/+}) expriment de la lamine A, de la lamine C et de la progérine. Elles expriment la progérine à des taux très importants et l'accumulation de cette protéine conduit à des dysmorphies nucléaires marquées.

À la naissance, les souris hétérozygotes (*Lmna*^{HG/+}) semblent normales, mais des signes cliniques d'HGPS apparaissent au bout de 6 à 8 semaines de vie. À cet âge, elles commencent à perdre du poids et présentent une croissance lente. Elles développent des lésions ostéolytiques au niveau des côtes entraînant de nombreuses fractures spontanées, une cyphose de la colonne vertébrale et des anomalies au niveau du crâne (lésions ostéolytiques de l'arc zygomatique, altérations des sutures crâniennes, micrognathie) (Yang, 2006). Elles conservent leur force de préhension et semblent ne pas présenter d'anomalie du muscle squelettique au niveau histologique. Elles présentent une diminution du tissu adipeux sous-cutané ainsi qu'une diminution de la graisse abdominale (Yang, 2006). Les aortes des souris hétérozygotes âgées de 6-7 mois ne présentent pas d'altération au niveau du muscle lisse (intima, media et adventice). Ce modèle murin ne développe pas de maladies cardiovasculaires (Yang, 2006). Le décès survient avant 28 semaines de vie. (Yang et al., 2008).

Ce modèle, dans lequel de la prélamine A tronquée s'accumule, se rapproche du modèle *Zmpste24*^{-/-} présentant une accumulation de prélamine A farnésylée. Ces 2 protéines ont toutes deux le groupement farnésyl conservé. Au niveau phénotypique, ces 2 modèles présentent de nombreuses similitudes avec quelques caractéristiques qui leur sont propres.

Les souris homozygotes *Lmna*^{HG/HG} sont très sévèrement touchées et meurent avant 3 semaines de vie. De très petite taille, elles sont totalement dépourvues de tissu adipeux et

^a L'allèle *Lmna*^{HG} correspond à la délétion de l'intron 10 (suppression de la synthèse de lamine C) et de l'intron 11 ainsi que de la délétion des 150 derniers nucléotides de l'exon 11 (suppression de la synthèse de prélamine A).

présentent de très nombreuses fractures spontanées localisées au niveau des extrémités, un tissu osseux faiblement minéralisé, une micrognathie et un crâne anormalement formé avec des sutures crâniennes ouvertes. Un fort pourcentage de noyaux dysmorphiques est décrit dans les fibroblastes de ces souris.

- **Modèle murin « knockout » *Zmpste24*^{-/-} (Bergo et al., 2002; Harkema et al., 2016; Pendás et al., 2002; Piekarowicz et al., 2019; Yang, 2006)**

Comme précisé plus haut, ce modèle murin présente une accumulation de prélamine A farnésylée, par blocage de la dernière étape de maturation de la prélamine. Les cellules de souris homozygotes *Zmpste24*^{-/-} n'expriment pas de lamine A mature et présentent des dysmorphies nucléaires marquées.

À la naissance, les souris homozygotes semblent normales mais développent rapidement, après 4-6 semaines de vie, un phénotype très similaire à celui des patients HGPS : retard de croissance, perte de poids, alopecie, anomalies osseuses, ostéopénie (réduction de la masse et de densité osseuse), sarcopénie (réduction de la masse, de la force et de la fonction musculaire).

Les souris *Zmpste24*^{-/-} présentent un phénotype ostéopénique avec des anomalies osseuses marquées. Ceci se traduit notamment par une altération de la dentition (incisives minces, longues), l'apparition de fractures spontanées, la perte de la capacité de différenciation des cellules souches mésenchymateuses de la moelle osseuse en ostéoblastes (cellules participant à la formation du tissu osseux), une micrognathie, une posture anormale caractérisée par une position courbée et une scoliose. Elles développent, à environ 4 mois de vie, une anomalie de la force de préhension. Elles n'arrivent à s'accrocher à la grille que pendant un temps très bref. Elles présentent également une démarche lente et anormale : membres postérieurs traînants fréquemment en lien avec la faiblesse musculaire que présentent ces souris vers l'âge de 6-8 semaines. Des foyers de dégénérescence musculaire, une infiltration de cellules inflammatoires et une fibrose interstitielle ont été décrits, hormis dans le modèle de Bergo *et al.*

Vers l'âge de 16 semaines, les souris *Zmpste24*^{-/-} ont totalement perdu leur tissu adipeux sous-cutané et présentent une atrophie sévère de l'épiderme, des follicules pileux et des corps apoptotiques sont retrouvés dans la couche basale de l'épiderme. Ceci peut se traduire au niveau phénotypique par la perte de leur fourrure, de leurs moustaches et de leurs cils.

Au niveau cardiaque, les souris présentent : une diminution de l'épaisseur de la paroi du ventricule, des zones de dégénérescence musculaire, une infiltration de cellules inflammatoires,

une fibrose interstitielle, une dilatation ventriculaire. Ces altérations du myocarde suggèrent que le décès de ces souris pourrait être dû à une cardiomyopathie dilatée et à une insuffisance cardiaque. En revanche, Bergo *et al.* ne décrivent aucune pathologie cardiaque dans leur modèle murin. Pendás *et al.* rapportent par ailleurs une diminution de la glycémie et de la triglycéridémie après 4 semaines de vie.

Ces souris *Zmpste24^{-/-}* constituent un modèle de syndrome progéroïde avec lequel il est possible d'étudier les mécanismes cellulaires altérés par l'accumulation de prélamine A farnésylée : morphologie de l'enveloppe nucléaire, sénescence cellulaire, hyperactivation de la voie p53, phénotype progéroïde... Il a été, par exemple, utilisé pour tester des approches thérapeutiques visant à réduire la farnésylation de la progérine. Cependant, il n'est pas possible avec ce modèle d'étudier le mécanisme moléculaire d'épissage aberrant du gène *LMNA* tel qu'observé chez les HGPS.

▪ **Modèle murin « knock-in » *Lmna*^{G609G/G609G} ^a**

Ces souris ont été générées par l'introduction de la mutation à l'origine de la Progeria chez l'Homme. Les souris homozygotes produisent de la progérine, de la lamine A à des niveaux très faibles et de la lamine C à des niveaux intermédiaires, tandis que les souris hétérozygotes *Lmna*^{G609G/+} produisent de la progérine en plus des taux normaux de lamines A et C. En termes de phénotype, celui des souris *Lmna*^{G609G/+} est moins marqué et s'explique par une meilleure « tolérance » des souris vis-à-vis de l'accumulation de progérine par rapport aux humains. De même, la dermopathie restrictive entraîne chez l'humain une diminution du poids du fœtus, un accouchement prématuré et une mort périnatale, alors que, dans le modèle murin de cette pathologie, les souris ne présentent pas de phénotype particulier jusqu'à 3-4 semaines de vie. Ainsi, les souris homozygotes *Lmna*^{G609G/G609G} sont un meilleur modèle de HGPS que les souris hétérozygotes *Lmna*^{G609G/+} car elles présentent d'une part un phénotype progéroïde plus prononcé et plus précoce (retard de croissance, perte de poids progressive, courbure du rachis, calcifications au niveau des vaisseaux..., décès prématuré vers l'âge de 4,5 mois), et d'autre part, elles reproduisent le mécanisme moléculaire à l'origine de la maladie humaine (Osorio *et al.*, 2011a).

Les souris *Lmna*^{G609G/G609G} ont une posture anormale et une courbure marquée de manière excessive de la colonne vertébrale (Osorio *et al.*, 2011a; Piekarowicz *et al.*, 2019). Osorio *et al.* décrivent également chez ces souris : une diminution de la taille des incisives

^a *Lmna*^{G609G} ; c.1827 C > T ; p.Gly609Gly.

inférieures, un amincissement de l'os cortical (couche externe de l'os ; très présent dans le centre des os longs) avec une augmentation de sa porosité au niveau des tibias, une réduction de la taille du crâne. Comme pour le modèle murin *Zmpste24^{-/-}*, ces souris montrent une force de préhension réduite (Osorio et al., 2011a). Au niveau cutané, elles présentent également une perte du tissu adipeux sous-cutané, une atrophie des follicules pileux (Osorio et al., 2011a; Piekarowicz et al., 2019) et une perte de poils (Harkema et al., 2016). Ce modèle murin présente une grande similarité de phénotype vasculaire avec celui des patients HGPS. En effet, les souris présentent de nombreuses altérations au niveau des vaisseaux sanguins avec notamment : une diminution progressive des cellules musculaires lisses, une accumulation de collagène, une dégradation de l'élastine, une fibrose et une calcification (Harkema et al., 2016). Au niveau cardiaque, elles présentent des troubles du rythme cardiaque de type bradycardie (Osorio et al., 2011a; Piekarowicz et al., 2019).

Ce modèle de souris présente aussi une diminution de la glycémie, de l'adiponectine (protéine synthétisée dans le tissu adipeux et impliquée dans le métabolisme des graisses et du glucose) mais également d'hormones telles que la leptine (hormone digestive régulant les réserves de graisses et à activité anorexigène), l'hormone de croissance et l'IGF-1 (*Insulin-like Growth Factor-1* : synthétisée majoritairement par le foie et impliquée notamment dans le métabolisme du glucose et la prolifération cellulaire) (Piekarowicz et al., 2019).

Ces souris *Lmna^{G609G/G609G}* constituent donc un excellent modèle animal car il reproduit de manière fidèle à la fois le mécanisme moléculaire à l'origine de la Progeria (mutation ponctuelle du gène *Lmna*), les altérations cellulaires induites (morphologie nucléaire altérée par exemple) ainsi que le phénotype clinique.

En plus de ces modèles murins exprimant un phénotype pluritissulaire de syndromes progéroïdes, il est intéressant de noter que des **modèles murins exprimant de la progérine spécifiquement dans un tissu** ont également été générés.

Wang *et al.* ont généré des souris transgéniques^a exprimant la progérine dans l'épiderme. Les kératinocytes de ce modèle de souris présentent des anomalies morphologiques nucléaires qui sont décrits comme réversibles en présence d'un traitement par un inhibiteur de la farnésyl-transférase (voir plus loin). Cependant, ces souris ne présentent pas de différences significatives au niveau cutané (épaisseur de la peau, densité des poils, morphologie de la peau...)(Wang et al., 2008). De même, Sagelius *et al.* ont généré des souris transgéniques^b qui

^a Sous le contrôle d'un promoteur de la kératine 14.

^b Ces lignées sont dites inductibles par la tétracycline et la séquence portant la mutation G609G est retrouvée dans les tissus exprimant la kératine 5.

présentent des anomalies de la peau et de la dentition, une diminution des adipocytes, une altération des follicules pileux et des glandes sébacées (Sagelius et al., 2008). Ces souris pourraient être utilisées afin d'étudier les mécanismes moléculaires impliqués dans les altérations de la peau et de ses annexes au cours de la Progeria.

Dans une autre étude, il a été réalisé une expression de la progérine dans des cellules (pré)-adipocytaires de souris. Ces animaux présentent, après de nombreuses semaines, une augmentation du nombre de (pré)-adipocytes exprimant de la progérine, une accumulation de dommages à l'ADN, une sénescence et une atrophie du tissu adipeux, de la fibrose, un état inflammatoire généralisé (Revêchon et al., 2017).

○ *C. elegans*

Depuis plusieurs années, le nématode, *Caenorhabditis elegans*, est utilisé en tant que modèle pour l'étude du vieillissement, car il possède de nombreux avantages comme par exemple : une durée de vie très courte (d'environ 3 semaines) ; une facilité d'élevage ; de nombreux gènes conservés chez les mammifères supérieurs ; des mécanismes moléculaires et cellulaires communs avec l'Homme ; différents biomarqueurs du vieillissement identifiés (Figure 20)... (Litke et al., 2018).

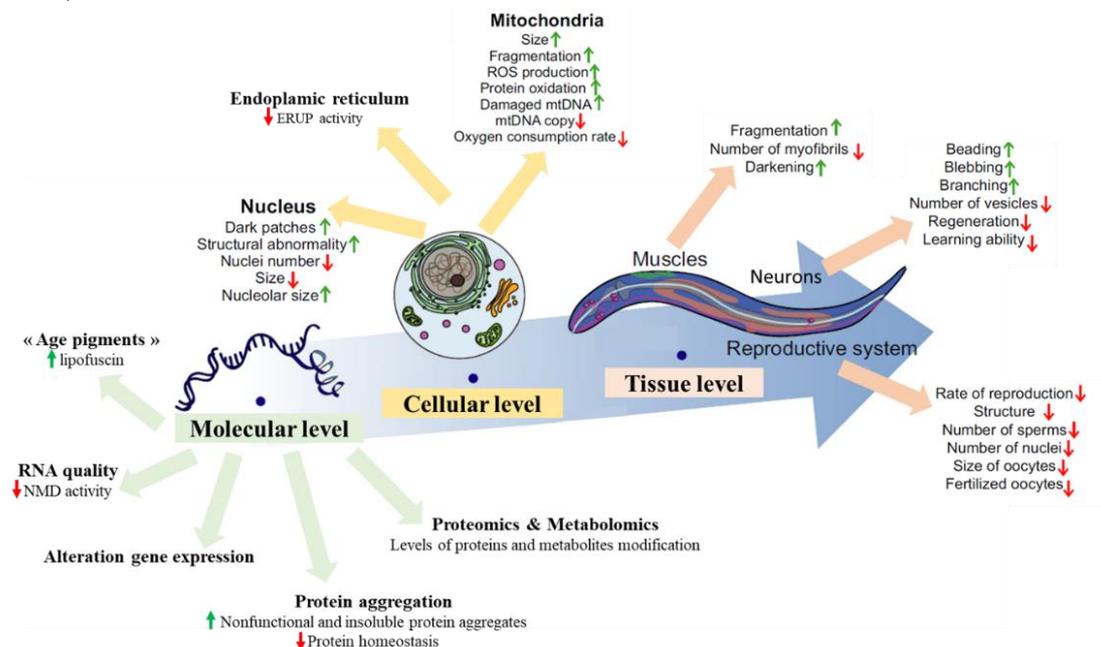


Figure 20 : Biomarqueurs potentiels du vieillissement chez *C. elegans* (NMD : Nonsense-mediated mRNA Decay ; ERUP : Endoplasmic Reticulum Unfolded Protein Response ; mtDNA : mitochondrial DNA) (Modifié à partir de (Son et al., 2019)).

Aux travers de nombreuses études, il a été décrit que des facteurs génétiques et environnementaux avaient un rôle important dans la régulation de la durée de vie de *C. elegans*.

Au cours du vieillissement, *C. elegans* présente un caractère phénotypique majeur : la diminution progressive de sa mobilité. Le tissu musculaire exprime de moins en moins le facteur de transcription UNC-120 induisant la diminution de l'expression de gènes impliqués dans la contraction musculaire. (Mergoud dit Lamarche et al., 2018). La surexpression de UNC-120 retarde le vieillissement musculaire du ver sans augmenter sa durée de vie. La perspective qui ressort de cette étude est un « vieillissement en bonne santé » qui pourrait être une stratégie thérapeutique dans certaines pathologies (Mergoud dit Lamarche et al., 2018).

Les études menées sur *C. elegans* sont potentiellement applicables au vieillissement des mammifères, dont les humains, puisque les processus moléculaires impliqués sont décrits comme étant très conservés (Mack et al., 2018).

C. elegans contient un seul gène de lamine (*lmn-1*) codant une isoforme appelée Ce-lamine. Comme chez l'Homme, cette protéine présente une séquence CaaX à son extrémité C-terminale induisant la farnésylation de la protéine. De plus, comme pour les lamines de type A humaines, la Ce-lamine est indispensable pour maintenir la structure du noyau (Rzepecki and Gruenbaum, 2018). Cette protéine est essentielle car la réduction de son expression entraîne la mort des embryons précoces, associée à des anomalies cellulaires multiples. En raison de ses similitudes avec l'espèce humaine, *C. elegans* a été utilisé ces dernières années comme modèle de laminopathies. A ce jour, 16 mutations correspondant à des contextes de laminopathies ont été introduites chez l'animal : la dystrophie musculaire d'Emery-Dreifuss, la cardiomyopathie dilatée, le lipodystrophie partielle familiale de Dunnigan et la Progeria. La mutation Q159K de Ce-lamine, correspondant à la mutation humaine E145K, s'accompagne d'un phénotype HGPS. L'animal mutant présente un phénotype de Progeria incluant des défauts de mobilité avec anomalies musculaires, de fertilité et un vieillissement précoce avec réduction de la durée de vie (Bank et al., 2012). À ce jour, le modèle correspondant à la mutation p.G608G humaine n'a pas été rapporté.

a . v) Stratégies thérapeutiques

Les modèles murins détaillés ci-dessus ont permis d'explorer différentes pistes en vue d'améliorer le phénotype moléculaire et clinique de ces souris. Nous ne citerons que quelques exemples d'études réalisées afin d'illustrer ces propos.

Il a été étudié notamment l'impact de l'inhibition de l'enzyme ICMT^a dans des souris **Zmpste24^{-/-}**. Cette expérience a révélé que les souris *Zmpste24^{-/-} Icm1^{hm}* présentaient notamment un taux de prélamine A non méthylée plus élevé, une durée de vie plus longue, une amélioration du poids et du pelage, une augmentation de la densité osseuse et du tissu adipeux, une délocalisation nucléoplasmique de la prélamine A, une inhibition de l'entrée en sénescence des fibroblastes...(Ibrahim et al., 2013)

Dans des fibroblastes de patients HGPS, il a été étudié les effets d'une molécule de synthèse, **la Remodeline** qui inhibe l'activité de NAT10 (N-Acetyl-Transférase 10). Cette dernière est une enzyme impliquée dans l'ancrage des microtubules sur le noyau. Suite au traitement des cellules par la Remodeline, il a été notamment décrit une diminution du nombre de noyaux morphologiquement anormaux, de la production de dommages à l'ADN, du nombre de cellules sénescents, une amélioration de la prolifération cellulaire...(Larrieu et al., 2014). L'inhibition de NAT10 par la Remodeline dans les cellules HGPS permet de diminuer la force exercée par les microtubules sur un noyau « fragilisé » et ainsi d'améliorer sa morphologie. L'amélioration de la forme du noyau semble impliquée dans la restauration de certaines fonctions cellulaires.

Dans le modèle murin *Lmna^{G609G/G609G}*, Sanger *et al.*, ont administré la **Remodeline** par voie orale et ont notamment décrit une amélioration du poids des souris, une réduction de la perte du tissu adipeux, une diminution d'anomalies cardiovasculaires (par exemple fibrose aortique et perte de cellules du muscle lisse vasculaire). Dans cette même étude, des souris *Lmna^{G609G/G609G} Nat10^{+/+}* ont été générées afin de mimer *in vivo* les effets de la Remodeline et ont été comparées aux souris *Lmna^{G609G/G609G} Nat10^{+/-}*^b. L'équipe a décrit par exemple un retard dans l'apparition de la courbure de la colonne vertébrale, un retard dans l'apparition de la bradycardie, une augmentation de la fertilité des mâles et des femelles, chez les souris *Lmna^{G609G/G609G} Nat10^{+/-}* ... Un second modèle a été généré, *Lmna^{+/G609G} Nat10^{+/-}*. Ce dernier présente également des améliorations dans la durée de vie, la perte de poids et de la courbure de la colonne vertébrale (Sanger Mouse Genetics Project et al., 2018).

^a Il a été utilisé un allèle hypomorphique : *Icm1^{hm}*. Un allèle est dit hypomorphe lorsque le produit du gène a la même fonction que le gène sauvage mais il est moins exprimé ou moins actif. Dans cette étude, l'allèle hypomorphique sera à l'origine d'une diminution de l'activité de ICMT.

^b Le génotype *Nat10^{-/-}* est létal pendant la période embryonnaire.

Il est intéressant de noter que dans des fibroblastes humains HGPS et dans des cellules de tissu cutané de souris *Lmna*^{G609G/G609G}, l'acétylation d'un résidu de lysine en position 40 (L40) de la α -tubuline est augmenté et fait partie des substrats de NAT10.

Les exemples de stratégies thérapeutiques suivants se focalisent sur les différents mécanismes moléculaires et biologiques impliqués dans la pathologie (Figure 21) : synthèse de la progérine et ancrage à l'enveloppe nucléaire *via* le groupement farnésyl (inhibition du site d'épissage aberrant, inhibition de l'étape de farnésylation), dégradation de la progérine (activation de la voie de l'autophagie), effets toxiques induits (diminution des molécules de l'inflammation, inhibition de voies hyperactivées...). Différentes approches ont été développées ces dernières années et testée *in vitro* et pour certaines *in vivo* dans des modèles murins, avec plus ou moins d'efficacité.

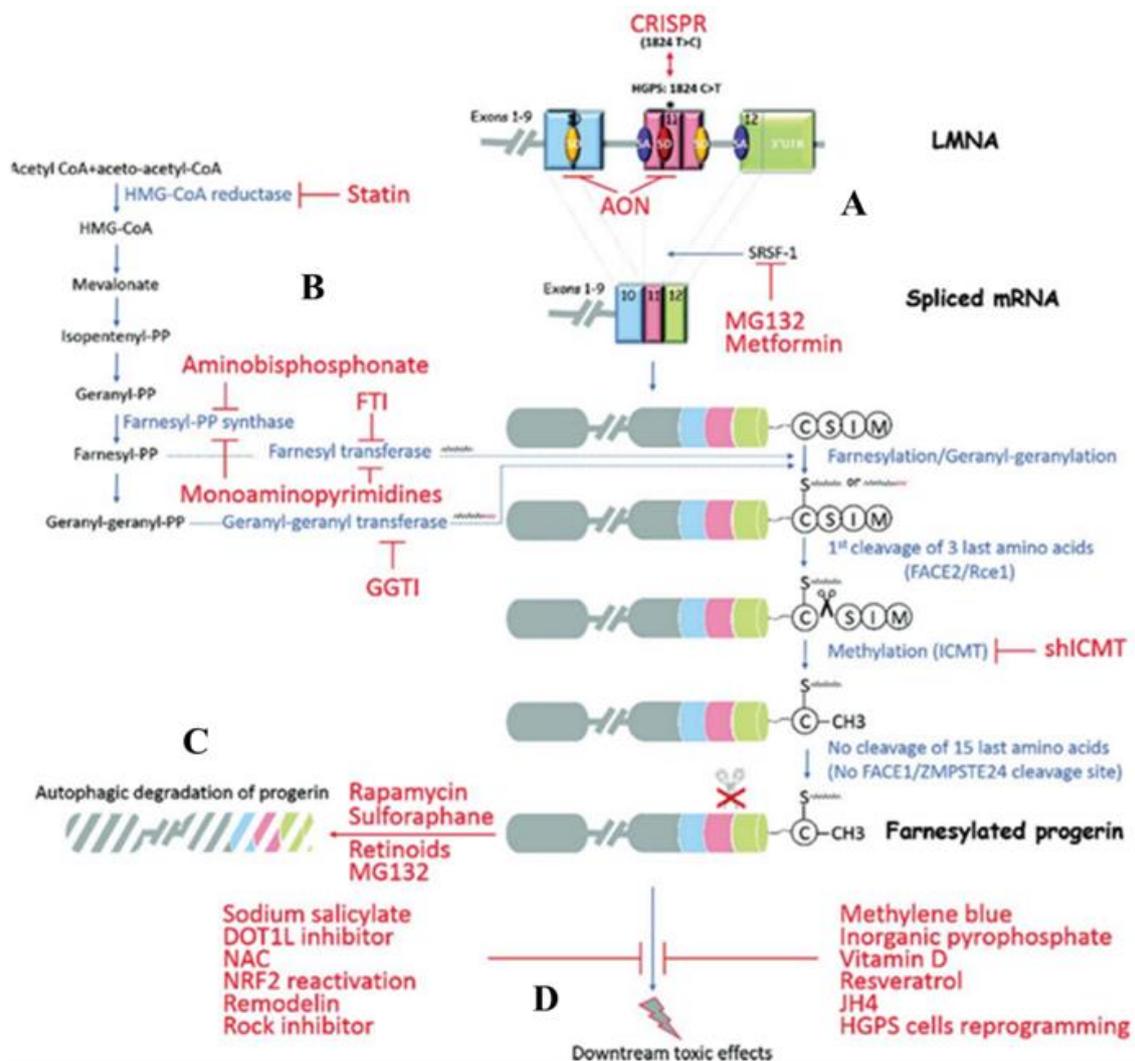


Figure 21 : Stratégies thérapeutiques dans la Progeria ciblant plusieurs mécanismes impliqués dans la maladie (Harhoury et al., 2018)

▪ **Inhibition de la synthèse de progérine par blocage du site d'épissage (Figure 21 A)**

Cette stratégie vise à cibler directement le site d'épissage anormal activé par la mutation, afin d'inhiber la synthèse de la progérine. Par exemple, l'administration d'oligonucléotides anti-sens (**AON** pour *Antisense OligoNucleotides*) ciblant ce site d'épissage anormal dans l'exon 11 dans des cellules de patients HGPS et dans des modèles de souris *Lmna*^{G609G/G609G} conduit à une diminution de la production de progérine. Dans cette approche, un second AON ciblant le site d'épissage physiologique situé dans l'exon 10 est utilisé pour renforcer l'effet, en diminuant la production de lamine A au profit de la lamine C (Osorio et al., 2011a).

Dans des fibroblastes humains HGPS, HGPS-like et MAD-B (*Mandibuloacral Dysplasia type B* ou Dysplasie acro-mandibulaire de type B), Harhoury *et al.*, ont utilisé des AON de séquences spécifiques de la mutation retrouvée dans le gène *Lmna*^a et ont montré une diminution de la prélamine A, de la progérine, de la prélamine AΔ90 et de la prélamine AΔ35. Ils ont également montré une diminution du nombre de cellules sénescents et des anomalies morphologiques nucléaires (Harhoury et al., 2016a).

La protéine SRSF-1 (*Serine/arginine-Rich Splicing Factor 1*) favorise le site d'épissage cryptique à l'origine de la synthèse de la progérine et sa transcription est modulée par un antidiabétique oral : la **metformine**. Ce principe actif réduit l'expression de SRSF-1 et de la progérine au sein de MSCs (*Mesenchymal Stem Cells*) HGPS, de fibroblastes humains HGPS et de fibroblastes de souris *Lmna*^{G609G/G609G} (Egesipe et al., 2016). Il est intéressant de noter que le **MG-132** (voir plus loin) diminue également l'expression de SRSF-1 (Harhoury et al., 2017).

L'utilisation *in vitro* d'un siRNA (*small interfering RNA*) ciblant la protéine SRSF-1 dans des MEFs *Lmna*^{G609G/+} induit une diminution de la progérine et corrige la morphologie des noyaux (Lopez-Mejia et al., 2011).

▪ **Inhibition de la synthèse de prélamine A farnésylée par blocage de la farnésylation (Figure 21 B)**

Le blocage de l'étape de farnésylation par des **FTIs** (*Farnesyl Transferase Inhibitors*), qui se lient sur la séquence de liaison CaaX de la Farnésyl-Transférase (FT), a été testé dans des fibroblastes humains HGPS, ainsi que dans des modèles de souris HGPS, montrant des améliorations phénotypiques et de la morphologie nucléaire *in vitro*. En 2007, un essai clinique sur 25 patients a été mis en place, basé sur l'administration d'un FTI : le **lonafarnib**. Cet essai

^a HGPS : *Lmna* c.1824C>T (accumulation de progérine) ; HGPS-like : *Lmna* c.1968+2T>C, c.1968+1G>A, c.1968+5G>C, c.1968G>A (accumulation de progérine et de prélamine AΔ90) ; c.1868C>G (accumulation de prélamine AΔ35) ; MAD-B : *Lmna* c.1274T>C (accumulation de prélamine A)

a montré quelques améliorations de signes cliniques (allongement de la moyenne de survie, gain de poids, amélioration de la rigidité des vaisseaux et du tissu osseux) avec néanmoins des variations interindividuelles (Gordon et al., 2012).

Cependant, il a été montré que, dès lors que l'activité de la FT était bloquée, la prénylation de la progérine par un groupement farnésyl était remplacée par un groupement géranyl-géranyl par le biais d'une autre enzyme, la géranyl-géranyl-transférase I. La progérine étant toujours présente sous forme prénylée, l'effet attendu visant à diminuer sa toxicité s'avère très limité. Par ailleurs, l'administration simultanée d'un **FTI** et d'un **GGTI** (*GeranylGeranylTransferase I Inhibitor*) induit une accumulation de prélamine A associée à une relocalisation des lamines A, C et B1 de la *lamina* nucléaire vers le nucléoplasme et une diminution du nombre de noyaux déformés et de foyers γ H₂AX (Varela et al., 2008).

Une autre approche de l'inhibition de la prénylation a été mise en place par notre équipe (Unité INSERM et Laboratoire de Génétique Moléculaire - Professeur Nicolas Lévy). Elle est basée sur l'utilisation de 2 molécules pharmaceutiques ayant déjà une AMM : le **zolédronate** (bi-phosphonate indiqué dans le traitement de pathologies osseuses) et la **pravastatine** (statine indiquée dans le traitement des hypercholestérolémies). Ces 2 principes actifs inhibent 2 enzymes nécessaires à la synthèse des groupements farnésyl et géranyl-géranyl. L'administration conjointe de ces 2 molécules (**ZoPra**) a montré son efficacité à la fois *in vitro* dans les fibroblastes HGPS (réduction de la prénylation, correction des anomalies nucléaires) et *in vivo* dans les souris *Zmpste24^{-/-}* (croissance, poids, tissu adipeux, durée de vie...). En 2009, les résultats d'un essai clinique consistant en l'administration combinée de pravastatine, de zolédronate et de lonafarnib chez 37 patients HGPS n'ont pas montré de bénéfice supplémentaire par rapport à la monothérapie avec le lonafarnib (Gordon et al., 2016).

Les mono-AminoPyrimidines (mono-APs), agissant de manière similaire au zolédronate et aux FTI, ont montré également une efficacité *in vitro* sur le phénotype de cellules iPSCs (*Induced Pluripotent Stem Cells*) dérivées de fibroblastes de patients HGPS (Blondel et al., 2016).

- **Induction de la dégradation de la progérine par activation de l'autophagie (Figure 21 C)**

Un immunosuppresseur, la **rapamycine**, induit dans des fibroblastes HGPS, une augmentation de la clairance de la progérine par autophagie, ainsi que des améliorations des anomalies nucléaires (forme du noyau, hétérochromatine), et un retard de l'entrée en sénescence de ces cellules. La rapamycine a la propriété d'inhiber l'activité de la protéine kinase mTOR

(*Mammalian Target Of Rapamycin*) qui intervient au sein de nombreux processus physiologiques dont la prolifération cellulaire, l'autophagie, la transcription de gènes, la biosynthèse des protéines... (Cao et al., 2011b).

Dans un essai clinique en cours mené à Boston, **l'évérolimus**, un inhibiteur sélectif de mTOR, est actuellement testé en co-administration avec du lonafarnib (NCT02579044).

Les PML-NB (*Promyelocytic-Nuclear Bodies*) constituent de nouveaux biomarqueurs dans la Progeria car ils sont le siège d'une accumulation de progérine. Ce sont des sphères de 0,1-1 µl de diamètre appartenant à la matrice nucléaire et régulant de nombreuses fonctions nucléaires dont l'autophagie. Le **MG-132**, une molécule fort prometteuse, agit à la fois sur la translocation nucléo-cytoplasmique de la progérine à partir de ces PML-NB et sur sa clairance par autophagie. De plus, le MG-132 agit au niveau de la synthèse de la progérine *via* la régulation négative du facteur d'épissage SRSF1 (cf ci-dessus). Ces effets ont été décrits sur des fibroblastes HGPS, sur des iPSC de patients HGPS dérivées en cellules souches mésenchymateuses (MSCs) et en cellules de muscles lisses vasculaires (VSMCs). Le MG-132 améliore le phénotype cellulaire, réduit la sénescence, augmente la prolifération et la viabilité des cellules HGPS. Dans les modèles de souris *Lmna*^{G609G/G609G}, l'administration locale de la molécule conduit à une diminution de l'expression de la progérine dans le muscle squelettique (Harhouri et al., 2017).

L'utilisation de molécules anti-oxydantes a également montré des effets bénéfiques. Le **sulforaphane**, un antioxydant, conduit à des effets similaires à ceux observés avec la rapamycine dans les cellules HGPS. Les cellules HGPS ont été décrites comme exprimant de manière réduite les récepteurs à la vitamine D. Le traitement de cellules HGPS avec de **la 1,25α-dihydroxy-vitamine D₃** a montré également une amélioration du phénotype de ces cellules : diminution du taux de progérine, diminution des anomalies morphologiques nucléaires, retard de l'entrée en sénescence des cellules, réduction de l'accumulation de dommages à l'ADN (Kreienkamp et al., 2016; Strandgren et al., 2017).

▪ **Réduction des effets toxiques de la progérine (Figure 21 D)**

Le **bleu de méthylène**, un antioxydant mitochondrial, induit de nombreuses améliorations au sein des cellules HGPS avec notamment : une amélioration de la prolifération et de la morphologie nucléaire, une augmentation de la quantité de lamine A et de lamine C, une augmentation de la fraction soluble de la progérine en induisant une libération de cette dernière de l'enveloppe nucléaire, une diminution des niveaux de ROS et une restauration de l'hétérochromatine périphérique (Xiong et al., 2016).

Le **resveratrol**, un polyphénol, est un activateur de SIRT1 *via* une augmentation de l'interaction de cette dernière avec la lamine A. Un traitement au resveratrol a montré que cette molécule prolongeait la durée de vie des souris *Zmpste24^{-/-}*, améliorait certaines anomalies phénotypiques (perte de poids, tissu osseux), restaurait la population de cellules souches adultes... (Liu et al., 2012).

Le **salicylate de sodium**, un anti-inflammatoire, administré à des souris *Zmpste24^{-/-}* induit une amélioration du poids, du tissu adipeux sous-cutané, de la taille de la rate et prolonge la durée de vie des souris. Cette molécule empêche l'activation de NF- κ B *in vivo* (Osorio et al., 2012).

Parmi les nombreuses molécules décrites, nous pouvons citer le **MG-132**. Ce dernier semble prévenir des dommages causés par l'oxydation dans les cellules HGPS, inhiber la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires et diminuer la dégradation de la protéine I- κ B dans les modèles murins (Harhoury et al., 2018).

▪ **CRISPR/Cas9 : une potentielle stratégie thérapeutique ?**

– **Principe général du système CRISPR/Cas9**

Le génome de la bactérie *Escherichia coli*, contient des séquences appelées CRISPR (*Clustered Regularly Interspersed Short Palindromic Repeats*) correspondant à des séquences répétées d'ADN (20-37 paires de bases) régulièrement espacées par des séquences dites « *spacer* » (20-40 paires de bases). Ces séquences CRISPR correspondent à de l'ADN viral que la bactérie a intégré à son propre génome. Comme pour un gène classique, les séquences CRISPR sont transcrites en ARN. Cependant, cet ARN ne sera pas traduit en protéine mais sera utilisé par la bactérie en tant qu'« ARN guide » (ou sgRNA pour *single guide RNA*) afin de reconnaître et d'éliminer des virus.

Cette capacité d'élimination est liée à une enzyme capable de couper l'ADN double-brin : Cas9 (*CRISPR-associated protein 9*) après que l'« ARN guide » ait reconnu la séquence d'ADN viral.

Les coupures induites par l'endonucléase Cas9 peuvent être réparées selon 2 mécanismes : la recombinaison non-homologue (NHEJ) ou la recombinaison homologue (HR) (Figure 22).

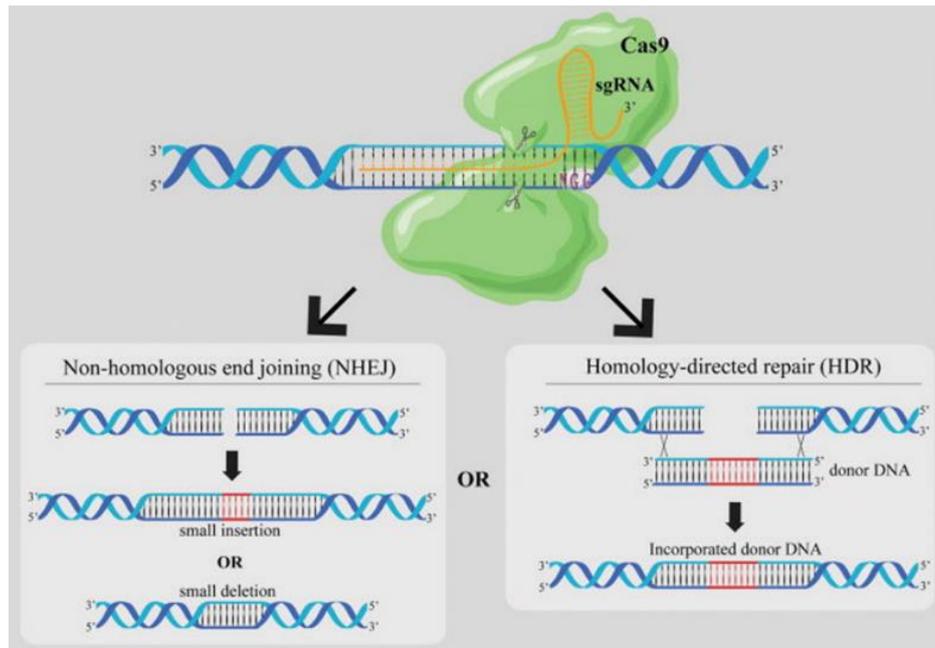


Figure 22 : l'enzyme Cas9 est guidée par le sgRNA et va couper l'ADN double-brin. La coupure induite par l'endonuclease peut être réparée soit par le système NHEJ, soit par le système HDR (Williams and Warman, 2017).

- Recombinaison non-homologue : ce système de réparation ne nécessite pas de matrice homologue et peut engendrer une délétion ou une insertion d'un nombre variable de nucléotides et ainsi modifier le cadre de lecture du gène^a. Avec ce mécanisme de réparation, un gène peut devenir non-fonctionnel ou bien devenir fonctionnel (Tremblay, 2015).
- Recombinaison homologue : ce système de réparation utilise une séquence d'ADN homologue à celle qui précède et à celle qui suit le site de coupure. Ce système permet une réparation fidèle des cassures double-brin et peut être utilisé pour modifier des nucléotides d'un gène ciblé, d'introduire un ou plusieurs exons manquants, ou d'introduire un gène entier (Tremblay, 2015). Par exemple, au cours des phases S et G₂ du cycle cellulaire, la chromatide sœur d'un chromosome pourrait servir de modèle homologue.

– CRISPR/Cas9 et la Progeria de Hutchinson-Gilford

Dans leur étude, Santiago-Fernández *et al.* ont utilisé le système CRISPR/Cas9 dirigé contre l'exon 11 du gène *LMNA*. Ils ont réalisé des expériences *in vitro* dans des MEFs (génotype *Lmna*^{+/+} et *Lmna*^{G609G/G609G}) et des fibroblastes humains (génotype *Lmna*^{+/+} et

^a Si le nombre de nucléotides délétés/insérés n'est pas un multiple de 3.

Lmna^{G608G/+}), mais également des expériences *in vivo* dans le modèle murin HGPS *Lmna*^{G609G/G609G}. Les résultats *in vitro* montrent une diminution de la quantité de progérine (et de lamine A), du nombre de noyaux exprimant la progérine, et du pourcentage d'altérations nucléaires. Les résultats *in vivo* montrent également une diminution tissulaire de noyaux exprimant la progérine (foie, cœur, muscle squelettique), une augmentation de la durée de vie des souris, une amélioration de leur phénotype (la perte du toilettage se fait plus tard, le poids est légèrement amélioré, l'hypoglycémie basale de ces souris est en partie améliorée), une diminution de la fibrose (cœur et quadriceps) ... (Santiago-Fernández et al., 2019)

Bevret *et al.* ont utilisé le système CRISPR/Cas9 dirigé contre les exons 11 et 12 du gène *Lmna* (ARNs guides utilisés : gLmna-2 et gLmna-1 pour l'exon 11 et 12 respectivement) dans le modèle murin HGPS *Lmna*^{G609G/G609G}. Les résultats montrent une très bonne efficacité du système CRISPR/Cas9 dans le foie à l'origine d'une perte de lamine A et de progérine. Au niveau phénotypique, les souris ayant reçu l'injection de sgRNAs présentent une amélioration notamment au niveau du poids, de la posture (suppression de la cyphose), de l'épaisseur de la peau et de la couche adipeuse sous-cutanée, de la bradycardie, de la force de préhension, de la vitalité (appréciée en fonction du degré d'activité de la souris sur une roue) et du taux de survie. Au niveau cellulaire, il a été observé une amélioration de la dégénérescence des cellules du muscle lisse vasculaire de la crosse aortique (augmentation du nombre de noyaux) (Beyret et al., 2019).

2 . b) **Autres syndromes progéroïdes**

Les syndromes progéroïdes constituent un groupe de pathologies génétiques rares caractérisées par un phénotype clinique imitant le vieillissement physiologique. Carrero *et al.*, propose une classification des syndromes progéroïdes en deux catégories basées sur la voie moléculaire altérée. Ainsi, le 1^{er} groupe rassemble les syndromes progéroïdes induits par une altération des composants de l'enveloppe nucléaire^a et le 2nd groupe comprend les syndromes progéroïdes induits par des mutations de gènes impliqués dans les voies de réparation de l'ADN. Carrero *et al.*, suggère aussi que la plupart de ces syndromes progéroïdes présentent plusieurs caractéristiques communes remarquables (Figure 19) et qui seraient étroitement liées à celles du vieillissement physiologique (Carrero et al., 2016).

^a Ce groupe comprend : la HGPS, les HGPS-like le Syndrome de Néstor-Guillermo (NGPS), le Syndrome de Progeria Atypiques (APS), la Dermopathie Restrictive (DR) et la dysplasie acro-mandibulaire de type A

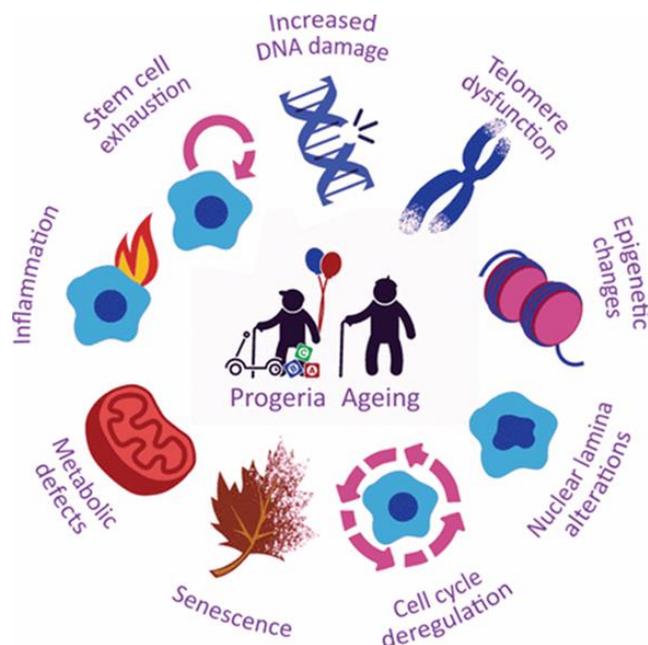


Figure 19 : 9 exemples de caractéristiques communes à la plupart des syndromes progéroïdes : augmentation des dommages de l'ADN ; altération des télomères ; modifications épigénétiques ; altérations de la lamina nucléaire ; dérégulation du cycle cellulaire ; sénescence ; anomalies métaboliques ; inflammation et épuisement des cellules souches (Carrero et al., 2016)

b . i) HGPS-like

Les patients atteints du syndrome appelé « HGPS-like » présentent un phénotype similaire à celui de la HGPS classique (lipoatrophie, veines sous-cutanées visibles, perte de cheveux, athérosclérose, ostéolyses). Comme dans la Progeria, ces patients décèdent prématurément de complications cardiaques, à un âge plus précoce ou plus tardif (en fonction de la mutation concernée) que la forme classique de la maladie. Les mutations retrouvées chez ces patients touchent le gène *LMNA* et aboutissent à la synthèse soit de **progérine** (c.1968G>A ; c.1968+1G>A ; c.1968+5G>A), soit d'une autre forme tronquée de lamine A comme : la **prélamine AΔ90** (c.1968G>A ; c.1968+1G>A ; c.1968+5G>A) ou la prélamine **AΔ35** (c.1868C>G) (Barthélémy et al., 2015).

b . ii) Syndrome Progéroïde Atypique (ou APS pour Atypical Progeroid Syndrome)

Les Syndromes Progéroïdes Atypiques sont caractérisés par des mutations du gène *LMNA* sans production de progérine ou d'autres formes de lamine A tronquée (c.406G>C ; c.11C>G ; c.1762T>C ; c.331G>A ; c.475G>A ; c.29C>T). Sur le plan clinique les patients présentent des caractères progéroïdes comme par exemple, une petite taille, un vieillissement

prématuré, une atrophie cutanée, une lipodystrophie, une alopecie partielle... Sur le plan cellulaire, les noyaux des cellules de ces patients présentent des anomalies morphologiques parfois similaires à celles des patients HGPS (Garg et al., 2009).

b . iii) Dermopathie restrictive (DR)

La DR est une pathologie létale pré- ou néonatale causée majoritairement par une mutation du gène *ZMPSTE24*, de transmission autosomique récessive. Des cas de mutation du gène *LMNA* de transmission autosomique dominante responsable d'un phénotype identique ont été également rapportés. Ces mutations induisent l'accumulation de prélamine A farnésylée par défaut de maturation post-traductionnelle. En période prénatale, des signes cliniques évocateurs peuvent être observés tels que : un retard de croissance, un hydramnios, un cordon ombilical court, une diminution de l'activité fœtale. En période néonatale, on retrouve : une hypoplasie de la mâchoire (bouche en O), une fente palatine, la présence de dents, la présence de fontanelles larges, une hypoplasie pulmonaire, une anomalie de la colonne vertébrale, une hyperkératose, une communication inter-auriculaire... La majorité des accouchements donne lieu à des fœtus mort-nés, et les nouveau-nés vivants décèdent dans les premiers jours de vie à cause de l'insuffisance de développement des poumons (OMIM#275210) (ORPHA#1662).

b . iv) Syndrome de Werner Atypique (SWA)

Le SWA est dû à une mutation hétérozygote (p.A57P, p.R133L, p.L140R, p.D300N, p.T506del) du gène *LMNA*, alors que le Syndrome de Werner (SW) est causé par une mutation du gène *WRN* (chromosome 8) codant une hélicase de type RecQ impliquée dans la réparation de l'ADN (ORPHA#79474) (ORPHA#902) (Saintigny and Monnat Jr, 2002) (<https://ghr.nlm.nih.gov>). Le SW, ainsi que sa variante, se caractérisent par un vieillissement accéléré où l'on peut observer : une atrophie cutanée, une lipodystrophie, une athérosclérose, une ostéoporose, une myopathie.... Les patients atteints de SWA accumulent dans leurs noyaux de la progérine ainsi que de la prélamine A Δ 90. La forme atypique se déclare chez l'adulte jeune^a et les symptômes progressent plus rapidement que dans le Syndrome de Werner "classique" que l'on appelle aussi "Progeria de l'adulte" (OMIM #277700) (<https://rarediseases.info.nih.gov>).

^a Début plus précoce que dans le syndrome de Werner classique.

a . vi) Dysplasie acro-mandibulaire de type A

Des mutations faux-sens (p.Arg527His et p.Ala529Val) du gène *LMNA* sont responsables de la dysplasie acro-mandibulaire de type A de transmission autosomique récessive. Les nouveau-nés et les enfants en bas-âge atteints présentent des anomalies du tissu osseux (retard de croissance, anomalie des os du crâne et de la face, ostéolyse...), des anomalies du tissu adipeux (lipoatrophie au niveau des extrémités par exemple), une atrophie cutanée, une alopecie, des troubles du métabolisme lipido-glucidique (OMIM#248370) (ORPHA#2457).

2 . c) Laminopathies tissu-spécifiques

Les laminopathies tissu-spécifiques touchent spécifiquement un tissu comme le tissu adipeux (lipodystrophie), le muscle strié squelettique (dystrophies musculaires) ou le tissu nerveux (neuropathie périphérique). Afin d'illustrer cette catégorie de laminopathies, il a été pris pour exemples : la lipodystrophie partielle familiale de Dunnigan de type 2, la cardiomyopathie dilatée avec mutation du gène *LMNA*, la dystrophie musculaire des ceintures, les dystrophies musculaires congénitales et la maladie de Charcot-Marie-Tooth de type 2B1.

La **Lipodystrophie Partielle Familiale de Dunnigan de type 2** (LPFD2) est due à une mutation du gène *LMNA* de transmission autosomique dominante. (ORPHA#2348) (OMIM#151660). Les symptômes se déclarent vers l'adolescence et à l'âge adulte (ORPHA#2348) associant un trouble du métabolisme lipido-glucidique (diabète, hypertriglycémie) et une répartition anormale du tissu adipeux (perte de graisse sous-cutanée au niveau des membres inférieurs ; accumulation de graisse au niveau du visage et du cou). Des complications liées à l'hypertriglycémie et au diabète se développent : athérosclérose, stéatose, hypertension artérielle (OMIM#151660) (ORPHA#2348) ...

La **cardiomyopathie dilatée** se traduit par une dilatation du ventricule gauche et une altération de la fonction systolique. Des mutations dans de très nombreux gènes peuvent en être à l'origine. Parmi eux, des mutations du gène *LMNA* sont responsables d'une cardiomyopathie dilatée de transmission autosomique dominante. Les symptômes sont observés à l'âge adulte et se traduisent par une anomalie de la conduction, des troubles de la fréquence cardiaque (fibrillation, arythmie), une insuffisance cardiaque congestive, associés à un risque majeur de mort subite (OMIM#115200) (Hershberger and Morales, 1993)..

La **dystrophie musculaire des ceintures** regroupe de nombreux phénotypes assez similaires classés selon le mode de transmission autosomique dominant (LGMD1^a) ou récessif (LGMD2^b) (Pegoraro and Hoffman, 1993). Des mutations de nombreux gènes sont impliqués. Parmi eux, le gène *LMNA*, responsable de la LGMD1B. Les signes cliniques chez ces patients débutent vers l'âge de 20 ans, avec une faiblesse musculaire au niveau scapulaire et pelvien, des complications cardiaques (troubles de la conduction auriculo-ventriculaire, cardiomyopathie dilatée) (OMIM#159001). La **DMED de type 1** est causée par une mutation du gène *EMD* (chromosome Xq28) codant l'émerine et dont la transmission est de type récessive (OMIM#310300) (Bonne et al., 1993). L'émerine est une protéine transmembranaire de l'EN qui interagit directement avec les lamines, permettant la fixation de ces dernières à l'EN. Les **DMED de type 2 et de type 3** sont causées par une mutation au sein du gène *LMNA* et dont la transmission est, respectivement, autosomique dominante et autosomique récessive (OMIM#181350 ; OMIM#616516) (Scharner et al., 2011).

La pathologie se traduit dès la petite enfance (3-4 ans environ) par : une atrophie et une faiblesse musculaire au niveau des membres supérieurs proximaux (scapulo-huméral) et inférieurs proximaux (muscles de la ceinture pelvienne), des contractures au niveau des articulations (coude), une atteinte du muscle cardiaque (Bonne et al., 1993).

La **dystrophie musculaire congénitale liée à la mutation du gène *LMNA***, de transmission autosomique dominante (OMIM# 613205), peut être considérée comme une variante à début précoce de la DMED où certains signes cliniques caractéristiques de cette dernière sont absents : contractures du coude et complications cardiaques par exemple (Sparks et al., 1993). Les nourrissons atteints de cette pathologie présentent dans les 6 premiers mois de vie, soit un défaut de soutien de la tête et du tronc, soit une perte progressive du soutien de la tête après avoir appris la marche et la position assise. Ces enfants souffrent d'une faiblesse musculaire distale et proximale, respectivement dans les membres inférieurs et supérieurs, d'une chute de la tête, de contractures des membres inférieurs au niveau proximal, d'une rigidité et d'une hyper-extensibilité du rachis, d'une insuffisance respiratoire pouvant nécessiter une ventilation mécanique (OMIM# 613205) (Quijano-Roy et al., 2008).

La **maladie de Charcot-Marie-Tooth (CMT)** est une neuropathie périphérique qui atteint les nerfs périphériques provoquant une atrophie musculaire. Il existe différents types de CMT (selon le mode de transmission, le gène impliqué, la zone du nerf altérée) qui ont un phénotype assez similaire. Parmi les gènes impliqués, une mutation autosomique récessive du

^a Sous-groupes : LGMD1A et LGMD1B

^b De nombreux sous-groupes de LGMD2 existent

gène *LMNA* est responsable de la CMT de type 2B1. Les symptômes apparaissent dès la petite enfance (3-4 ans) avec une déformation des pieds, une anomalie dans la courbure de la colonne vertébrale, une faiblesse et une atrophie musculaire des membres inférieurs, une altération de la conduction axonale, une perte ou une absence de réflexe (OMIM#605588) (Bird, 1993)...

Les laminopathies systémiques et tissus-spécifiques présentées précédemment sont résumées dans le tableau suivant :

Diseases	Genes	Recurrent mutations	Transmission modes	Prenylated prelamin A	Clinical features	References
Progeria and Progeroid syndromes						
Hutchinson–Gilford progeria syndrome, typical form (HGPS)	<i>LMNA</i>	c.1824C>T; p.G608G	De novo; HET	Progerin (Prelamin AΔ50)	Early childhood: alopecia, narrow nasal bridge, receding mandible, loss of subcutaneous fat, progressive joint contractures, nail dystrophy, tightness skin, delayed tooth eruption, osteoarthritis, arteriosclerosis leading to myocardial infarction or stroke. Overlapping phenotypes with MAD, RD	De Sandre-Giovannoli et al. (2003) Eriksson et al. (2003)
Hutchinson–Gilford progeria-like syndromes (HGPS-like)	<i>LMNA</i>	c.1968G>A; p.Q656Q c.1968+1G>A c.1968+2T>C, c.1821G>A c.1968+5G>A, c.1868+1C>G	De novo; HET	Depending on mutation: Progerin ± Dermopathin (Prelamin AΔ90); Prelamin AΔ35	Depending on mutation: premature aged appearance in adulthood (c.1968G>A); Classical HGPS phenotype, neonatal forms (c.1968+1G>A and c.1821G>A); Short stature, progeroid appearance (c.1968 + 5G>A and c.1868+1C > G)	Barthélémy et al. (2015) Moulson et al. (2007) Harhoury et al. (2016)
Atypical progeroid syndromes	<i>LMNA</i>	p.D136Y, p.E138K, p.D300N, p.T528M, p.T528M + p.M540T	HET, HOM or compound HET	–	Depending on mutation: premature aged appearance with cases of classical HGPS phenotype; musculoskeletal features; early arteriosclerosis and cardiovascular events	Verstraeten et al. (2006) Doubaj et al. (2012) <i>Unpublished data</i>
Restrictive dermopathy (RD)	<i>LMNA</i> <i>ZMPSTE24</i>		De novo; HET (<i>LMNA</i>) HOM (<i>ZMPSTE24</i>)	Dermopathin (Prelamin AΔ90) Full-length prelamin A	Intrauterine growth retardation, reduced fetal movements; thin, tightly adherent translucent skin, superficial vessels, facial dysmorphism, generalized joint ankylosis; death in the first week of life. Overlapping phenotypes described with HGPS	Navarro et al. (2004) Navarro et al. (2005)
Atypical Werner syndrome	<i>LMNA</i>		HET	–	Initial symptoms earlier than typical WS: cataract, dermatological pathology (scleroderma-like skin. . .), short stature, graying or thinning of hair, diabetes mellitus type 2, hypogonadism, osteoporosis, osteosclerosis of digits, atherosclerosis, voice change	Chen et al. (2003) Renard et al. (2009)

Tableau 2 : Exemples de laminopathies primaires (mutations fréquentes, modes de transmission, caractéristiques cliniques) (HET : hétérozygote ; HOM : homozygote) (Frankel, Delecourt et al., 2018))

Mandibuloacral dysplasia (MAD)	LMNA (MAD-A) ZMPSTE24 (MAD-B)	p.R527H c.1085_1086insT + p.N265S	HOM (LMNA) Compound HET (ZMPSTE24)	Full-length prelam A in MAD-B	Growth retardation, craniofacial anomalies, mandibular hypoplasia, osteolysis (david and distal phalanges), pigmentary skin changes, lipodystrophy (normal or increased fat tissue in neck and trunk, loss in tissue from extremities) insulin resistant diabetes mellitus. Overlapping phenotypes described with HGPS	Novelli et al. (2002) Agarwal, Fryns, Auchus and Garg (2003) Ben Yaou et al. (2011)
Lipodystrophy/atrophy syndromes						
Dunnigan-type familial partial lipodystrophy (FPLD2)	LMNA	Hotspot in 482 position: p.R482W/Q/L	HET	Full-length prelam A	Abnormal subcutaneous adipose tissue distribution: loss of fat from the upper and lower limbs, the gluteal and truncal localization, muscular appearance, accumulation of fat in face and neck (double chin). Insulin-resistance, diabetes mellitus, <i>acanthosis nigricans</i> , hypertriglyceridemia.	Shackleton et al. (2000) Araújo-Vilar et al. (2009)
Acquired partial lipodystrophy (APLD) or Barraquer-Simons syndrome	LMNB2 (predisposing mutations)		HET	–	Lipodystrophy with several subcutaneous fat loss affected regions (neck, arms, chest, face, abdomen), type IV or V dyslipoproteinemia, hypertension, hepatomegaly, hirsutism	Hegele et al. (2006)
Generalized lipotrophy, insulin-resistant diabetes, disseminated leukomelanodermic papules, liver steatosis, and cardiomyopathy (LIRLLC)	LMNA	p.R133L	HET	–	Hepatic steatosis, hypertriglyceridemia, insulin-resistant diabetes, generalized atrophy of the subcutaneous fat, sunken cheeks, and muscular pseudohypertrophy of the four limbs, thin and atrophic skin on the back of the hands and feet, hyperelasticity, or joint mobility	Caux et al. (2003)
Striated muscle diseases						
Emery-Dreifuss muscular dystrophy type 2 and 3 (EDMD)	LMNA	At least 106 mutations published, the most frequent are p.R249Q, p.R453W	HET or HOM	–	Joint contractures starting in early childhood, slowly progressive muscle weakness (start in humeroperoneal then scapular and pelvic girdle muscles), cardiac manifestations (syncope, arrhythmias, dilated cardiomyopathy, congestive heart failure, etc.). Overlapping phenotypes with FPLD, CMT	Bonne et al. (1999) Raffaele Di Barletta et al. (2000)
Diseases						
Diseases	Genes	Recurrent mutations	Transmission modes	Prenylated prelam A	Clinical features	References
Limb-girdle muscular dystrophy type 1B (LGMD1B)	LMNA	At least 51 mutations published, mostly missense	HET	–	Limb-girdle distribution of muscular weakness (starting in the proximal lower limb muscles then upper limb muscles), cardiac manifestations (atrioventricular conduction disturbances, dilated cardiomyopathy), the absence of early contractures	Muchir et al. (2000)
Dilated cardiomyopathy type 1A (CDM1A)	LMNA	At least 126 mutations published, mostly missense	HET	–	Systolic dysfunction, early conduction defects, arrhythmias, left ventricular dilatation, congestive heart failure, sudden cardiac death. Overlapping phenotypes described with FPLD	Fatkin et al. (1999)
Congenital muscular dystrophy (CMD)	LMNA	At least 23 published mutations, the most frequent are p.R249W, p.E358K	HET	–	Early infancy: dropped head syndrome, muscle axial and cervicoaxial weakness, severe hypotonia, delayed motor development, respiratory insufficiency	Quijano-Roy et al. (2008)
Heart-hand syndrome, Slovenian type	LMNA	c.IVS9-12T>G (c.1609-12T>G)	HET	–	Progressive cardiac conduction defect, tachyarrhythmia, dilated cardiomyopathy, brachydactyly (hand less affected than feet), muscle weakness	Renou et al. (2008)
Peripheral neuropathy						
Charcot-Marie-Tooth disease type 2B1 (CMT2B1)	LMNA	p.R298C	HET	–	Axonal peripheral neuropathy, distal muscle weakness and atrophy, depressed tendon reflexes, mild sensory loss	De Sandre-Giovannoli et al. (2002)
Other diseases						
Adult-onset leukodystrophy (ADLD)	LMNB1	Gene duplication	HET	–	Chronic progressive neurologic disorders: cerebellar, pyramidal, and autonomic abnormalities, symmetrical decreases in white-matter density	Padiath et al. (2006)

Recurrent mutations, transmission modes, prelam A production, and typical clinical features are described for each laminopathy together with the main references. HET, heterozygous; HOM, homozygous.

Tableau 2 (suite) : Exemples de laminopathies primaires (mutations fréquentes, modes de transmission, caractéristiques cliniques) (HET : hétérozygote ; HOM : homozygote) (Frankel, Delecourt et al., 2018)

I . B) Cycle cellulaire et sénescence

B . 1) Le cycle cellulaire

La division cellulaire, chez les organismes pluricellulaires, est nécessaire à la formation de l'organisme, à sa croissance et au renouvellement de ses cellules. Le cycle cellulaire est une séquence ordonnée d'évènements qu'une cellule présente au cours de sa vie aboutissant à sa division en 2 cellules filles.

Le cycle cellulaire comprend l'**interphase** et la **mitose** et est divisé en différentes étapes qui sont étroitement liées afin d'assurer la duplication du matériel génétique, puis la ségrégation des chromosomes dans chaque cellule fille génétiquement identique au cours de la division cellulaire.

L'**interphase** occupe la plus grande partie du cycle et correspond à une période comprise entre la fin d'une division et le début de la suivante. Au cours de cette phase, la cellule se développe (accroissement du volume) et réplique son ADN.

La **mitose (phase M)** correspond à une période au cours de laquelle la cellule mère se divise en 2 cellules filles génétiquement identiques. Cette étape du cycle permet le maintien d'une information génétique constante en quantité et en qualité au niveau des chromosomes.

1 . a) Différentes phases

Le cycle cellulaire est constitué de deux phases G pour "Gap" (pauses) (G_1 et G_2) qui sont séparées par la phase S (correspondant à la phase de synthèse ou **réplication de l'ADN**) et par la phase M (correspondant à la **mitose**) (Pommier and Kohn, 2003). Les phases G_1 , S et G_2 constituent l'**interphase**. La phase G_0 , ou phase de quiescence, est une phase de sortie temporaire ou permanente du cycle cellulaire (Figure 23).

La progression des cellules dans le cycle cellulaire nécessite l'action de plusieurs protéines qui vont interagir entre elles sous forme de complexes : les Cyclines et les CDKs (*Cyclin-Dependent Protein Kinases*) (Pommier and Kohn, 2003).

Selon la phase du cycle dans laquelle se trouve la cellule, différents complexes de protéines vont être formés au cours du cycle cellulaire et vont présenter des variations (Pommier and Kohn, 2003; Viallard et al., 2001).

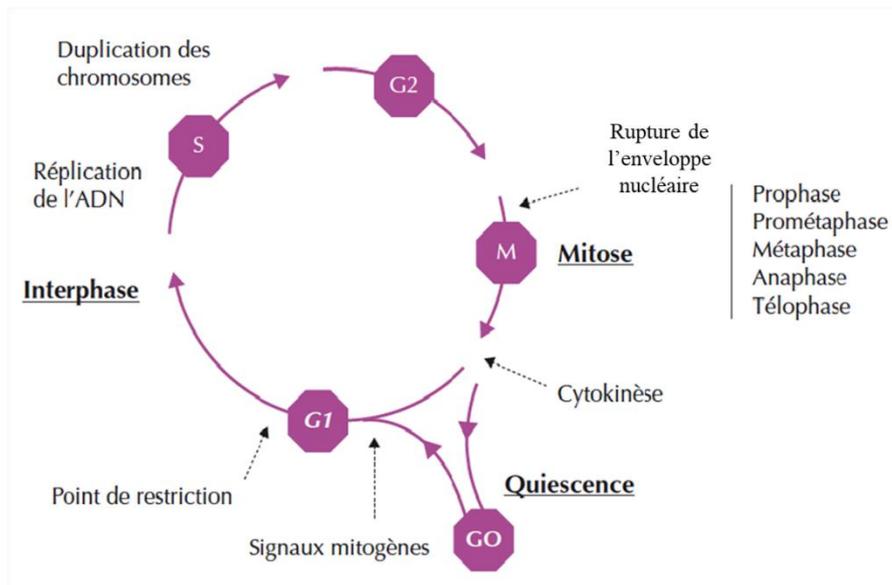


Figure 23 : Phases du cycle cellulaire (Carassou et al., 2012)

a . i) Phase G₀

Durant cette phase, les cellules sont qualifiées de « quiescentes » : elles ne se divisent pas, cessent leur croissance mais sont cependant métaboliquement actives (activité de synthèse protéique diminuée). Ces cellules en phase G₀, sont en dehors du cycle cellulaire et peuvent pour certaines, si elles sont stimulées par des facteurs mitogéniques extérieurs, rentrer à nouveau dans le cycle cellulaire en phase G₁.

a . ii) Phases G₁ et G₂

Au cours de ces phases, les cellules sont métaboliquement actives (transcription de l'ADN en ARN, synthèse protéique). Les phases G₁ et G₂ comportent deux points de contrôle du cycle cellulaire appelés « **Cell Cycle Checkpoints** » (traités plus loin) dont l'objectif est de contrôler la "qualité" du cycle cellulaire : le 1^{er} a lieu en fin de phase G₁ et le 2nd en G₂. En présence d'anomalies, ces « **Checkpoints** » sont capables d'induire un arrêt du cycle cellulaire et d'enclencher, soit des mécanismes de réparation, soit la mort cellulaire par apoptose (Pommier and Kohn, 2003). En phase G₁, la cellule peut soit poursuivre le cycle et passer en phase S, soit sortir du cycle en phase G₀.

a . iii) Phase S

Cette phase est celle au cours de laquelle le contenu de la cellule en ADN va doubler par le phénomène de **réplication de l'ADN**. A l'issue de la phase S, chaque cellule aura dupliqué son contenu en ADN nucléaire et chaque chromosome sera à 2 chromatides. Au cours de la réplication de l'ADN au sein d'une cellule, chacun des deux brins d'ADN va être utilisé en tant que "modèle" (ou matrice) pour la synthèse d'un nouveau brin complémentaire.

À l'issue de la mitose, chacune des deux cellules filles hériteront d'un brin d'ADN provenant de la cellule mère et d'un brin néoformé au cours de la phase de réplication. Cette répartition du matériel génétique permet de qualifier la réplication de l'ADN de "semi-conservatrice" (Figure 24).

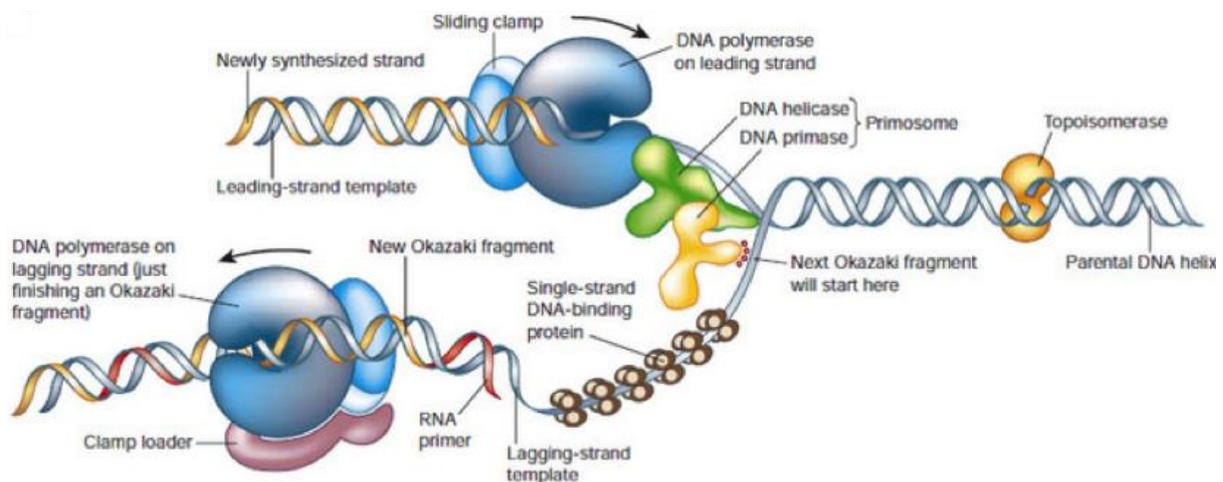


Figure 24 : Représentation schématique de la réplication de l'ADN (Alberts et al., 2002)

Lors de la réplication, une hélicase vient dans un premier temps, séparer les deux brins d'ADN parents créant ainsi deux brins monocaténaire qui serviront de matrice. Dès lors, la conformation de l'ADN prend la forme d'un « Y » ou « fourche de réplication » (*replication fork* en anglais). En parallèle une primase (ou ARN polymérase) débute la synthèse d'amorces d'ARN et des RPA (*Replication Protein A*) viennent se fixer sur l'ADN simple brin dans le but d'empêcher la reformation de la double hélice d'ADN. Puis, deux ADN polymérases se lient à leur tour sur les deux brins matriciels afin de synthétiser les deux nouveaux brins d'ADN dans le sens 5'-3'. Le « brin principal » (*leading strand* en anglais) est synthétisé de manière continue grâce à l'ADN polymérase qui se déplace dans le sens 5'-3' le long du brin matriciel. Le « brin retardé » (*lagging strand* en anglais) est quant à lui synthétisé de manière discontinue : l'ADN polymérase se déplace dans le sens inverse (de 3' vers 5') sur le second brin matriciel et génère non pas un brin entier d'ADN, mais, plusieurs fragments courts d'ADN appelés « fragments

d'Okazaki ». Enfin, l'enzyme RNase H va dégrader les amorces d'ARN sur les deux brins néoformés. Puis, une autre ADN polymérase va se positionner au niveau des fragments d'Okazaki pour synthétiser les « morceaux manquants ». Pour finir, une ADN ligase va lier tous les fragments d'ADN du "brin retardé" afin d'obtenir un brin d'ADN continu (Alberts et al., 2002; Das-Bradoo and Bielinsky, 2010).

a . iv) Phase M

La phase M ou **mitose** est une étape du cycle cellulaire conduisant à la formation de deux cellules filles génétiquement identiques à partir d'une cellule mère. Cette phase du cycle cellulaire comporte 5 étapes (la prophase, la prométaphase, la métaphase, l'anaphase et la télophase), suivies de la cytokinèse (Figure 25). Au cours ces différentes étapes, de nombreux réarrangements des composants cellulaires sont observés. Par exemple : la condensation et la migration des chromosomes, la séparation des chromatides, la disparition de l'enveloppe nucléaire, la modification de l'organisation du cytosquelette.

Durant la **prophase**, les centrosomes se déplacent en direction des pôles opposés de la cellule. Ces centrosomes sont le point de départ de la formation du fuseau mitotique constitué de microtubules. En parallèle, l'enveloppe nucléaire commence à se désagréger (dépolymérisation des lamines après leur phosphorylation; phosphorylation de LAP2 β ; désassemblage des pores nucléaires) permettant ainsi aux microtubules, émanant des centrosomes, de se fixer aux chromosomes au niveau de leur kinétochore^a (Cooper, 2000). La **prométaphase** correspond à la fin de la formation du fuseau mitotique et au début de la migration des chromosomes en direction du centre de la cellule (Cooper, 2000; Meijer, 2003). La **métaphase** correspond à la fin de l'alignement des chromosomes qui ont suivi le fuseau mitotique précédemment formé. Les chromosomes sont situés, à présent, à égale distance des deux pôles de la cellule (Cooper, 2000; Meijer, 2003) et sont organisés en une plaque équatoriale au centre de la cellule. Le complexe cohésine (composé de 4 protéines cohésines, Scc1, Scc3, Smc1, et Smc3) maintient les deux chromatides sœurs. Lors de la transition métaphase-anaphase, la séparase (une protéase de la famille des caspases) clive une sous-unité du complexe cohésine, libérant les chromatides sœurs. Afin d'être réparties en deux lots identiques, chaque chromatide d'un chromosome sera attirée par les microtubules à des deux

^a Le kinétochore est une structure associée au centromère du chromosome, au niveau de laquelle les microtubules viennent se fixer au cours de la prophase. Le centromère est la zone de contact des deux chromatides d'un même chromosome.

pôles de la cellule (Meijer, 2003). L'**anaphase** est l'étape au cours de laquelle on observe une séparation et une migration des chromatides vers les pôles du fuseau mitotique.

La **transition métaphase/anaphase** constitue un dernier « *Cell Cycle Checkpoints* » (traité plus loin).

Lors de la **télophase**, les chromosomes (à une chromatide) sont au niveau des deux pôles de la cellule, les chromosomes commencent à se décondenser, le fuseau mitotique disparaît et l'enveloppe nucléaire commence à se reformer (Meijer, 2003).

La **cytokinèse** débute dès l'anaphase, par l'apparition, à la surface de la cellule, d'un « sillon de clivage ». Ce dernier va progressivement s'étendre et devenir de plus en plus profond jusqu'à diviser la cellule mère en deux cellules filles. En parallèle, une structure nommée "anneau contractile", formée de plusieurs protéines dont des filaments d'actine et de myosine, va s'assembler sous la membrane plasmique et se contracter afin de participer à la division physique de la cellule mère (Alberts et al., 2002).

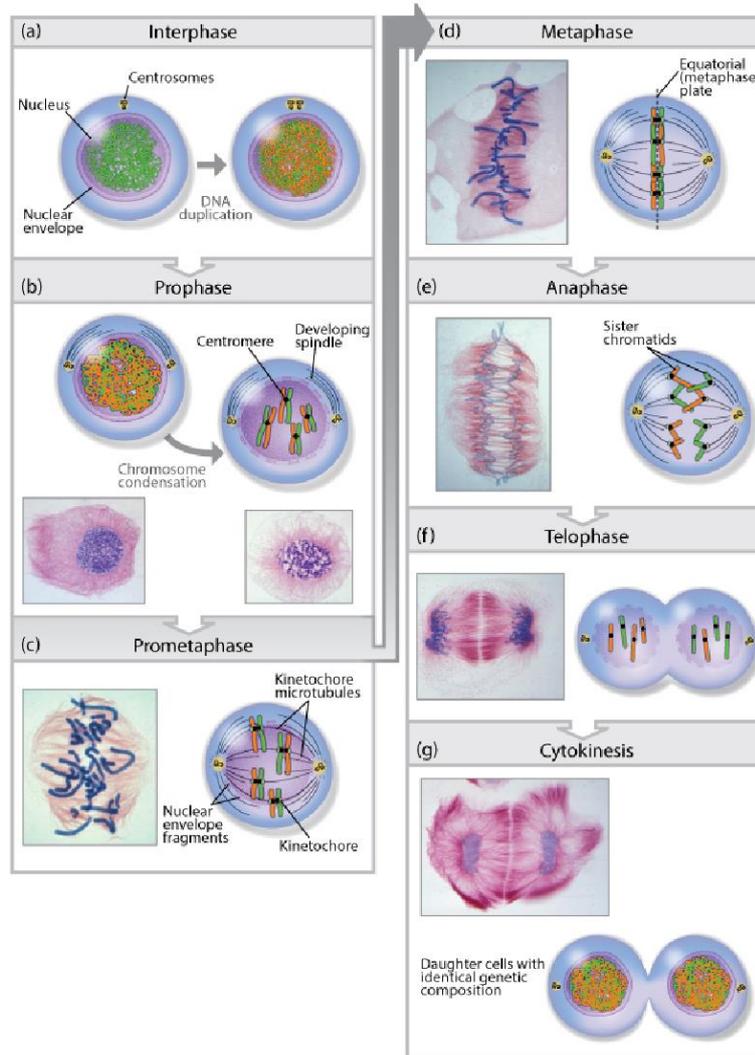


Figure 25 : Représentation de l'interphase, des 5 phases de la mitose et de la cytokinèse **a) Interphase :** la réplication de l'ADN se produit (en vert : l'ADN original ; en orange : l'ADN néo-synthétisé) **b) Prophase :** les chromosomes se condensent et le fuseau mitotique commence à se former. **c) Prométaphase :** les microtubules permettent aux chromosomes de commencer leur migration vers le centre de la cellule. **d) Métaphase :** les chromosomes sont alignés au centre de la cellule sur la plaque équatoriale. **e) Anaphase :** séparation et migration des chromatides vers les pôles opposés du fuseau. **f) Télaphase :** les chromosomes sont séparés et les enveloppes nucléaires s'assemblent autour des chromosomes **g) Cytokinèse :** la membrane plasmique se resserre et divise le cytoplasme (**O'Connor, C. (2008) Cell Division : Stages of Mitosis. Nature Education 1(1) :188**)

1. b) Régulation du cycle cellulaire

La progression au sein de chaque phase du cycle, ainsi que le passage d'une phase à une autre, sont régulés par l'expression, la dégradation et la phosphorylation de nombreuses protéines. Les cyclines, les CDKs (*Cyclin-Dependent Protein Kinases*), les protéines modulatrices (notamment des kinases et des phosphatases), ainsi que les protéines inhibitrices

des CDKs sont les acteurs majeurs du fonctionnement du cycle cellulaire (Shapiro, 2002) (Figure 26).

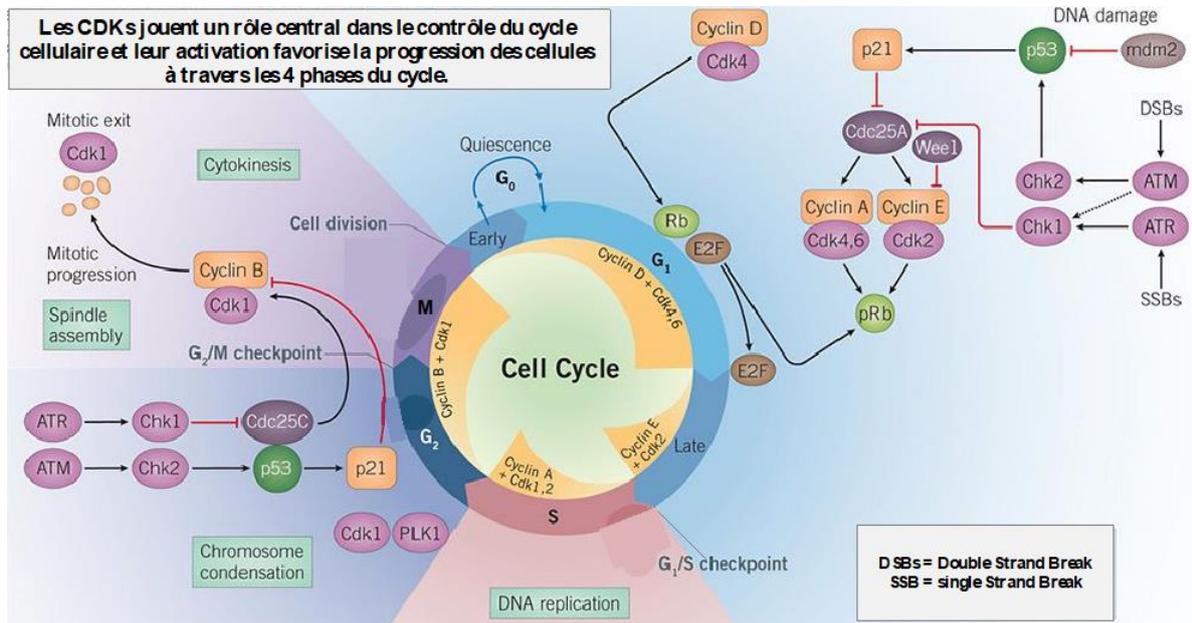


Figure 26 : Cyclines, CDKs, protéines modulatrices et inhibiteurs de CDKs impliqués dans la régulation du cycle cellulaire (<https://www.tocris.com/cell-biology/cell-cycle>)

b . i) Généralités sur les protéines majeures du cycle cellulaire

o Les cyclines

Les **cyclines** constituent une famille d’approximativement 30 protéines dont le poids moléculaire est compris entre 35 et 90 kDa (Malumbres, 2014). Elles possèdent 1 voire 2 régions *Cyclin-Box* d’environ 100 acides-aminés organisés sous la forme d’hélices alpha (Malumbres, 2014) impliquée(s) dans la fixation de CDK spécifiques à chaque cycline.

Chez les mammifères, les cyclines peuvent être réparties en 2 ou 4 classes selon leur fonction (cyclines *Start* ou mitotiques) ou selon la phase du cycle cellulaire pendant laquelle elles sont exprimées (cyclines de la phase G₁, S, G₂, M) :

- Les cyclines « Start » regroupent les cyclines pour lesquelles la concentration augmente en phase G₁ (Cyclines D) ou lors de la transition G₁/S (Cycline E).
- Les cyclines « MITOTIQUES » regroupent les cyclines dont la concentration augmente progressivement au cours des phases S et G₂ (Cycline A), et dont le pic d’expression est atteint en phase M (Cycline B) (Viallard et al., 2001).

Aucune cycline n’est présente durant toute la durée du cycle cellulaire. De manière périodique (cyclique), elles sont synthétisées et dégradées à des moments précis du cycle (Viallard et al., 2001) (Figure 27). Leur concentration varie donc, d’une part en fonction de

l'expression de leurs gènes, et d'autre part en fonction de leur dégradation par protéolyse. Les cyclines participent également à de nombreux autres processus au sein de la cellule, en plus de la régulation du cycle cellulaire : réparation des dommages de l'ADN ; contrôle de la différenciation cellulaire, de la migration cellulaire, du métabolisme énergétique et de l'expression de facteurs de transcription (Hydbring et al., 2016).

Les cyclines sont des protéines essentielles aux CDKs car, en tant que partenaires, elles permettent aux CDKs d'être enzymatiquement actives. En effet, elles contrôlent l'activité des CDKs mais également la spécificité de leurs substrats.

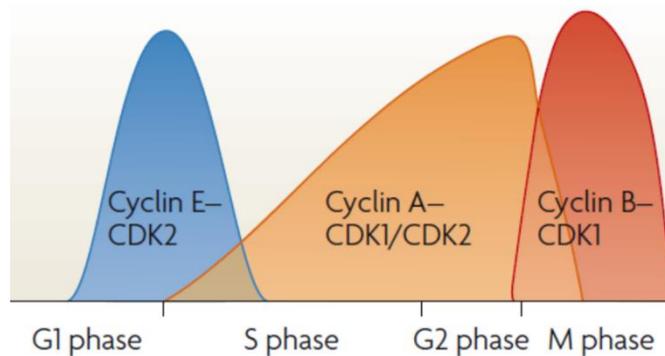


Figure 27 : Variation des cyclines en fonction de la phase du cycle cellulaire (Hochegger et al., 2008) (Le complexe Cycline D – CDK4,CDK6 n'est pas représenté dans cette figure)

- Les CDKs (Cyclin-Dependent Protein Kinases)

Les **CDKs** constituent une famille de 20 protéines (CDK₁ à CDK₂₀) (Malumbres, 2014) de type sérine/thréonine kinases (Lim and Kaldis, 2013; Malumbres, 2014) de faible poids moléculaire (34-40 kDa) (Carassou et al., 2012) qui peuvent être sous forme activée ou inactivée. Contrairement à leurs partenaires, les CDKs ont une expression relativement constante au cours du cycle cellulaire (Hochegger et al., 2008). Ces enzymes catalysent la phosphorylation transférant un groupement phosphate de l'ATP sur un résidu sérine ou thréonine de protéines cibles qui portent une séquence spécifique reconnue par la CDK (Carassou et al., 2012). Les CDKs phosphorylent des protéines essentielles au bon fonctionnement du cycle cellulaire comme : les lamines et leurs récepteurs (disparition de l'enveloppe nucléaire en prophase), la tubuline (polymérisation des microtubules)...

Initialement, la CDK est dans une conformation inactive. Des régions participent à l'inhibition de l'activité de la CDK en l'absence de cycline. Pour être fonctionnelle, la CDK doit dans un premier temps s'associer à une cycline, et dans un second temps, être phosphorylée/déphosphorylée au niveau d'acides aminés précis (Lim and Kaldis, 2013) (Sherr and Roberts, 1995).

Par exemple, pour la CDK2, à l'état inactif (Figure 28) :

- Au niveau du domaine C-terminal de CDK2, la *T-loop* (ou boucle d'activation) empêche la fixation du substrat de la kinase.
- Au niveau du site actif de CDK2, des acides aminés sont positionnés de sorte à créer une mauvaise orientation des groupements phosphates de l'ATP rendant ainsi la phosphorylation inactive.

L'activation de la CDK sera déclenchée lors de la fixation de la cycline sur la CDK :

- Lors de la formation du complexe cycline/CDK, l'hélice PSTAIRE (ou hélice α_1), au niveau du domaine N-terminal de la protéine, modifie l'organisation des phosphates de l'ATP du site actif de la CDK, et au niveau C-terminal, l'hélice L12 change de conformation et induit un réarrangement de la *T-loop* afin qu'elle ne bloque plus la fixation du substrat.
- La fixation de la cycline n'est pas suffisante pour son activation : la Thr-160 de la CDK doit être phosphorylée par la CAK (*CDK-Activating Kinase*).

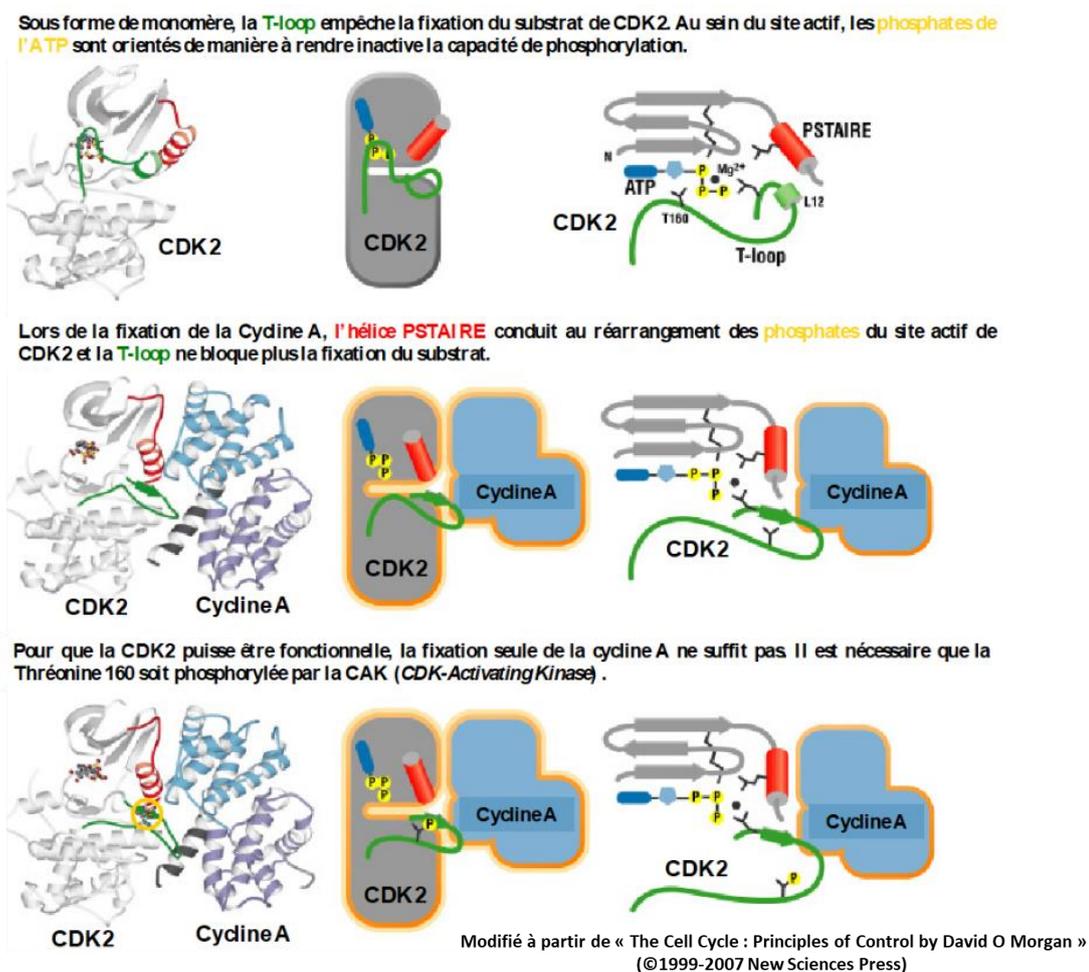


Figure 28 : Activation de la CDK2

○ Protéines modulatrices des CDKs

La **CAK** (*CDK-Activating Kinase*) est un complexe (formé de la CDK7, de la cycline H et de la protéine Mat1) qui phosphoryle un résidu thréonine spécifique en fonction de la CDK (Sherr and Roberts, 1995). Par exemple : le résidu cible de la CDK1 est la Thr-161, celui de la CDK2 est la Thr-160, celui de la CDK4 est la Thr-172 (Pommier and Kohn, 2003)... La phosphorylation de ce résidu par la CAK induit un dégagement de l'entrée de la poche qui fixe le substrat, ce qui permet à ce dernier de se lier à la CDK et par conséquent d'être phosphorylé (Lim and Kaldis, 2013).

D'autres résidus présents sur la CDK, la Thr-14 et la Tyr-15, sont les cibles **de kinases et de phosphatases** (Malumbres, 2014) :

- La kinase nucléaire **Wee-1** et la kinase cytoplasmique **Myt-1** vont inhiber les CDK1 et 2 en phosphorylant ces acides-aminés au cours des phases S et G₂. Des dommages à l'ADN peuvent activer la kinase Wee1 (Pommier and Kohn, 2003).
- Les protéines phosphatases de la famille Cdc25 vont activer les CDKs en retirant un phosphate sur ces résidus : la **Cdc25A** active les CDK2, 4 et 6 en phase G₁, tandis que la **Cdc25C** active la CDK1 en phase M (Pommier and Kohn, 2003).

Des protéines appartenant aux CDKIs (*Cyclin-Dependent Protein Kinases Inhibitor* ou *CDK Inhibitor*) ciblent de manière spécifique les CDKs et se répartissent en 2 familles : **les inhibiteurs INK4** et **les inhibiteurs Cip/Kip** (Lim and Kaldis, 2013; Sherr and Roberts, 1999; Weinberg, 1995).

La famille des **INK4** inhibe spécifiquement l'activité des cyclines kinases CDK4 et CDK6 au cours de la phase G₁ en empêchant la fixation de la cycline D (Malumbres, 2014; Pommier and Kohn, 2003). Cette famille comprend plusieurs protéines : p16^{INK4a}, p15^{INKab}, p18^{INK4c} et p19^{INK4d} codées par le locus *INK4a/ARF* (Lim and Kaldis, 2013; Pietsenpol and Stewart, 2002; Sherr and Roberts, 1999). La protéine **p16^{INK4a}** est qualifiée de suppresseur de tumeur car elle est capable d'induire la sénescence de la cellule au moment du passage G₁-S en ciblant l'activité des complexes Cycline D/CDK4,6 (Ben-Porath and Weinberg, 2005; Pommier and Kohn, 2003). Cette protéine interfère avec CDK4,6 et empêche ainsi la fixation de la Cycline D, conduisant au blocage en phase G₁ (Carassou et al., 2012).

Le locus *INK4a/ARF* (*Alternative Reading Frame*) code aussi la protéine **p14^{ARF}** décrite comme suppresseur de tumeur et dont le rôle est de réguler négativement la protéine Mdm2.

Cette dernière participe à la modulation de la protéine p53 (qui sera traitée plus loin) (Pommier and Kohn, 2003) (Figure 29).

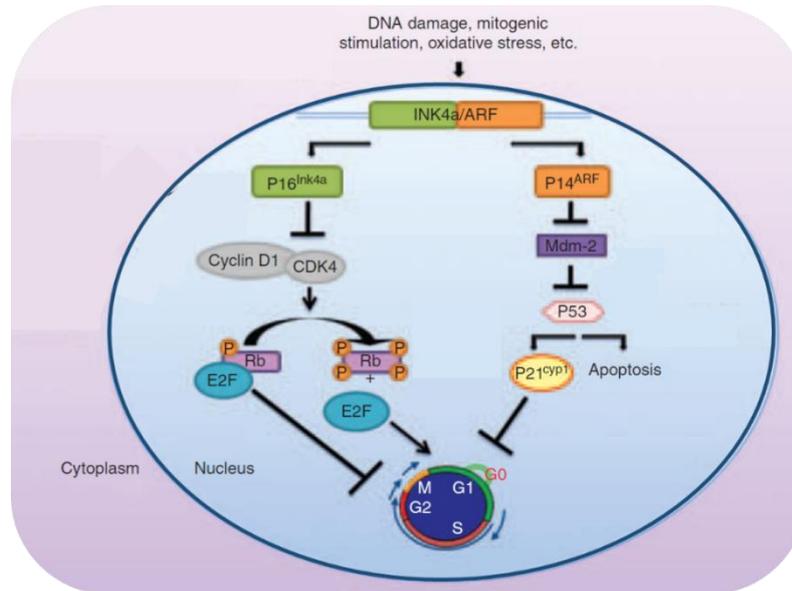


Figure 29 : Régulation du cycle cellulaire par les protéines p16^{INK4a} et p14^{ARF} codées par le locus *INK4a/ARF* (Romagosa et al., 2011)

La famille des **Cip/Kip** a la particularité d'inhiber l'activité des CDKs lors de n'importe quelle phase du cycle cellulaire. En effet, contrairement aux *INK4*, les *Cip/Kip* ont un champ d'activité plus large. Ainsi, plusieurs complexes faisant intervenir les Cyclines D, E et A peuvent constituer des cibles pour ces inhibiteurs. Cette famille comprend les protéines *p21^{Cip1}*, *p27^{Kip1}* et *p57^{Kip2}* (Pietenpol and Stewart, 2002; Sherr and Roberts, 1999). La protéine **p27^{Kip1}** est un inhibiteur des complexes impliquant la CDK2, la CDK4 et la CDK6 (Weinberg, 1995). Les taux de cette protéine sont relativement hauts dans les cellules quiescentes (Sherr and Roberts, 1999). Les complexes formés au début de la phase G₁ (Cycline D/CDK4,6) sont liés à la *p27^{Kip1}* et sont inactifs. Vers le milieu de la phase G₁, le niveau des complexes Cycline D/CDK4,6 dépasse celui de la *p27^{Kip1}*, permettant ainsi leur activation par la CAK et la Cdc25A et la phosphorylation de la pRb (Weinberg, 1995). La protéine **p21^{Cip1}** a un champ d'action plus large car c'est un inhibiteur des complexes dans lesquels CDK2 et CDK1 sont impliquées (Pommier and Kohn, 2003). Le niveau d'expression de *p21^{Cip1}* est relativement bas dans les cellules quiescentes et a tendance à augmenter en réponse à un signal mitogène (Sherr and Roberts, 1999). Cependant, son effet inhibiteur ne pourra s'exercer qu'au moment où *p21^{Cip1}* sera en excès vis-à-vis des complexes qu'elle cible (Pommier and Kohn, 2003). La protéine *p21^{Cip1}* est étroitement liée à la protéine p53. En effet, cette dernière induit l'expression de la

p21^{Cip1}, ce qui fait d'elle, l'un des principaux médiateurs de l'arrêt du cycle cellulaire (Pommier and Kohn, 2003).

Les protéines p27^{Kip1} et p21^{Cip1} peuvent ainsi participer à la formation et à la stabilisation des complexes faisant intervenir la cycline D (Sherr and Roberts, 1999), à l'inhibition de ces mêmes complexes, mais également à la libération et à l'activation des complexes Cyclines E,A/CDK2 (Figure 30).

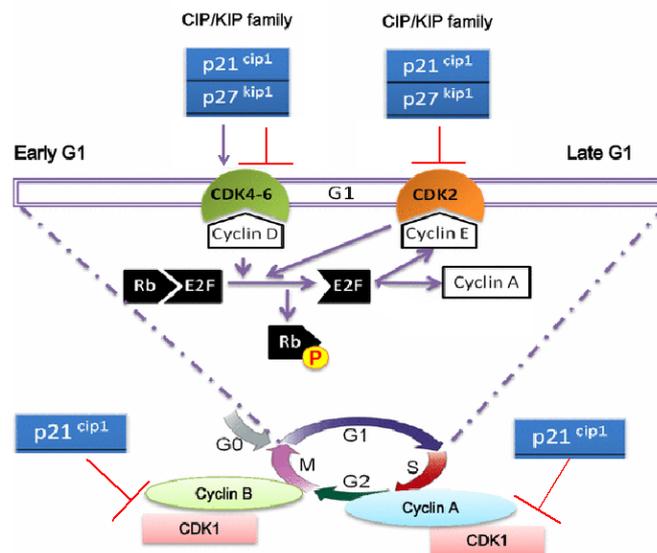


Figure 30 : Régulation du cycle cellulaire par les protéines p21^{Cip1} et p27^{Kip1} (Modifié à partir de (Hao et al., 2016))

La phosphoprotéine nucléaire **p53** ou protéine suppresseur de tumeur joue un rôle majeur au niveau des points de contrôle G₁/S et G₂/M (Shapiro, 2002). Son activation et son accumulation peuvent bloquer de manière transitoire le cycle cellulaire (G₁ ou G₂) permettant la réparation de lésions de l'ADN, ou le bloquer de manière irréversible, entraînant dans ce cas la sénescence ou l'apoptose de la cellule. Diverses perturbations (lésions de l'ADN, activation d'oncogènes, hypoxie, privation de nutriments...) peuvent conduire à l'activation de p53 (Soussi, 2000). Lors de la transition G₁/S, p53 active peut induire la transcription du gène codant p21^{WAF1/CIP1}. Cette dernière, dont l'expression est augmentée, se fixe sur les complexes Cyclines E,A/CDK2 et les empêche de phosphoryler la protéine pRb. Le facteur E2F reste alors inactif et ne peut enclencher la transcription de facteurs permettant le passage du point de restriction (voir plus loin) et la progression du cycle (Shapiro, 2002; Soussi, 2000). La régulation de l'activité de p53 intervient essentiellement au niveau de l'interaction entre p53 et son partenaire, la protéine Mdm2 (*Murine double minute 2*). Cette dernière, fixée à p53, forme un complexe qui inhibe l'activité transcriptionnelle de p53. De plus, Mdm2, qui est une ubiquitine-ligase,

entraîne la dégradation de p53 par le protéasome. C'est par l'alternance d'état "stabilisé" (p53 dissociée de Mdm2) et d'état "complexé" que l'activation de p53 se réalise. Parmi les différents facteurs pouvant activer p53, l'activation d'oncogènes tels que c-myc ou Ras, peut induire l'activation de la protéine p14^{ARF}. Cette dernière est responsable de la dissociation du complexe p53/Mdm2 par translocation de Mdm2 hors du noyau. La p14^{ARF} est codée par le locus *INK4a* qui code également une CDKI décrite ci-dessus : la p16^{INK4a} (Soussi, 2000). Par ailleurs, p53 peut être la cible de deux protéines : Chk1 et Chk2 (traitées plus loin) intervenant en phase G₁ et lors de la transition G₂/M (Figure 26). L'activation de p53 peut bloquer les cellules au cours du point de contrôle G₂/M *via* la modulation d'autres protéines : activation de p21 qui va inhiber le complexe Cycline B/CDK1 ; répression du promoteur du gène codant la Cdc25C (Chen, 2016).

Les kinases **ATM** (*Ataxia-Telangiectasia Mutated*) et **ATR** (*Ataxia-Telangiectasia-like and Rad3 homolog*) sont des protéines en charge de la coordination du cycle cellulaire avec le métabolisme de l'ADN. Selon la nature du dommage créé sur l'ADN (ATR principalement activée en cas de blocage des fourches de réplication et en cas de cassures simple brin de l'ADN ; ATM surtout activée en cas de cassures double brin de l'ADN), ces 2 protéines peuvent s'activer et ainsi phosphoryler leurs substrats préférentiels : **p53** et la kinase **Chk2** pour ATM ; la kinase **Chk1** pour ATR (Levy et al., 2011; Pietsenpol and Stewart, 2002) (Figure 31).

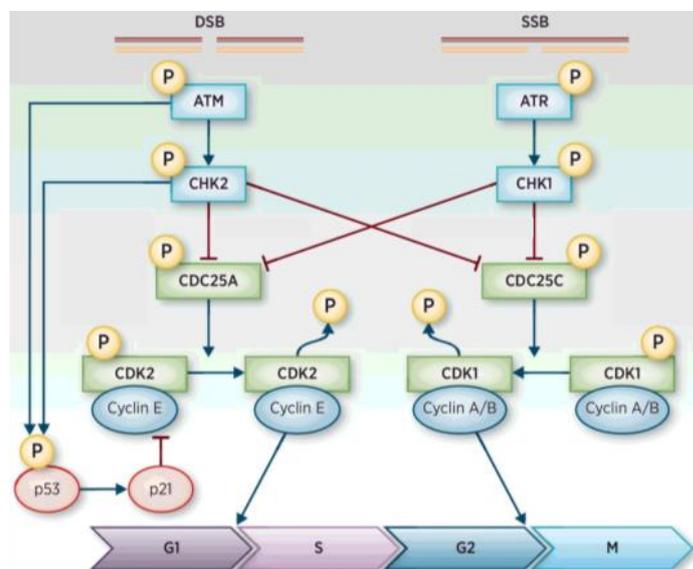


Figure 31 : Régulation du cycle cellulaire *via* les voies ATM et ATR (Modifié à partir de (Lin et al., 2017))

Chk1 possède une expression dépendante du cycle cellulaire, tandis que Chk2 est exprimée indépendamment du cycle et de la prolifération cellulaire. Ces protéines participent à

la stabilisation de p53 et à la phosphorylation des phosphatases Cdc25A et Cdc25C et (Pommier and Kohn, 2003) :

- Lorsque la Cdc25A est inhibée, l'activation des complexes Cyclines D/CDK4,6 et Cyclines E,A/CDK2 ne peut être réalisée.
- Lorsque la Cdc25C est inhibée, celle-ci se retrouve bloquée dans le cytoplasme et est incapable d'activer la CDK1 (Pietenpol and Stewart, 2002).
- Selon la phase du cycle cellulaire, lorsque p53 est activée : elle inhibe les complexes Cyclines E,A/CDK2 ou B/CDK1 par divers mécanismes (induction de p21^{WAF1/CIP1}; inhibition de la CAK...); elle induit une répression des gènes codant la CDK1 et la Cycline B (Pommier and Kohn, 2003); elle inhibe le transport du complexe Cycline B/CDK1, de Cdc25C vers le noyau (Pommier and Kohn, 2003; Soussi, 2000)...

b . ii) Mise en jeu de protéines spécifiques selon la phase du cycle

Les cellules initialement en G₀ entrent en phase G₁, à la suite d'une stimulation induite par des signaux mitogènes, et commencent à synthétiser de manière séquentielle des cyclines de différents types. Les premières à être synthétisées sont les Cyclines D (Cyclines D1, D2 et D3) (Sherr and Roberts, 1995)(Sherr and Roberts, 1999).

▪ Régulation extracellulaire du cycle

La synthèse des cyclines D est induite par un signal mitogène extracellulaire qui est transmis à la cellule *via* des voies de signalisations intracellulaires.

La **voie Ras/MAPK** (*Mitogen Activated Protein Kinase*) et la **voie PI3K/AKT/mTOR** (*Phosphatidyl Inositol 3-Kinase*) font partie des grandes voies de signalisation intracellulaire. Elles font intervenir des phosphorylations successives de protéines cytoplasmiques qui vont aboutir à l'activation de divers facteurs de transcriptions. Ces derniers vont activer la transcription de gènes impliqués dans la prolifération, la migration, la survie cellulaire... (Lièvre and Laurent-Puig, 2010).

De manière très générale, **la voie de signalisation Ras/MAPK** implique la protéine Ras (appartient à la famille des protéines G qui fixe le GTP et l'hydrolyse en GDP) qui après activation d'une cascade de protéines MAP kinases, aboutit, à l'activation de facteurs de transcriptions comme par exemple *c-FOS*, *c-JUN*, *c-MYC* (Lièvre and Laurent-Puig, 2010) impliqués notamment dans la régulation de protéines intervenant dans l'initiation de la phase G₁ du cycle cellulaire (Cycline D1, CDK6, E2F2, p21^{Cip1}, p27^{Kip1}). **La voie de signalisation**

PI3K/AKT/mTOR implique la protéine AKT, qui aboutit à terme, à l'activation de facteurs de transcription comme NF- κ B (*Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) impliqué notamment dans la régulation de protéines de l'inflammation et du cycle cellulaire.

Les voies de signalisation cellulaire peuvent interagir entre-elles, avoir des effecteurs communs et être régulées de manière différente selon le type cellulaire.

- Progression de la phase G₁

La particularité des **Cyclines D** réside dans le fait que leur régulation s'exerce *via* des signaux extracellulaires (ex : facteurs de croissance) à la différence des Cyclines de type E, A et B dont l'expression est qualifiée de périodique. Les Cyclines D possèdent une demi-vie très courte (moins de 25 min) (Sherr and Roberts, 1995). Les Cyclines D sont les partenaires des CDK4 et des CDK6 dont l'association est nécessaire afin de créer des complexes actifs (Sherr and Roberts, 1995, 1999). Les **CDK4 et 6** sont activées d'une part par leur liaison à la Cycline D et d'autre part grâce à l'intervention de la CAK et de la protéine Cdc25A (Pommier and Kohn, 2003).

L'activité de ces complexes Cycline D/CDK4,6 est détectable dès le milieu de la phase G₁ et augmente au fur et à mesure que la cellule approche de l'entrée en phase S. Ces complexes ciblent directement une protéine : la pRb (*Retinoblastoma protein*) (Sherr and Roberts, 1995).

La **pRb** est une protéine appartenant à la famille des *Pocket Protein* dont il existe 3 membres : pRb, p107 (*Retinoblastoma-like protein 1*) et p130 (*Retinoblastoma-like protein 2*) (Lim and Kaldis, 2013). pRb régule l'expression de gènes qui contrôlent l'avancée du cycle cellulaire, dont notamment, des gènes nécessaires au passage de la phase G₁ à la phase S. Avant la phase G₁, pRb est sous forme non-phosphorylée. Sous cette conformation, la protéine pRb est capable de se lier au facteur de transcription **E2F** (Weinberg, 1995) dont elle régule négativement l'activité (Ben-Porath and Weinberg, 2005; Shapiro, 2002; Sherr and Roberts, 1995). E2F désigne une famille de facteurs de transcription régulant de nombreux gènes impliqués dans le contrôle de la prolifération cellulaire. Cette famille est composée de facteurs activateurs (E2F₁, E2F₂ et E2F_{3a}) et de facteurs inhibiteurs (E2F_{3b}, E2F₄, E2F₅, E2F₆ et E2F₇). pRb se lie majoritairement aux facteurs activateurs tandis que les facteurs inhibiteurs sont associés principalement à p107 ou p130. Parmi les autres gènes transcrits par E2F, on pourra citer des gènes codant des protéines contrôlant : la réplication de l'ADN (MCM pour *Mini-Chromosome Maintenance*, Cdc6, Orc pour *Origin Recognition Complex*), des enzymes nécessaires à la synthèse de nucléotides (TK : Thymidine Kinase) (Lim and Kaldis, 2013; Meijer, 2003).

Afin de progresser dans le cycle cellulaire, il est nécessaire que le facteur de transcription E2F soit dissocié de pRb, ce qui le rendra fonctionnel. La dissociation du complexe pRb/E2F se réalise dès lors que la protéine pRb est hyperphosphorylée par le complexe Cycline D/CDK4 (Figure 32) (Ben-Porath and Weinberg, 2005; Sherr and Roberts, 1995; Weinberg, 1995).

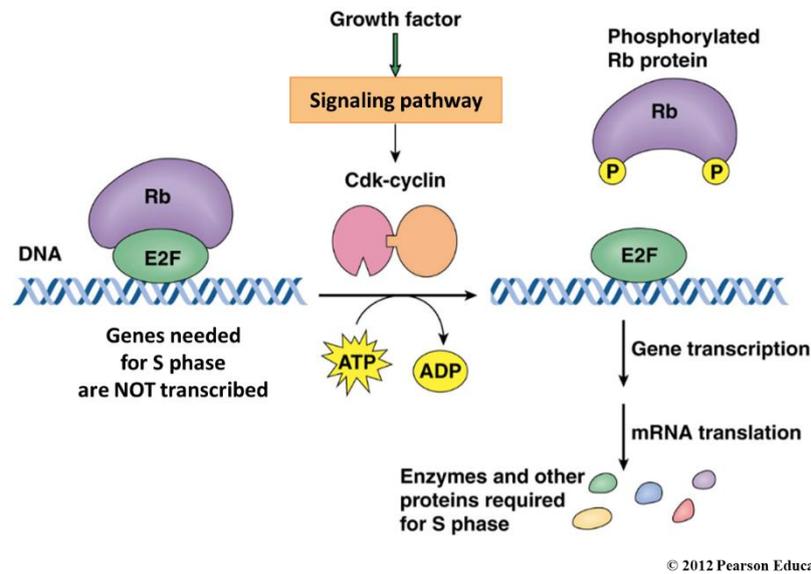


Figure 32 : La protéine Rb déphosphorylée se lie au facteur de transcription E2F. E2F ne peut pas se lier à l'ADN et la transcription est bloquée. Le complexe Cycline D/CDK4 (non représenté) participe à la phosphorylation de Rb. La protéine Rb phosphorylée libère E2F. Ce dernier se lie à l'ADN et active la transcription de gènes permettant ainsi de faire progresser le cycle cellulaire.

Si les conditions sont optimales (qualité et quantité suffisante de facteurs de croissance, de Cyclines D, de complexe Cycline E/CDK2, de pRb hyperphosphorylée...), la cellule passe le **point de restriction** qui correspond au passage, entre la phase G1 précoce et G1 tardive, à partir de laquelle la cellule entrera, de manière irréversible, en phase G1 tardive même en l'absence de facteurs de croissance extracellulaires. Si un défaut de facteurs de croissance survient avant ce point de restriction, alors la progression du cycle cellulaire sera stoppée et la cellule entrera en phase G₀.

Les **Cyclines E et A** commencent à être synthétisées par activation transcriptionnelle partielle dès que pRb est hyperphosphorylée par l'action du complexe Cycline D/CDK4,6. Après libération du facteur E2F, ces mêmes cyclines seront synthétisées *via* une activité transcriptionnelle complète de E2F (Meijer, 2003).

L'état d'hyperphosphorylation de pRb est obtenue de manière séquentielle grâce à l'action, dans un premier temps, des complexes Cycline D/CDK4,6 puis, dans un second temps (en fin de phase G₁), à celle des complexes Cyclines E/A/CDK2. Ces derniers participent au

maintien de cet état de phosphorylation de pRb (Lim and Kaldis, 2013; Sherr and Roberts, 1995; Weinberg, 1995).

De la même manière que les CDK4/6, la **CDK2**, après sa liaison aux cyclines, est activée par la CAK ainsi que par la phosphatase Cdc25A, devenant ainsi fonctionnelle (Pommier and Kohn, 2003).

La **Cycline E** est une protéine participant à la progression de la cellule en phase G₁ active sous forme de complexe avec CDK2. Ainsi, son inhibition peut induire un blocage du cycle cellulaire en G₁ empêchant l'entrée en phase S.

En fin de phase G₁, la p27^{Kip1} est phosphorylée par le complexe Cycline E/CDK2 conduisant à sa dégradation par le protéasome. Ceci contribue en partie à l'entrée en phase S de la cellule (Meijer, 2003; Pommier and Kohn, 2003).

La **Cycline A** joue un rôle dans le passage G₁/S, dans la progression de la phase S (couplée à la CDK2) mais également dans le passage G₂/M (couplée à la CDK1,2) (Viallard et al., 2001).

En fin de phase G₁, il se crée un **complexe dit de « pré-réplication »**. Ce dernier se compose du complexe Orc1-6 (formé de 6 sous-unités se fixant sur l'ADN au niveau des origines de réplication), de l'ATPase Cdc6, du facteur de transcription Cdt1 et du complexe MCM2-7. La formation de ce complexe de molécules est un prérequis, d'une part, pour la transition vers la phase S et d'autre part, pour assurer la réplication de l'ADN. Pour que la synthèse d'ADN puisse avoir lieu, il est nécessaire que d'autres molécules viennent interagir avec le complexe de pré-réplication. En effet, au cours de la transition entre les phases G₁ et S, la protéine MCM10/Dna43 vient se fixer sur ce complexe de pré-réplication. Puis, la Cdc7 va activer ce dernier avant que le complexe Cycline E/CDK2 permette à la Cdc45 de se fixer à son tour sur le complexe de pré-réplication. Par la suite, des protéines vont être recrutées comme par exemple des hélicases, des topoisomérases, des protéines de réplication A (RPA) (Meijer, 2003)...

En fin de phase G₁, le **Cell Cycle Checkpoint G₁/S** permet d'évaluer les conditions internes et externes favorables à la poursuite du cycle cellulaire : taille de la cellule, intégrité de l'ADN. L'arrêt en G₁ est induit par l'activation de p53 en réponse à des dommages à l'ADN.

- Phase S (S pour synthèse)

La progression en phase S est régulée par CDK1,2 associée à la Cycline A (Hochegger et al., 2008; Shapiro, 2002).

De plus, le complexe Cycline E/CDK2 participe à la duplication des centrosomes^a (Pommier and Kohn, 2003).

En parallèle de la duplication de l'ADN, la quantité de Cycline E diminue par dégradation par le protéasome (Viallard et al., 2001) et le complexe Cycline A/CDK2 se lie à E2F et l'empêche de se fixer sur l'ADN (Pommier and Kohn, 2003; Viallard et al., 2001).

- Phase G₂ et début de prophase

La phase G₂ est une phase du cycle qui prépare la cellule à la mitose et au cours de laquelle, les complexes Cycline A/CDK1,2 participent à l'activation du facteur de transcription FOXM1 (Laoukili et al., 2008). Ce dernier va activer des gènes parmi lesquels ceux codant la Cycline B (Laoukili et al., 2005). La transition G₂/M est marquée par l'activation du complexe formé par la CDK1 et la Cycline B (Shapiro, 2002). Cette dernière est une cycline dont la localisation est cytoplasmique au cours de l'interphase et ce jusqu'à l'étape de prophase (Shapiro, 2002; Viallard et al., 2001).

Le complexe Cycline B/CDK1 (ou Cdc2) (Pommier and Kohn, 2003) est rendu inactif par l'action des kinases Wee-1 et Myt-1 qui ciblent les résidus Thr-14 et Tyr-15 de la CDK1 (Hochegger et al., 2008; Yam et al., 2002). Le résidu Thr-161 est quant à lui phosphorylé par la CAK (Meijer, 2003), ce qui participe à l'activation de la CDK1.

Le ***Cell Cycle Checkpoint G₂*** permet d'empêcher le déclenchement de la mitose et de s'assurer qu'elle donnera des cellules filles avec un matériel génétique intact (absence de dommages à l'ADN, réplication de l'ADN correctement déroulé). En cas de défauts réparables dans l'ADN, un arrêt du cycle cellulaire sera induit afin de réparer des dommages détectés : inhibition de l'activation de CDK1 *via* l'intervention d'ATM, ATR et p53 (Shapiro, 2002). Dans le cas contraire, la cellule peut entrer en apoptose empêchant ainsi la transmission de dommages de l'ADN aux cellules filles.

Lorsque la cellule est prête à poursuivre le cycle et à entrer en prophase de la mitose, l'activation de la CDK1 se réalise grâce à l'action de la phosphatase Cdc25C (Pommier and Kohn, 2003) entraînant la migration du complexe Cycline B/CDK1 vers le noyau (Hochegger et al., 2008). Dans le noyau, plusieurs protéines sont impliquées dans la condensation des chromosomes. Parmi elles, la condensine, appartenant aux substrats ciblés par l'association Cycline B/CDK1, va créer un super-enroulement de la molécule d'ADN (Meijer, 2003).

^a Le centrosome est formé de deux centrioles orientés perpendiculairement.

- Phase M (M pour Mitose)

La mitose est essentiellement sous le contrôle du complexe Cycline B/CDK1 (Hochegger et al., 2008).

La **prophase**, comme il a été précisé plus haut, est caractérisée par l'activation du complexe Cycline B/CDK1 et par la condensation des chromosomes répliqués au cours de la phase S (Meijer, 2003). Le complexe CyclineB/CDK1 participe également à la dislocation de l'enveloppe nucléaire en phosphorylant les lamines de type A (Huguet et al., 2019).

A partir de la **métaphase**, la Cycline B commence à subir une ubiquitinylation et une dégradation *via* le protéasome grâce à l'action du complexe à activité ubiquitine ligase : APC/Cdc20 (*Anaphase Promoting Complex*) (Hochegger et al., 2008), formé de plusieurs sous-unités dont l'activation passe par le complexe Cycline B/CDK₁. Au cours de la métaphase, le **Cell Cycle Checkpoint M** permet de s'assurer du bon alignement des chromosomes sur le fuseau mitotique et un arrêt de la mitose a lieu s'ils ne sont pas correctement disposés. La ségrégation des chromatides ne s'effectuera que lorsque les chromosomes seront alignés.

La séparase, qui était initialement inactive sous forme complexée à une autre protéine : la sécurine, va être activée au cours de l'**anaphase**. La phosphorylation de la séparase *via* le complexe Cycline B/CDK1 et l'ubiquitinylation de la sécurine par le complexe APC/Cdc20 vont participer à l'activation de la séparase (Meijer, 2003). Elle va donc pouvoir dégrader la cohésine et ainsi permettre la séparation des chromatides sœurs.

B . 2) La sénescence cellulaire

2 . a) Généralités

La **sénescence** (du latin : *senex* « grand âge ») cellulaire est un état irréversible dans lequel les cellules ne prolifèrent plus, mais demeurent cependant métaboliquement actives (Thorin-Trescases et al., 2010) et continuent généralement leur croissance. Cet état correspond à un **arrêt irréversible du cycle cellulaire en phase G₁**. Les cellules sénescents changent de morphologie et développent un phénotype sécrétoire caractérisé par la libération de multiples molécules constituant le SASP (décrit plus loin). Il s'agit d'un processus moléculaire complexe activé par divers stimuli. Au cours du vieillissement naturel, le nombre de cellules sénescents augmente dans de nombreux tissus. Ces cellules peuvent compromettre les fonctions du tissu dans lequel elles s'accumulent, en modifiant leur environnement cellulaire par un effet paracrine *via* le SASP (remodelage de la matrice extracellulaire, inflammation...). À cet effet délétère s'ajoute une diminution du potentiel de régénération par les cellules souches (perte de la capacité de réparation des tissus endommagés). Ces modifications en lien avec la sénescence cellulaire, d'abord cellulaires puis tissulaires, participent à l'apparition de pathologies liées à l'âge (athérosclérose, ostéoporose, cancers...). Ainsi, même s'il est important de distinguer la sénescence qui est un processus cellulaire, du vieillissement qui est un phénomène naturel survenant à l'échelle de l'organisme, les nombreuses études réalisées *in vitro* et surtout *in vivo*, permettent de conclure à une contribution majeure de la sénescence cellulaire au vieillissement. Le vieillissement est une dégénérescence progressive des fonctions biologiques consécutive au dysfonctionnement graduel des différents systèmes cellulaires de réparation et de maintien de l'homéostasie (processus de régulation par lequel l'organisme maintient les différentes constantes dans les limites des valeurs normales). Ainsi, des dommages irréversibles s'accumulent au sein des cellules, à l'origine de l'induction de leur sénescence.

On distingue deux types de sénescence : la sénescence répllicative et la sénescence prématurée ou induite par le stress (SIPS) (Bischof et al., 2009). Les cellules exposées à un stress cellulaire (surexpression d'oncogènes, dommages de l'ADN non réparés, anomalies des télomères...) peuvent entrer soit en apoptose (mort cellulaire programmée) soit en sénescence.

Le phénomène de « **sénescence répllicative** » a été décrit initialement par Leonard Hayflick dans les années 1960 sur des fibroblastes humains primaires en culture (Ben-Porath

and Weinberg, 2005). Après un certain nombre de divisions cellulaires, des signaux se déclenchent et bloquent la prolifération des cellules (Brondello et al., 2012). L. Hayflick a émis l'hypothèse que le raccourcissement progressif des télomères, à chaque cycle répliatif, pouvait être à l'origine de ce blocage (Brondello et al., 2012; Kuilman et al., 2010). Ainsi, il a été défini la « limite de Hayflick » au-delà de laquelle les télomères ne sont plus fonctionnels, et point de départ de l'entrée en sénescence (Bischof et al., 2009). De ce fait, les cellules normales (contrairement aux cellules tumorales) ne se divisent pas indéfiniment et ont une capacité de prolifération limitée.

A la différence de la sénescence répliatif, la « **sénescence prématurée ou induite par le stress** » peut être déclenchée par différents facteurs : des lésions de l'ADN non réparées ; un stress oxydant ; une surexpression d'oncogènes (par exemple : Myc, Ras...). Cette sénescence est indépendante de la longueur des télomères et du nombre de divisions cellulaires (Brondello et al., 2012; Gire, 2005), mais est cependant morphologiquement et biochimiquement similaire à la sénescence répliatif.

Le phénomène de sénescence associe à l'arrêt irréversible du cycle cellulaire, des modifications morphologiques et fonctionnelles de la cellule (Figure 33) (Gire, 2005). Même si elle contribue au vieillissement de l'organisme par accumulation de cellules sénescents, la sénescence doit être considérée comme un phénomène protecteur. Elle a un rôle suppresseur de tumeur en éliminant des cellules potentiellement cancéreuses.

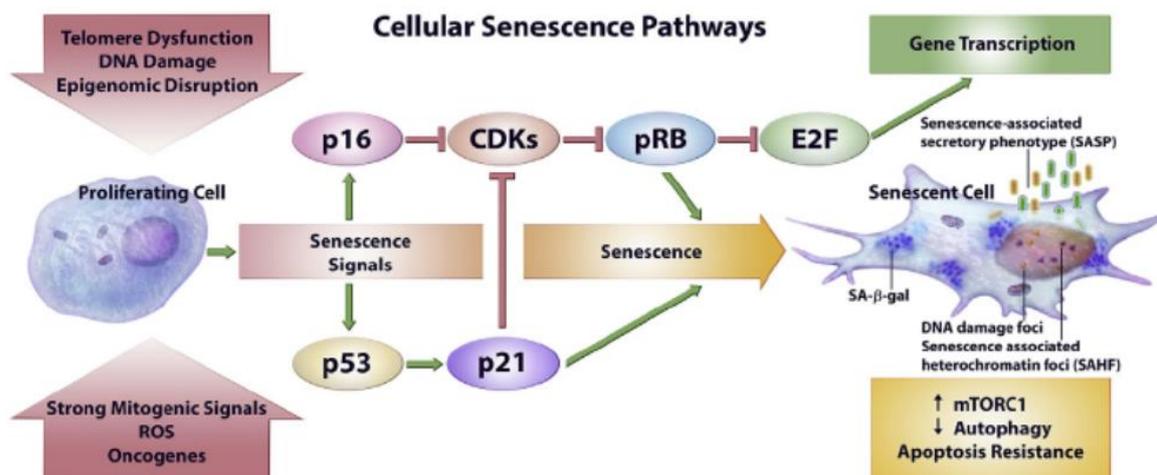


Figure 33 : Des stimuli de la sénescence activent plusieurs voies de signalisation cellulaire conduisant à des modifications morphologiques et fonctionnelles de la cellule (Sultana et al., 2018)

2. b) Mécanismes de la sénescence cellulaire

b. i) Activation des inhibiteurs de CDKs

Comme il a déjà été précisé, le blocage du cycle cellulaire est provoqué par l'inactivation de protéines clés intervenant dans sa régulation, les CDKs. Cette inhibition passe par la mise en jeu de plusieurs protéines et mécanismes associés. Nous ne citerons que de manière très générale quelques mécanismes impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire au cours de la sénescence (Figure 34) :

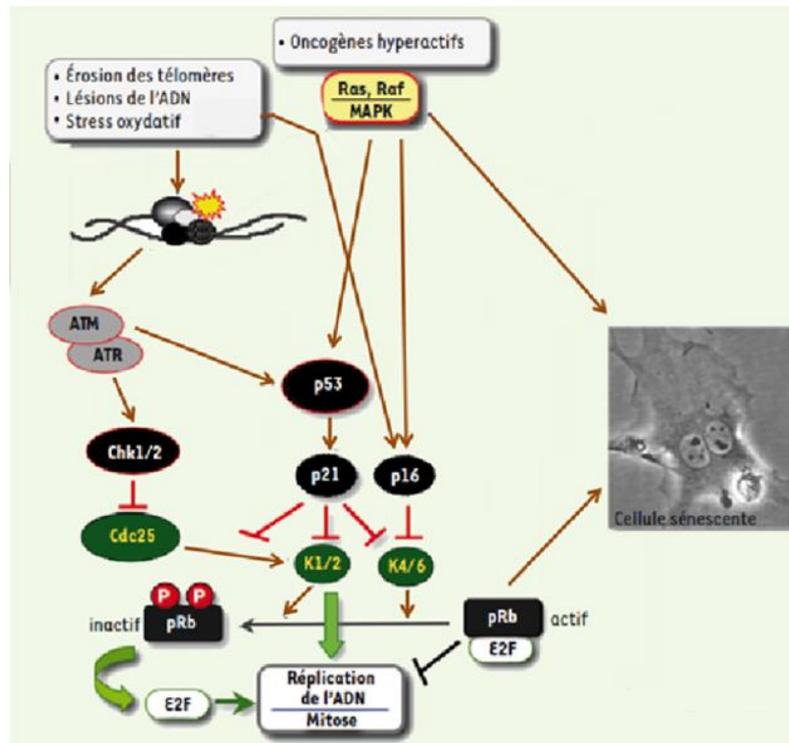


Figure 34 : Mécanismes moléculaires conduisant à l'arrêt irréversible de la division cellulaire (Modifié à partir de (Brondello et al., 2012))

- **L'activation de l'axe p53-p21** induit l'inhibition de plusieurs CDKs intervenant dans différentes phases du cycle cellulaire : CDK4,6 (phase G₁) et CDK1,2 (phases S et M)
- **L'activation des voies ATM et ATR** induit l'activation de p53, mais également l'activation des protéines Chk1,2 qui vont inhiber une protéine activatrice des CDKs : la Cdc25 (Cdc25A en phase G₁ et Cdc25C en phase M)
- **L'activation de la p16^{INK4a}** induit l'inhibition des CDK4,6 spécifiques de la phase G₁ (Brondello et al., 2012)

A terme, ces voies aboutissent à l'inhibition du facteur de transcription E2F. Cette inhibition est responsable de la répression de gènes nécessaires à la poursuite du cycle cellulaire (voir plus haut).

- La « sénescence répllicative »

Comme précisé précédemment, la sénescence répllicative survient dans la majorité des cellules qui se divisent, après un certain nombre de cycles cellulaires. Ce phénomène mis en évidence par Hayflick est lié à la longueur des télomères des cellules concernées. Les télomères sont des structures nucléoprotéiques en forme de boucles protégeant les extrémités des chromosomes des phénomènes de dégradation et de fusion (Gire, 2005). Ces structures sont constituées de séquences d'ADN répétées (TTAGGG), associées à un complexe protéique, le télosome, qui permet le maintien de la structure et des fonctions de ces télomères (Xin et al., 2008).

Au cours du cycle cellulaire, des motifs TTAGGG sont perdus. Une enzyme, la télomérase, est capable de lutter contre ce phénomène de raccourcissement, mais son expression et son activité sont insuffisantes dans la plupart des cellules somatiques pour assurer le maintien de la longueur de ces télomères (Gire, 2005). L'arrêt de la division cellulaire est induit lorsque, à terme, l'érosion des télomères au cours de la réplication des chromosomes a atteint la "limite de Hayflick" considérée par la cellule comme une instabilité génétique ou une cassure de l'ADN (Brondello et al., 2012; Gire, 2005). Ainsi, ce type de sénescence survient après des périodes prolongées de division menant à un éventuel plateau dans la prolifération cellulaire.

La sénescence répllicative est déclenchée en partie par l'activation chronique de p53 due à l'érosion des télomères et par la signalisation des dommages à l'ADN (Chen, 2016).

- La « sénescence prématurée ou induite par le stress »

La sénescence peut également être induite indépendamment de la longueur des télomères. La sénescence prématurée survient par exemple à la suite de dysfonctionnements des télomères, de surexpression d'oncogènes (**Ras, Raf...**), de lésions de l'ADN induites par des ROS et de dysfonctionnements des mitochondries (Figure 35).

Ces inducteurs provoquent la sénescence avant le début de l'épuisement réplcatif et dans le cadre d'activation d'oncogène. Ce type de sénescence représente un véritable mécanisme suppresseur de tumeur, donc protecteur pour l'organisme.

Cette sénescence précoce passe par la formation de dommages au sein des double-brins de l'ADN et par l'activation de p53 et p16.

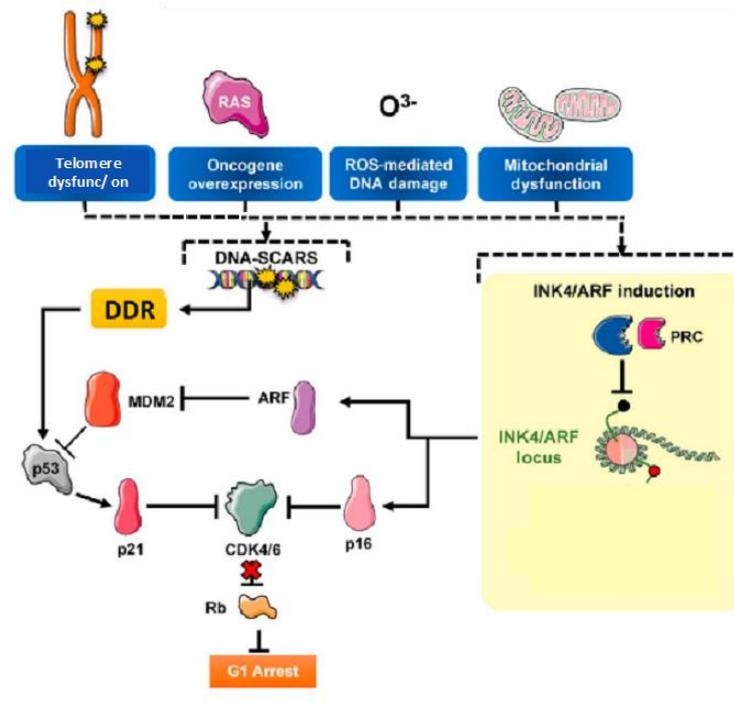


Figure 35 : Facteurs d’activation de la sénescence prématurée (Modifiée à partir de (McHugh and Gil, 2018))

b . ii) Quelques-uns des acteurs clés de la sénescence

▪ **p53**

Comme déjà abordé, p53 est une des protéines clés dans la régulation de la sénescence. En effet, les cellules de souris KO pour p53 n’entrent pas en sénescence, mais le décès de ces animaux survient cependant précocement du fait d’une augmentation du nombre de tumeurs (Donehower et al., 1992). A l’inverse, des souris $p53^{-/m}$, qui expriment une forme tronquée de p53 (allèle *m*) augmentant l’activité de la forme sauvage de p53, présentent un vieillissement prématuré associé à une résistance au développement de tumeurs (Tyner et al., 2002), tandis que les souris portant plusieurs copies du gène codant p53 (appelées souris « super-p53 ») ne présentent pas de vieillissement prématuré, mais sont néanmoins résistantes *vis-à-vis* du développement de tumeurs (García-Cao et al., 2002).

▪ **Stress oxydant (ou oxydatif)**

Le **stress oxydant** est un facteur important dans l’induction de la sénescence. Il correspond à une accumulation excessive d’espèces réactives de l’oxygène (ROS) dans les cellules concernées, non contrôlée par les systèmes cellulaires antioxydants. Les ROS sont principalement produits par la chaîne respiratoire mitochondriale.

Les complexes mitochondriaux laissent échapper des électrons qui induisent la formation, à partir de l'oxygène (O_2), d'espèces chimiques oxygénées très réactives (Figure 36).

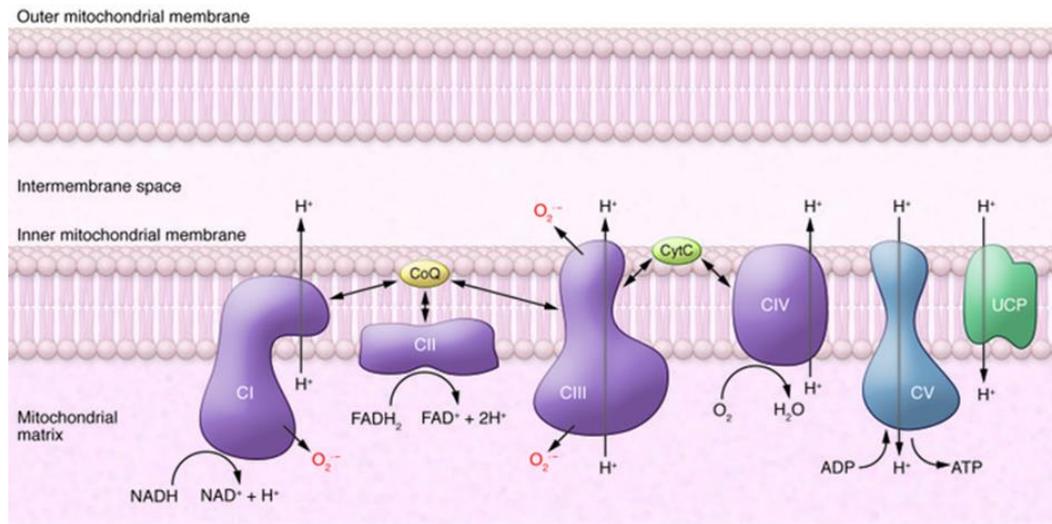


Figure 36 : Représentation schématique des 5 complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale. La phosphorylation oxydative conduit à la formation d'ATP ainsi qu'à la formation de ROS comme par exemple l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) (Bratic and Larsson, 2013).

Ces composés sont instables et sont susceptibles de devenir toxiques en réagissant avec tous les composants cellulaires (ADN, protéines, lipides, glucides) et en perturbant le fonctionnement des cellules et des tissus *via* l'oxydation des lipides, la dénaturation des protéines, des dommages de l'ADN nucléaire et mitochondrial ... Bien que potentiellement délétère pour l'organisme quand les ROS sont en excès, leur production en faible quantité participe au bon fonctionnement de celui-ci. Ils sont ainsi des acteurs de la signalisation cellulaire et de la régulation du métabolisme. Afin de réguler cette production, des agents anti-oxydants enzymatiques (la SOD pour Superoxyde Dismutase, la catalase, la glutathion-peroxydase...) et non-enzymatiques (le glutathion par exemple) entrent en jeu bloquant l'action des ROS. Grâce à cela, il existe au niveau cellulaire, un équilibre dit « REDOX » maintenu par la production de ROS et d'anti-oxydants. Si la production de ROS n'est pas compensée par celle d'antioxydants, un déséquilibre survient, à l'origine d'un stress oxydant.

L'altération de cette balance fait partie des mécanismes impliqués dans l'apparition et la progression de la sénescence. La rupture de cet équilibre peut provenir de plusieurs facteurs : augmentation de la production de ROS, diminution de la défense antioxydante, sensibilité accrue des macromolécules à l'oxydation, système de réparation ou d'élimination des macromolécules endommagées devenu moins efficace... (Viteri et al., 2010).

▪ Voies métaboliques

Certaines voies métaboliques ont été montrée comme clairement impliquées dans le phénomène de vieillissement à l'échelle de l'organisme et la durée de vie des individus. Même si le lien avec la sénescence à l'échelle cellulaire est encore sujet à débat, le résultat de quelques études suggèrent une connexion entre les deux.

L'**IGF-1** (*Insulin-like Growth Factor-1*) est une hormone synthétisée majoritairement dans le foie sous l'influence de l'hormone de croissance GH. IGF-1 est libéré dans la circulation sanguine et exerce de nombreuses actions par l'intermédiaire de son récepteur : **IGF-1R** (croissance des os et des muscles durant le développement fœtal ; croissance postnatale ; régénération du muscle squelettique adulte ; prolifération et survie des cellules des glandes mammaires pendant la puberté, la grossesse, l'allaitement...) (Annunziata et al., 2011). L'activation de IGF-1R active à son tour plusieurs voies de signalisation dont celle de la PI3K et de la MAPK, ainsi que NF-κB.

Plusieurs études *in vivo* dans des modèles animaux ont montré que la voie IGF-1/IGF-1R, dont composants sont conservés parmi les espèces, est impliquée dans le vieillissement et la durée de vie des organismes. Chez *C. elegans*, *daf-2*, l'orthologue du récepteur humain insuline/IGF-1, régule la durée de vie de l'adulte *via* la régulation de facteurs de transcription dont FoxO codé par le gène *daf-16*. Ce dernier joue un rôle majeur en maintenant l'homéostasie dans des conditions de stress (Denzel et al., 2019). L'orthologue chez *C. elegans* du gène suppresseur de tumeur humain PTEN, appelé *daf-18*, a également été décrit comme un facteur clé régulant la durée de vie de l'adulte *via* un contrôle de l'activité de *daf-16* (Masse et al., 2005). Les mutants *daf-2*, qui présentent une durée de vie accrue, ont une augmentation de l'activité mitochondriale associée à une réduction de la quantité de ROS en lien avec une augmentation de quantité d'anti-oxydants (Zarse et al., 2012). La restriction calorique, très utilisée dans l'étude du vieillissement chez *C. elegans*, induit une augmentation de la longévité du ver *via* différents mécanismes dont la répression de *daf-2* (Kapahi et al., 2017). L'inactivation hétérozygote chez la souris de *Igf-1R* (*Igf-1r^{+/-}*), qui réduit théoriquement le nombre de récepteurs de moitié, prolonge sa durée de vie par rapport à son contrôle sauvage, entraîne une résistance accrue au stress oxydant (stress oxydant induit par injection d'un herbicide) et conduit à la diminution de l'activation des voies de signalisation en lien avec IGF-1 (Holzenberger et al., 2003). Dans le modèle murin *Zmpste24^{-/-}*, Mariño et al., montrent que l'administration d'IGF-1 humain recombinant (rIGF-1) améliore des caractères progéroïdes comme par exemple le poids corporel, le degré d'alopecie et la longévité (Mariño et al., 2010).

En 2014, Tran *et al.* ont fait le lien entre l'implication de cette voie dans le vieillissement à l'échelle de l'organisme et son rôle dans la sénescence à l'échelle cellulaire (Tran et al., 2014). Dans cette étude, les auteurs montrent que, alors qu'une exposition courte de fibroblastes humains induit une prolifération cellulaire, une exposition prolongée induit une sénescence (augmentation du nombre de cellules positives à la β -galactosidase acide), en lien avec l'activation de l'axe p53/p21. Il est montré que l'activation de p53 est secondaire à l'inhibition de SIRT1 (Cf. ci-dessous) par l'IGF-1 entraînant une stabilisation de p53 par une augmentation de son acétylation.

L'hormone Klotho inhibe l'autophosphorylation du récepteur à l'insuline et celui de IGF-1 (IGF-1R) conduisant à la répression des voies de signalisation intracellulaire dépendantes de ces derniers avec par exemple, la régulation négative de certains types de facteurs de transcription appartenant à la famille FOXO. Deux orthologues de Klotho (CeKlotho) ont été décrits chez *C. elegans* (Château et al., 2010). L'inactivation de *CeKlotho* réduit la durée de vie du ver et les données expérimentales sont en faveur d'une conservation du mécanisme de régulation du récepteur insuline/IGF-1 entre *C. elegans* et les mammifères (Solari, 2010). Par exemple, *Kuro-o et al.*, ont montré que les souris homozygotes déficientes en Klotho (génotype *kl/kl*) exprimaient un syndrome similaire au vieillissement humain (durée de vie diminuée, atrophie de la peau, ostéoporose...) (Kuro-o et al., 1997). À l'inverse, *Kurosu et al.*, ont montré que les souris surexprimant Klotho (génotype *EFmKL46* ou *EFmKL48* : mutation dans le site actif de type β -glucosidase situé dans le domaine extracellulaire de Klotho) avaient notamment une durée de vie allongée, une résistance à l'insuline et à IGF-1... (Kurosu, 2005). Dans une étude menée sur des fibroblastes humains, *De Oliveira et al.*, montrent que l'inhibition de l'expression de Klotho (*via* l'utilisation d'un ARN interférent) induit une sénescence prématurée (perte de prolifération, cellules sénescents élevées, accumulation de cellule en phase G0/G1...) en activant la voie de l'insuline/IGF-1 et de p21 (de Oliveira, 2006).

SIRT1 (Sirtuine 1) est une enzyme de type désacétylase régulant divers processus en désacétylant des histones, des facteurs de transcription (FOXO : stress oxydant, autophagie ; NF- κ B : inflammation, stress oxydant ; NRF2 (*Nuclear Factor (erythroid-derived) like 2* ou *NFE2L2*) : équilibre redox, autophagie), des protéines (PGC-1 α : co-activateur transcriptionnel de protéines mitochondriales ; ATG5, ATG7, ATG8 : autophagie) ... L'étude menée par *Sato et al.*, montrent que des souris transgéniques surexprimant une Sirt1 spécifique du cerveau avaient une durée de vie prolongée et un retard du vieillissement *via* la régulation d'une voie

neuronale^a stimulant le muscle squelettique (activité physique, température du corps, consommation d'oxygène, activité mitochondriale) et améliorant la qualité du sommeil. L'ensemble de ces améliorations contribuant au maintien d'une physiologie jeune (Satoh et al., 2013). Sirt1 est également impliqué dans la régulation de la voie du stress oxydant. Des études menées dans le muscle cardiaque de souris ont révélé que la surexpression modérée de Sirt1 était à l'origine d'une protection contre le stress oxydant *via* l'augmentation de l'expression de la catalase, un antioxydant majeur. L'expression de cette dernière est induite par le facteur de transcription FOXO. Sirt1 régule également la voie impliquant NF-κB et est capable de diminuer la production de ROS ou de diminuer les capacités de défense anti-oxydante de la cellule. Sirt1 intervient aussi au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale et régule de cette manière la production de ROS. Enfin, parmi les cibles de Sirt1, il est intéressant de citer la protéine p53 (Salminen et al., 2013). Des travaux menés par *Herranz et al.* montrent que des souris surexprimant Sirt1 n'ont pas de durée de vie augmentée, mais ont présentent un vieillissement en « meilleure santé » par rapport aux témoins avec par exemple : diminution de l'intolérance au glucose (donc amélioration de la protection des dommages métaboliques liés au vieillissement), densité osseuse conservée... Au niveau moléculaire, les souris âgées surexprimant Sirt1 présentent au niveau du foie une diminution de p16^{INK4a}, ainsi que de la 53BP1. Ces 2 molécules sont des marqueurs de la sénescence cellulaire (Herranz et al., 2010).

Ainsi, IGF-1, Klotho et SIRT1 sont des protéines qui pourraient participer au vieillissement de l'organisme *via* la modulation de voies cellulaires impliquées dans la sénescence des cellules.

- **Autophagie**

L'**autophagie** est également un mécanisme régulateur de la sénescence. L'autophagie est un processus dynamique de dégradation de matériel cellulaire qui contribue au maintien de l'homéostasie cellulaire. Elle favorise la survie des cellules en éliminant, par exemple, des protéines mal configurées, des organites ne fonctionnant pas correctement (mitochondries, réticulum endoplasmiques), des agents pathogènes intracellulaires... Plusieurs types d'autophagie ont été décrits, dont la **macroautophagie** qui est le mieux caractérisé. De manière très générale et non-exhaustive, nous allons présenter les différentes étapes de la macroautophagie, que nous appellerons autophagie. Au cours de l'étape de **nucléation**, une

^a Sirt1/Nkx2-1 (*Nk2 homeobox 1*)/Ox2r (récepteur 2 de l'orexine)

structure appelée « phagophore » est formée et est caractérisée par la présence d'un complexe multiprotéique (contenant par exemple des protéines de type ATG, Beclin-1, PI3KC3...) au niveau de sa membrane. **L'élongation** est l'étape au cours de laquelle le phagophore s'allonge, puis se ferme autour du matériel cytosolique en formant une structure appelée « **autophagosome** ». Cette étape fait intervenir de nombreuses protéines dont LC3-I et LC3-II (dont le ratio LC3-II/LC3-I est utilisé afin d'apprécier la formation des autophagosomes). Enfin, l'étape de **maturation** correspond à la fusion de l'autophagosome avec le lysosome en une structure appelée « **autolysosome** ». Au sein de cette structure, le matériel est alors dégradé.

L'autophagie est un phénomène régulé par de nombreux acteurs dont le principal est le complexe **mTORC1** (*mammalian Target Of Rapamycin Complex 1*) qui inhibe la formation de l'autophagosome. Nous pouvons citer d'autres modulateurs de l'autophagie comme par exemple SIRT1, l'AMPK (*AMP-activated protein Kinase*)... (Figure 37).

Des miRNAs interviennent également dans cette régulation comme par exemple les miRs-376a-3p et -376b-3p (Beclin-1, ATG4), miR-204 (LC3)...

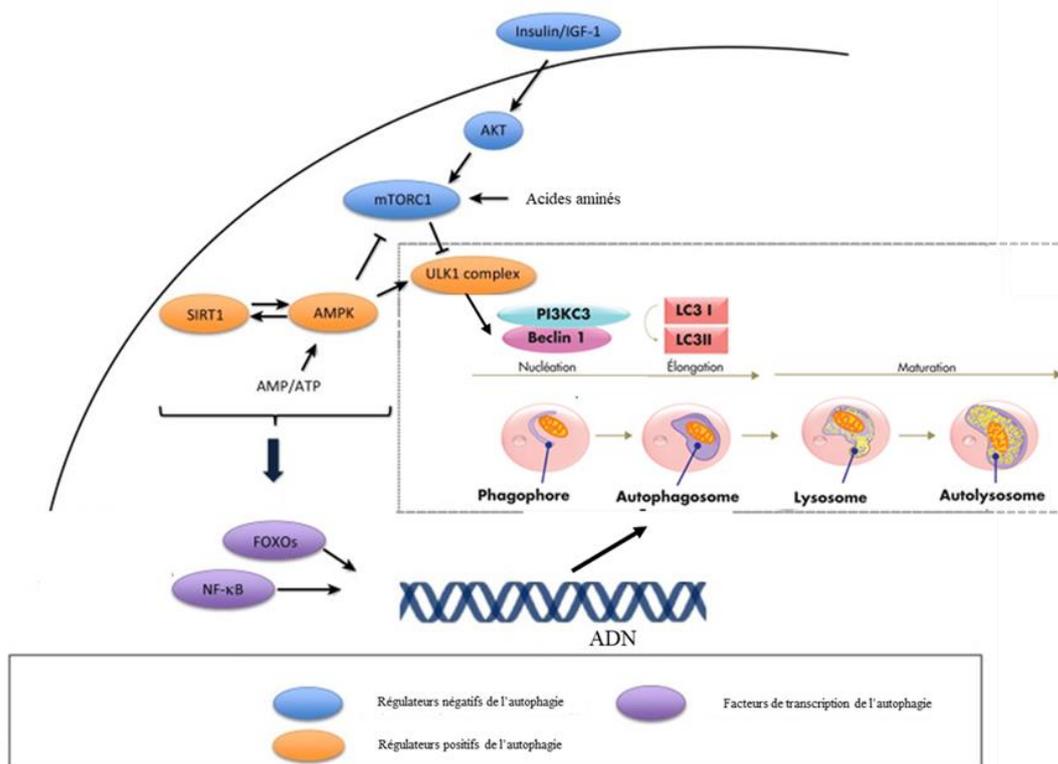


Figure 37 : Mécanismes moléculaires et régulation de l'autophagie : la **nucléation** correspond au recrutement de complexes protéiques (PI3KC3-Beclin-1) au niveau de la membrane du phagophore. **L'élongation** est une étape durant laquelle l'autophagosome encapsule le matériel cytosolique. La protéine membranaire LC3II est activée par clivage à partir de la forme LC3I cytosolique. Au cours de la **maturation**, l'autophagosome fusionne avec un lysosome afin de créer un autolysosome. Le contenu de cet autolysosome sera par la suite dégradé et éventuellement recyclé (**Modifié à partir de (Zhang et al., 2016)**)

Dans des fibroblastes humains, l'inhibition par des siRNAs de protéines intervenant dans la formation des autophagosomes (ATG7 et Lamp2) induit l'activation d'une sénescence précoce de ces cellules : positivité élevée à la β -galactosidase, taille plus importante des cellules, augmentation de p53, p21, p16, de la quantité de ROS, dysfonctionnement des mitochondries et des lysosomes... (Kang et al., 2011).

L'autophagie contribue également à réduire le stress oxydant *via* l'élimination de mitochondries (mitophagie) présentant un dysfonctionnement et générant des ROS. Par ce mécanisme, elle contrôle indirectement la sénescence cellulaire. Lors d'un stress oxydant, la production de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) peut oxyder la protéine ATG4 (*Autophagy Related 4C Cysteine Peptidase*), impliquée dans la formation des autophagosomes, et induire une augmentation de l'activité autophagique. De même, l'activation de l'AMPK (par exemple par une augmentation d'AMP intracellulaire, par SIRT1...) va inhiber la protéine mTOR et favoriser l'activation de l'autophagie (Poillet-Perez et al., 2015).

L'activation de l'autophagie est un des mécanismes ciblés par des stratégies thérapeutiques en vue d'induire la dégradation de la progérine.

- **microARNs (ou miRNAs)**

Les microARNs (Cf. ci-dessous) appartiennent également aux régulateurs connus de la sénescence. Ils contrôlent l'expression de gènes codant des protéines clefs de la sénescence comme par exemple p53, p21, p16 et pRb (Figure 38).

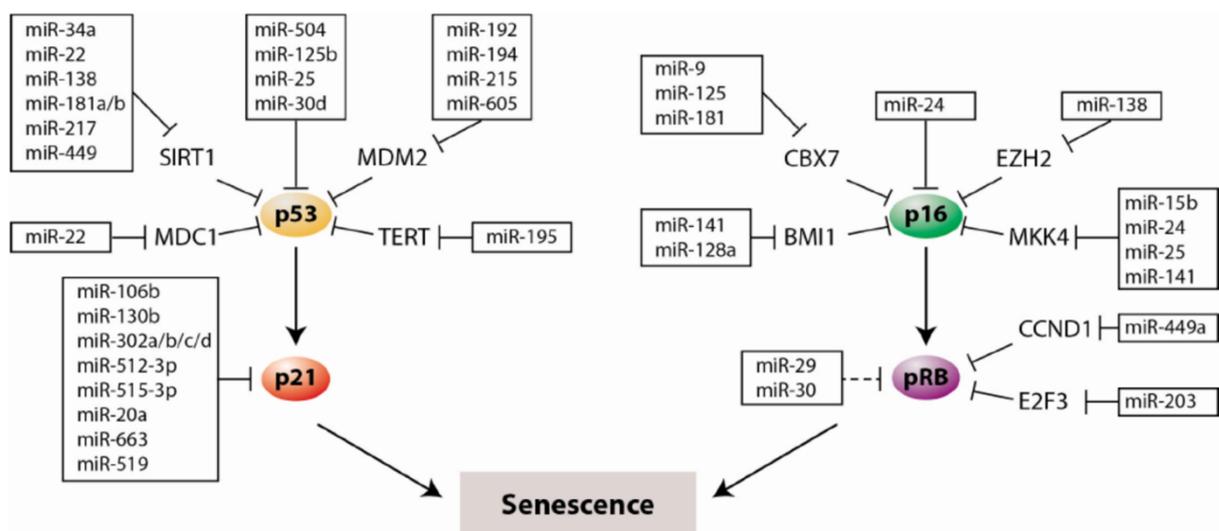


Figure 38 : Exemples de miRNAs modulant des voies de signalisation importantes dans la sénescence cellulaire (Suh, 2018)

Des protéines impliquées dans des mécanismes cellulaires comme par exemple le stress oxydant, le maintien de l'intégrité de l'ADN...peuvent être modulées par des microARNs et ainsi être impliquées dans l'induction et/ou la progression de la sénescence. Par exemple, le miR-34a cible la région 3'UTR de l'ARNm de SIRT1. Les miRs-93, -214 et -669c, retrouvés surexprimés dans le foie de souris âgées, ciblent des enzymes de la famille des glutathion S-transférases impliquées, notamment dans l'élimination de ROS, de détoxification ... (Bu et al., 2017). Dans des fibroblastes dermiques humains, la surexpression du miR-24 induit celle de la Topoisomérase 1 ou TOP1 (enzyme qui contrôle la structure de l'ADN en coupant les 2 brins de l'ADN), de p16 et de p53. L'accumulation de TOP1 conduit à un excès de cassures doubles brins de l'ADN et favorise ainsi l'instabilité génomique responsable d'une sénescence prématurée (Bu et al., 2016).

2 . c) **Caractéristiques de la cellule sénescence**

Une cellule sénescence possède un phénotype caractérisé notamment par : une morphologie élargie et plate ; une activité de la β -galactosidase acide (pH=6) devenue détectable ; une augmentation des taux de p53, p21^{WAF1} et p16^{INK4a} ; une production élevée de ROS ; des niveaux élevés de dommages à l'ADN...

c . i) **Modifications cytomorphologiques**

L'observation de cellules sénescences montre une altération de leur morphologie cellulaire. Elles apparaissent aplaties avec une vacuolisation de leur cytoplasme et une augmentation de leur volume nucléaire (Figure 39).

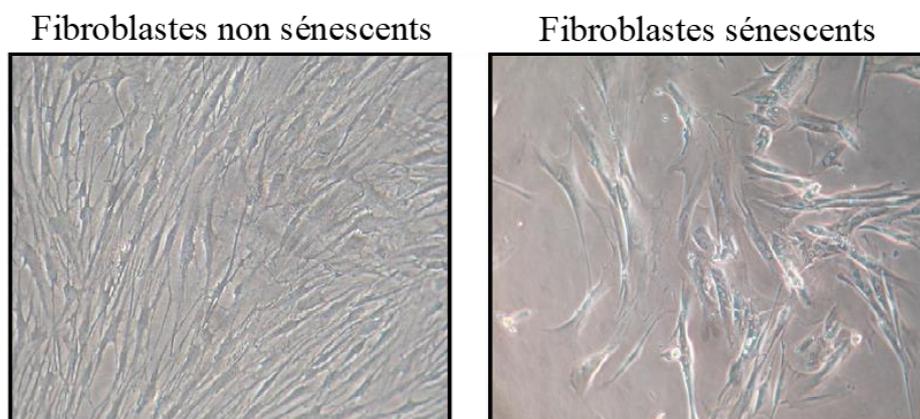


Figure 39 : Fibroblastes non sénescents (à gauche) et sénescents (à droite) observés au microscope à contraste de phase (Objectif x 100) (Modifié à partir de (Menicacci et al., 2017))

c . ii) Modifications de l'expression des cyclines et des CDKs

La **Cycline D1** est **surexprimée** dans des fibroblastes humains sénescents (Han et al., 1999) ou des cellules musculaires lisses vasculaires humaines sénescents (Burton et al., 2007). Cette surexpression, également observée dans des cellules mammaires épithéliales de souris, est décrite comme étant étroitement liée à une augmentation de la proportion de cellules en phase G₀/G₁, illustrant bien un **blocage du cycle cellulaire** caractéristique des cellules sénescents. De plus, lorsqu'elle est surexprimée, la Cycline D1 semble induire une élévation de l'expression d'inhibiteurs de CDKs dont la protéine **p27^{Kip1}** (Han et al., 1999) qui participe à l'arrêt du cycle cellulaire. Une autre cycline, la **Cycline E**, est également surexprimée dans les cellules sénescents (Lucibello et al., 1993). À l'inverse, l'expression des **Cyclines A et B** est diminuée au sein de cellules sénescents (Lucibello et al., 1993). L'activité du complexe **Cycline E/CDK2** est diminuée dans des cellules endothéliales sénescents et peut s'expliquer à la fois par la **baisse de la quantité de CDK2** et par **l'activation de la p21^{Cip1/Waf1}** (en réponse à l'activation de la voie de la p53) (Freedman and Folkman, 2005).

NF-κB, un facteur de transcription (détaillé plus loin), est aussi activé dans les cellules sénescents (Rayess et al., 2012), en lien avec une inflammation chronique à bas bruit dans ces cellules.

La quantité de protéine **p16^{INK4a}** est **augmentée** dans les cellules sénescents et constitue un biomarqueur cellulaire de sénescence.

c . iii) Expression de la β-galactosidase acide (pH = 6)

Au cours de la sénescence cellulaire, la biogenèse des lysosomes est augmentée créant une **surexpression** d'une enzyme lysosomale active à pH acide : **la β-galactosidase**. Cette protéine est spécifique des cellules sénescents.

En raison du lien étroit entre l'activité de la β-galactosidase et le phénotype de sénescence, on pourra parler de SA-βgal (*Senescence-Associated β-galactosidase*). Cette enzyme permet de détecter les cellules sénescents dans des tissus *in situ* ou en culture cellulaire, montrant ainsi que les cellules sénescents s'accumulent *in vivo* avec l'âge (Campisi, 2013).

c . iv) Dysfonctionnement mitochondrial

L'implication des mitochondries dans le vieillissement a été étudiée selon deux théories distinctes où, de manière très succincte, la 1^{ère} hypothèse repose sur la génération accrue de ROS par la mitochondrie au cours du vieillissement et la 2^{nde} sur l'ADN mitochondrial accumulant des mutations avec l'âge (Shi et al., 2018). Néanmoins, ces 2 théories semblent être interdépendantes et contribuer aux nombreuses modifications survenant progressivement au sein des mitochondries au cours du vieillissement.

Plusieurs études ont montré qu'une altération de la dynamique mitochondriale (correspondant aux processus de fission et de fusion qui régulent la morphologie et le nombre de mitochondries) (Figure 40 A) pouvait être impliquée dans le vieillissement ainsi que dans des pathologies liées à l'âge (Srivastava, 2017). La modification de l'expression de protéines de fusion ou de fission semble avoir un rôle dans l'altération de cette dynamique (Rose et al., 2017; Srivastava, 2017).

Les mitochondries des cellules sénescents présentent d'autres altérations comme notamment une diminution de la synthèse d'ATP par phosphorylation oxydative (Habiballa et al., 2019), une production plus importante de ROS et une diminution des niveaux d'antioxydants endogènes. Ce déséquilibre entre la formation et l'élimination des radicaux libres participe à la vulnérabilité des mitochondries, car ces dernières accumulent progressivement des dommages oxydatifs au niveau de leurs constituants (protéines, lipides, ADN mitochondrial ou ADNmt) (Figure 40 B).

La mitophagie (ou autophagie mitochondriale) est un processus qui implique une élimination sélective des mitochondries endommagées, présentant un dysfonctionnement ou en excès (Srivastava, 2017). Des études ont montré qu'une modification de l'activité mitophagique avait un impact sur le fonctionnement des mitochondries. Par exemple, la mitophagie est décrite comme réduite au cours du vieillissement dans divers tissus (Rose et al., 2017) (Figure 39 C).

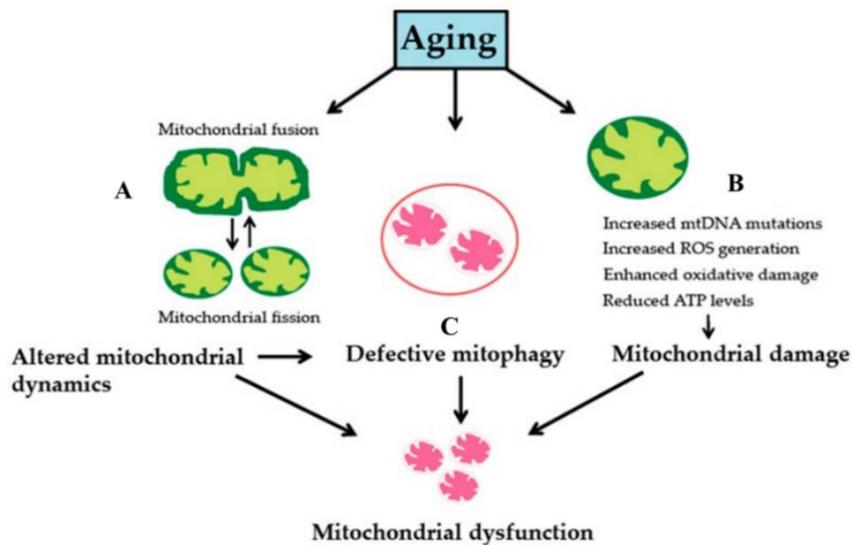


Figure 40 : Dysfonctionnement mitochondrial au cours du vieillissement (Srivastava, 2017)

Les altérations citées précédemment participent au dysfonctionnement mitochondrial observé avec l'âge et interviennent dans la sénescence cellulaire. La participation à ce processus se réalise par exemple *via* différents effecteurs (Figure 41) dont nous pouvons citer à titre d'exemples : les ROS, le NADH, l'AMP, les DAMPs (*Damage-Associated Molecular Patterns*) (Habiballa et al., 2019)... Ces effecteurs constituent des molécules de signalisation qui interviennent dans la communication intracellulaire et intercellulaire.

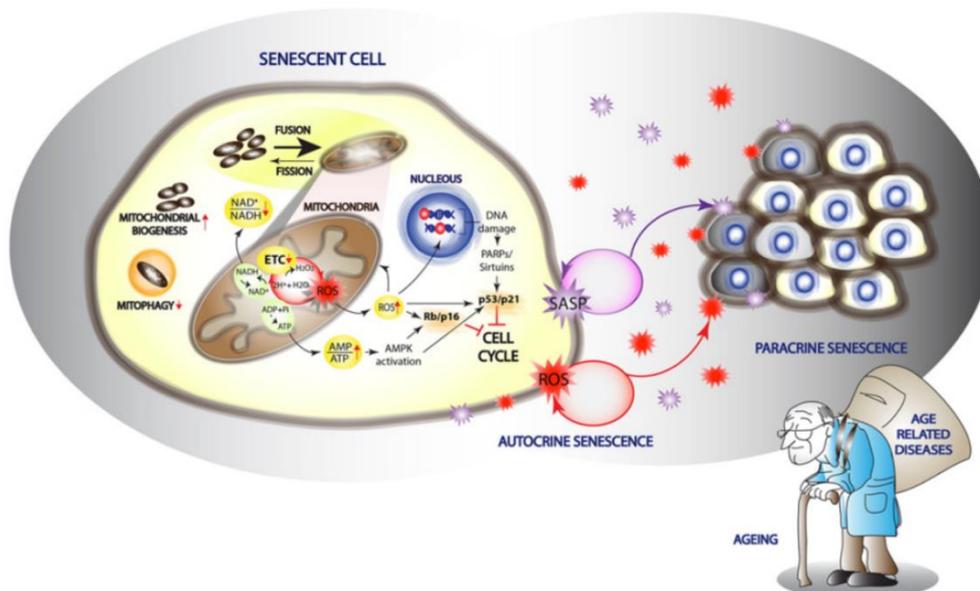


Figure 41 : Exemples d'effecteurs mitochondriaux impliqués dans le phénomène de sénescence cellulaire (Correia-Melo and Passos, 2015)

c . v) Modifications chromatinienne

Les cellules en sénescence peuvent contenir, au sein de leurs noyaux, des foyers appelés SAHF (*Senescence-Associated Heterochromatic Foci*) (Brondello et al., 2012).

Les SAHF sont des foyers de chromatine denses, colorés et ponctués qui correspondent à de l'hétérochromatine facultative, qui renferme les gènes transcriptionnellement "éteints".

De manière très générale, la formation de chaque SAHF résulte de la condensation d'un chromosome, modulée par les protéines ASF1a (*Anti-Silencing Function 1A Histone Chaperone*) et HIRA (*Histone Cell Cycle Regulator*), ainsi que de la fixation de protéines sur cette chromatine condensée, dont on peut citer par exemple : la HP1 γ (*Heterochromatin Protein 1*), l'histone macroH2A et la HMGA (*High Mobility Group*) (Zhang and Adams, 2007) (Zhang et al., 2007) (Figure 42).

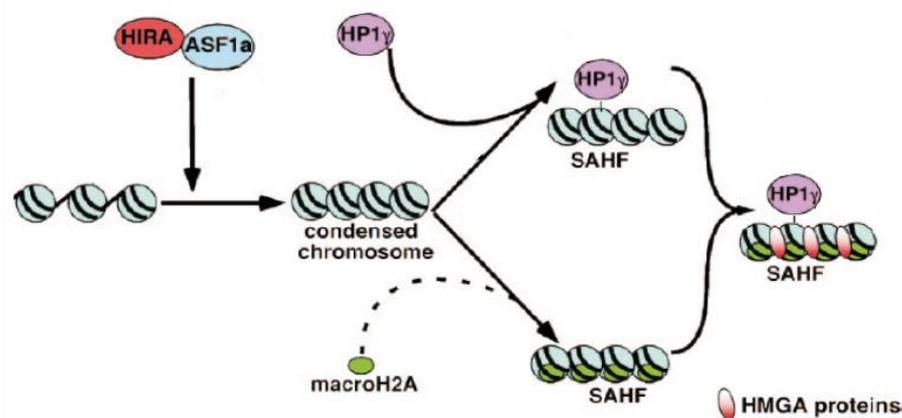


Figure 42 : Formation de SAHF dans les cellules humaines sénescentes (Modifié à partir de (Zhang et al., 2007))

Ces régions de SAHF jouent un rôle dans la séquestration de gènes impliqués dans la prolifération cellulaire. Ces foyers de chromatine réduisent l'expression de gènes assurant la prolifération des cellules, comme par exemple : le gène codant la Cycline A, le facteur de transcription E2F (Zhang and Adams, 2007)...

c . vi) Expression de GeromiRs

Le terme de « **GeromiRs** » regroupe les microARNs potentiellement impliqués dans le vieillissement cellulaire ainsi que dans les pathologies qui lui sont liées, *via* la régulation de l'expression de protéines clés de la sénescence (Tableau 3). Les « GeromiRs » interviennent dans une ou plusieurs voies impliquées dans le vieillissement cellulaire (Figure 43).

miRNA	Targets	Species	Pathway
<i>lin-4</i>	<i>lin-14</i>	<i>C. elegans</i>	Insulin/Igf-1
miR-71, miR-238, miR-239, miR-246	Not validated	<i>C. elegans</i>	Insulin/Igf-1, DDR
miR-29	Ppm1d	Mouse	DDR-p53
	p85 α , CDC42	Human	DDR-p53
miR-29, miR-30	B-MYB	Human	E2F/Rb-B-Myb
miR-1	Igf-1	Mouse	Insulin/Igf-1
miR-20a	Lrf	Mouse	p19-p53
miR-24	p16INK4a	Human	p16-pRb
miR-106a	p21CDKN1a	Human	p53-p21
miR-146a/b	IRAK1	Human	IL-1-IRAK-NF κ B
	NOX4	Human	NOX4-ROS-senescence
miR-200c	ZEB1	Human	ZEB1-p21
	BMI	Human	BMI-1-p16/p21
miR-217	SIRT1	Human	SIRT1-p53
miR-34	SIRT1	Human	SIRT1-p53
miR-519	HuR	Human	HuR-SIRT1-p53
miR-22	SIRT1, CDK6, SP1	Human	p53/pRb
let-7b	HMGGA2	Human	HMGGA2-p16/p19
miR-23a, miR-26a, miR-30	HMGGA22	Human	HDAC-HMGGA2-p16/p21
miR-214	EZH2	Human	EZH2-p16/p21
miR-33	TP53	Human	p53-DDR

Tableau 3 : miRNAs associés au vieillissement dans différents organismes (Ugalde et al., 2011)

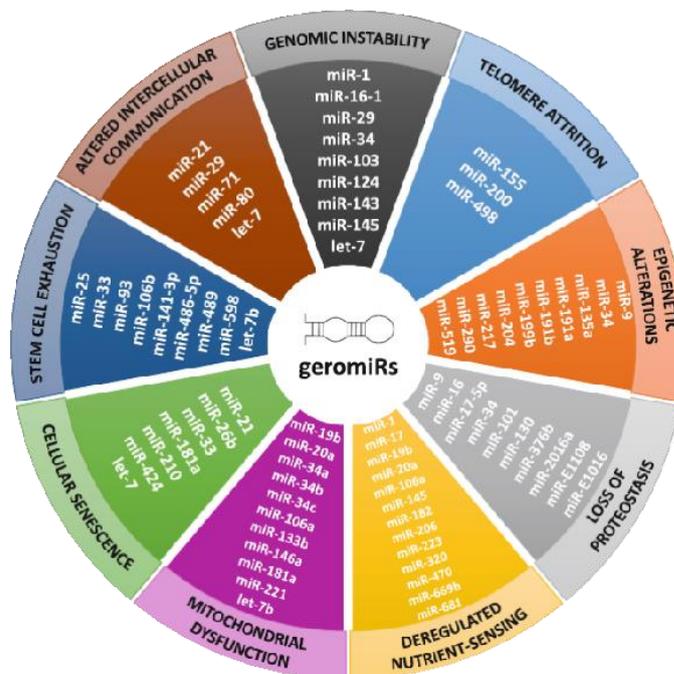


Figure 43 : GeromiRs régulant les mécanismes du vieillissement cellulaire : instabilité génomique, raccourcissement des télomères, régulation épigénétique, perte de l'homéostasie protéique, dérégulation des voies de détection des nutriments (glucose, acides aminés par exemple), dysfonctionnement mitochondrial, sénescence cellulaire, épuisement des cellules souches, altération de la communication intercellulaire (Caravia and López-Otín, 2015)

c . vii) Inflamm'aging

Le terme « **Inflamm'aging** » fait référence à un phénotype pro-inflammatoire de bas-grade qui est observé au cours du vieillissement chez les mammifères, dans les cellules

sénescentes. L'expression de gènes liés à l'inflammation et aux réponses immunitaires est augmentée, les taux de cytokines (IL-6, TNF- α) sont plus élevés, le facteur NF- κ B, qui est le régulateur principal des réponses inflammatoires, est activé. Des complexes multiprotéiques appelés « inflammasomes », sont des activateurs intracellulaires de la réponse inflammatoire capables de reconnaître un grand nombre de signaux. Les inflammasomes peuvent être considérés comme des récepteurs dont il existe plusieurs familles. Par exemple, l'inflammasome NLRP3 (formé d'un récepteur NLR, d'une protéine adaptatrice et d'une protéine effectrice de la famille des caspases), une fois activé, recrute et active la caspase inflammatoire CASP-1 qui à son tour active des précurseurs de cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β , IL-18).

De nombreux facteurs et voies cellulaires participent au déclenchement de cet état inflammatoire : une diminution de l'activité autophagique au cours du vieillissement cellulaire, un taux élevé de ROS, la voie NF- κ B, des agents pathogènes ... (Salminen et al., 2012).

c . viii) SASP (Senescence-Associated Secretory Phenotype)

En devenant sénescentes, les cellules cessent de se diviser mais demeurent métaboliquement actives, et sécrètent certaines molécules dans leur environnement (Wang et al., 2017) : l'interleukine-6 (IL-6 = cytokine pro-inflammatoire), l'interleukine-8 (IL-8 = cytokine chimiotactique), l'*Insulin-Like Growth Factor* (IGF = facteur de croissance), les métalloprotéases matricielles (MMPs = enzymes protéolytiques ciblant des protéines de la matrice extracellulaire), des ROS... L'ensemble de ces molécules forme un sécrétome spécifique, le **SASP**, qui possède une activité autocrine et paracrine (Birch et al., 2018). La sécrétion autocrine est un mode de signalisation cellulaire où les molécules sécrétées vont agir sur la cellule les produisant. Dans la sécrétion paracrine, les molécules sécrétées vont agir dans l'environnement proche de la cellule qui les a synthétisées : la sénescence peut être transmise à des cellules voisines (Birch et al., 2018; Bischof et al., 2009; Coppé et al., 2010). Le SASP est notamment responsable de réponses inflammatoires, de remaniements de la matrice extracellulaire, de renforcements de la sénescence, de la modulation du microenvironnement tissulaire...

I. C) MicroARNs : rôles physiologiques et implication en pathologie humaine

C. 1) Définition

Les microARNs (miRNAs) sont des petits ARNs non-codants composés d'environ une vingtaine de nucléotides qui régulent l'expression des gènes en se fixant, associés à des protéines spécifiques (les protéines Argonautes (AGO)), sur des sites spécifiques localisés au niveau de la région 3'UTR de l'ARNm (Gebert and MacRae, 2019).

Les miRNAs constituent une classe de régulateurs géniques que l'on retrouve chez de très nombreux organismes tels que les animaux, les plantes et les virus, mais qui sont absents des organismes unicellulaires (bactéries, levures). La voie de biogenèse des miRNAs, ainsi que les mécanismes de régulation de leurs cibles, sont très différents entre ces organismes.

Au moment de l'écriture de ce manuscrit, la base de données *miRBase*^a recense 1 917 pré-miARNs et 2 654 miRNAs matures chez l'*Homo sapiens* (Gebert and MacRae, 2019).

Le premier miRNA identifié, *lin-4*, a été découvert en 1993 chez *C. elegans*. Ce miRNA est produit par le gène *lin-4* et régule de manière négative l'expression de la protéine *lin-14* (Gebert and MacRae, 2019; Lee et al., 1993). Les gènes *lin-4* et *lin-14* participent au contrôle temporel du développement post-embryonnaire de ce nématode.

En 2000, un second miRNA, *let-7*, a été découvert chez *C. elegans*. Il est responsable de l'inhibition de l'expression de la protéine *lin-41* qui est impliquée dans la transition du stade larvaire à l'âge adulte (Reinhart et al., 2000).

C. 2) Synthèse

2. a) Synthèse canonique des miRNAs (Figures 44 et 45)

Les gènes des miRNAs peuvent être localisés au sein d'introns (majorité des cas) ou d'exons (rares) d'unité transcriptionnelle de gène codant une protéine ou de gène non-codant (miRNAs intragéniques). Ils ont alors le même promoteur que le gène dans lequel ils sont situés, leur transcription étant alors dépendante de ce même gène. A l'inverse, les miRNAs peuvent être intergéniques et dans ce cas, ils sont transcrits sous la dépendance d'un promoteur propre, avec une transcription indépendante (Figure 44).

^a <http://www.mirbase.org/>

Les miRNAs peuvent être transcrits de manière isolée ou en groupes. Dans ce dernier cas, le terme de « *cluster* » est utilisé pour désigner un ensemble de gènes de miRNAs adjacents sur un même chromosome. Les miRNAs appartenant à un *cluster* sont transcrits simultanément sous forme d'un long pri-miRNA et plusieurs pré-miRNAs sont produits à partir de ce transcrit (Dambal et al., 2015). Un *cluster* peut contenir des miRNAs appartenant à la même famille, possédant la même séquence de reconnaissance à l'ARNm.

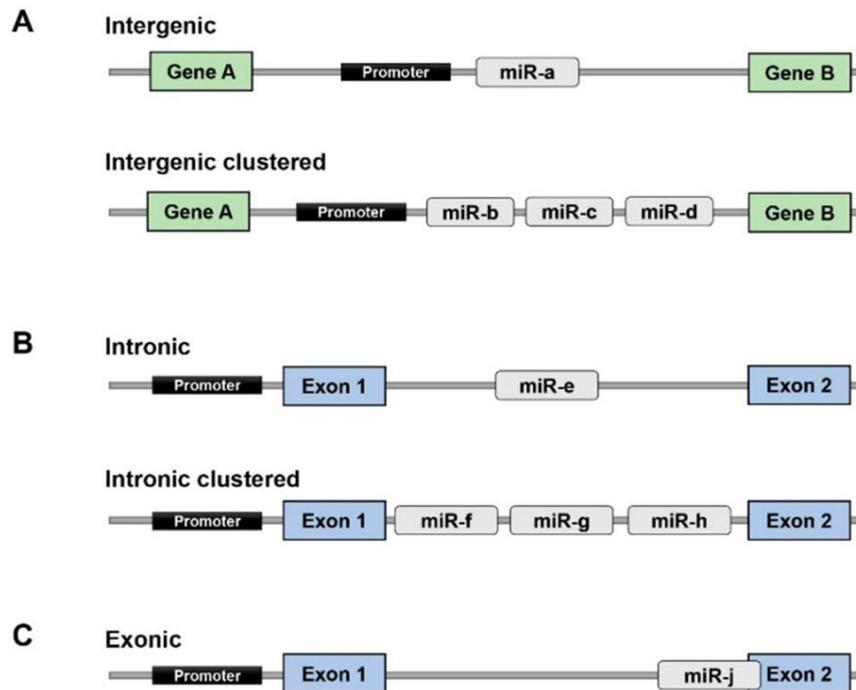


Figure 44 : Localisations possibles dans le génome des microARNs A. Un ou plusieurs miRNAs peuvent être intergéniques (entre 2 gènes) B. Un ou plusieurs miRNAs peuvent être localisés au sein d'un intron C. Un miR peut être localisé à la fois dans un intron et dans un exon (Modifié à partir de (Wong et al., 2016))

Les gènes de miRNAs localisés au sein d'unités transcriptionnelles de gènes non-codants sont transcrits par l'action de l'ARN polymérase II (ARN Pol II)^a. Les transcrits primaires générés dans le noyau sont nommés : **miRNAs primaires (ou pri-miRNAs)** (Wahid et al., 2010; Williams et al., 2017). Ces transcrits mesurent plusieurs kilobases et se caractérisent par : une coiffe m⁷G (guanosine méthylée en position N7) en 5', une queue polyadénylée et une structure secondaire en épingle à cheveux (une tige d'ARN double brin avec une boucle terminale).

Les pri-miRNAs sont pris en charge par une protéine RNase de type III, **DROSHA** et de son partenaire **DGCR8** (*DiGeorge Syndrome Critical Region 8*). DROSHA clive les 2 brins

^a Certains microARNs pourraient être transcrits par l'ARN Pol III mais plusieurs études semblent se contredire

du transcrit et libère une structure « tige-boucle » d'approximativement 70 nucléotides : **le pré-miRNA (ou précurseur du miRNA)** (Wahid et al., 2010; Williams et al., 2017).

Le pré-miRNA est ensuite exporté dans le cytoplasme au travers des pores nucléaires associé à une protéine, **l'Exportin-5**. Cette dernière est une protéine RanGTP-dépendante. Ainsi, l'hydrolyse du GTP en GDP permettra l'exportation du pré-miRNA dans le cytoplasme (Wahid et al., 2010; Williams et al., 2017).

Dans le cytoplasme, la structure « en boucle » du pré-miRNA va être la cible d'une seconde protéine RNase de type III : **DICER** associée à son cofacteur la TAR RNA Binding Protein (**TRBP** : facilite l'assemblage du miRNA dans le complexe RISC). Cette dernière va séparer par clivage la tige de la boucle et ainsi libérer un duplex de miRNAs ("miR/miR*" dans l'ancienne nomenclature ou "miR-5p/miR-3p") d'une longueur d'environ vingt nucléotides (EL-MURR, 2014).

Après cette étape impliquant DICER, le miRNA mature s'associe avec un complexe appelé **RISC** (*RNA-Induced Silencing Complex*) qui est constitué d'une protéine **Argonaute^a**, de **DICER** et de son cofacteur la **TRBP** (Wahid et al., 2010; Williams et al., 2017).

Un seul des 2 brins du duplex est préférentiellement incorporé dans le complexe RISC (il s'agit du miRNA guide), alors que l'autre brin (miR* ou brin passager) est exclu du complexe RISC et dégradé (EL-MURR, 2014). Il est possible de retrouver des miRNAs matures issus des 2 brins. Dans ce cas-là, les 2 miRNAs obtenus se distingueront l'un de l'autre par leur nomenclature qui contiendra le suffixe « **-3p** » et « **-5p** ». Ce suffixe tiendra compte de la position en 5' ou 3' dans le pré-miRNA les générant. Ainsi, le miR-127-3p et le miR-127-5p proviennent par exemple du même pré-miRNA.

La nomenclature précise également l'espèce concernée par le miRNA. Par exemple : *hsa* pour *Homo sapiens* et *mmu* pour *Mus musculus*.

^a Il existe 4 protéines Ago chez les mammifères (Ago1-4). Seule Ago-2 peut cliver l'ARN_m cible lors d'un appariement parfaitement complémentaire entre le miRNA mature et le transcrit ciblé.

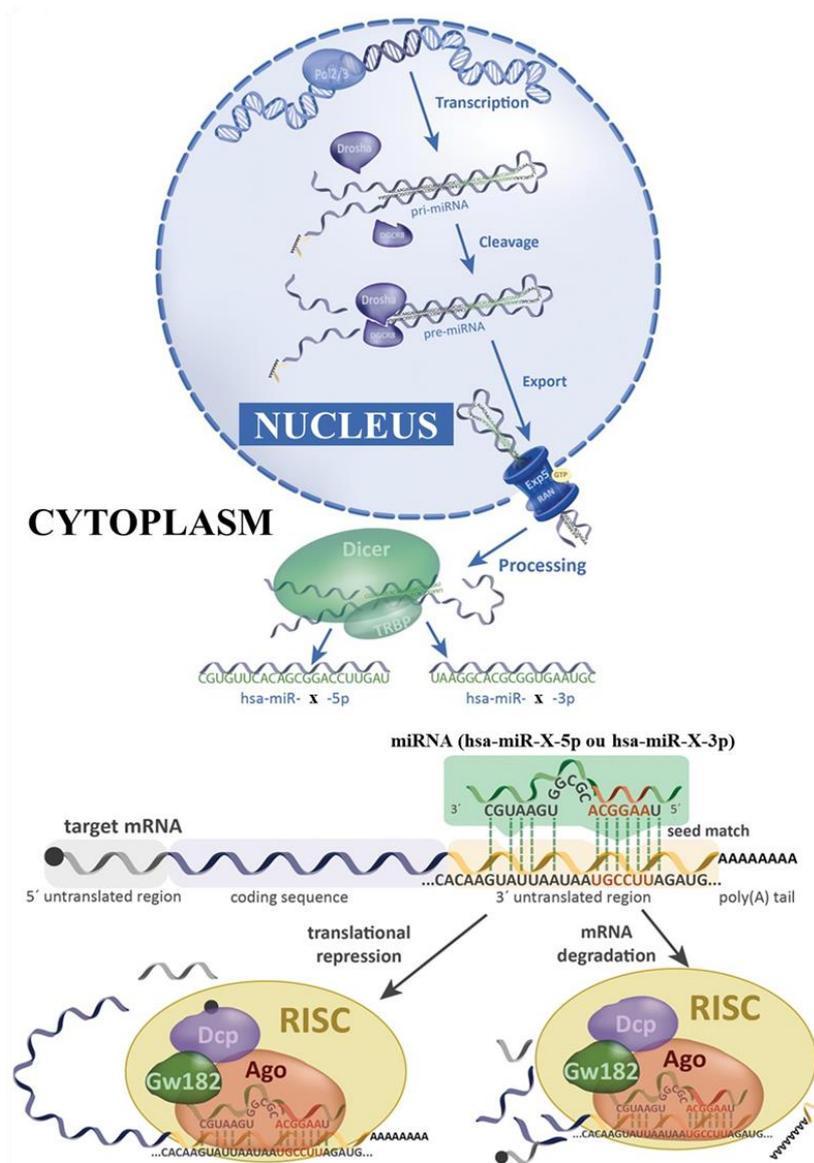


Figure 45 : Synthèse canonique des microARNs (Kreth et al., 2018)

2. b.) Synthèse non-canonique des miRNAs

Hormis la voie canonique (Figure 46A), divers mécanismes alternatifs peuvent induire la formation de microARNs. En effet, des miRNAs peuvent être produits de manière indépendante de DROSHA ou de DICER : ce sont les voies non-canoniques.

b. i.) Processus indépendants de DROSHA

- Des miRNAs peuvent être générés par épissage à partir d'une séquence de nucléotides contenue au sein d'un intron d'un pré-ARN messager. Cette séquence intronique est appelée « **miRtron** ». Suite au débranchement de la structure en lasso au cours de la

réaction d'excision-épissage des ARNm et au repliement de l'intron en épingle à cheveux, il se forme une structure très similaire à un pré-miRNA (EL-MURR, 2014), ainsi qu'un ARNm mature (Figure 46B).

- De petits ARNs non-codants nucléolaires, les **SnoRNAs**^a (*Small nucleolar RNAs*), peuvent être à l'origine de miRNAs matures. Par exemple le SnoRNA ACA45 possède une structure en double épingle à cheveux. Sa structure, ressemblant à celle d'un pré-miRNA, peut être pris en charge par DICER et ainsi former un miRNA mature, le miR-1839 (Abdelfattah et al., 2014; Abel et al., 2014; Bartel, 2018) (Figure 46C1).

Des études portant sur les microARNs viraux ont montré qu'ils pouvaient être formés selon la voie non-canonique indépendante de DROSHA :

- Des études du virus **HVS**^b (*Herpesvirus saimri*) ont montré que des miRNAs viraux pouvaient être transcrits à partir de promoteurs localisés en amont de gènes codant de petits ARNs nucléaires (snARNs) viraux. La transcription par Pol II conduit à la formation d'une structure chimérique dans laquelle on retrouve à la fois la structure du pri-snARN viral et du pri-miRNA viral. Cette molécule est par la suite clivée par un complexe libérant ainsi 2 molécules : le pré-snARN (qui poursuivra sa maturation) et le pré-miRNA. Ce dernier rejoint la voie canonique et est pris en charge par DICER pour donner de futurs miRNAs matures (Figure 46C2) (Xie and Steitz, 2014).
- Des études sur **γ-herpesvirus 68 murin** (MHV68) ont montré que des miRNAs viraux pouvaient être transcrits par l'ARN Pol III à partir de promoteurs localisés dans des gènes codants des ARNs de transfert (ARNt). Il en résulte la formation de pri-miRNAs viraux dont la structure chimérique comporte un fragment d'ARNt en position 5' et un fragment de pri-miRNA en 3'. Cette molécule est prise en charge par une tRNase Z qui est impliquée dans la maturation des ARNt. Ainsi, cette dernière clive le pri-miRNA en 3' et libère l'ARNt viral d'une part et la structure en épingle à cheveux (pré-miRNA) d'autre part. Cette dernière est ensuite clivée par DICER pour donner des microARNs viraux matures (Figure 46C3) (Bogerd et al., 2010).
- Les **shRNAs** (*short hairspin RNA*) sont de courts ARNs simples brins en épingle à cheveux modelés selon la structure d'un pré-miR qui vont par la suite rejoindre la voie canonique des miRNAs. Les shRNAs qui sont délivrés par des vecteurs viraux sont

^a Les SnoRNAs sont impliqués dans la modification post-traductionnelle d'autres ARNs non codants comme par exemple les ARNs ribosomiques (ARNr) et les petits ARNs nucléaires (snARN).

^b Ce virus appartient à la sous-famille des γ-herpesvirus et infecte les *New World monkeys*.

transcrits par l'ARN Pol III. Cette dernière va déterminer le « futur substrat » de DICER (Figure 46D1). Selon le même principe, certains shRNAs sont transcrits par l'ARN Pol II qui va induire la formation de miRNAs matures uniquement à partir du brin 3p (Figure 46D2) (Bartel, 2018).

b . ii) Processus indépendants de DICER

- Des miRNAs issus de la voie non-canonique peuvent être formés sans être pris en charge par DICER mais nécessitant cependant l'intervention de DROSHA. C'est le cas pour le **miR-451^a**. Après le clivage du pri-miR-451 par DROSHA, le pré-miRNA-451 formé, trop court (17 paires de bases) pour être clivé par DICER, est pris en charge par la protéine Argonaute 2 qui va cliver l'épingle à cheveux situé en 3' du pré-miRNA. La structure résultant de cette coupure va être à son tour pris en charge par une enzyme, la PARN (*Poly(A)-specific ribonuclease*), qui va également induire un clivage au niveau de l'extrémité 3'. Ainsi, le miRNA mature formé est constitué de l'extrémité 5' (Figure 46E) (Bartel, 2018; Xie and Steitz, 2014).

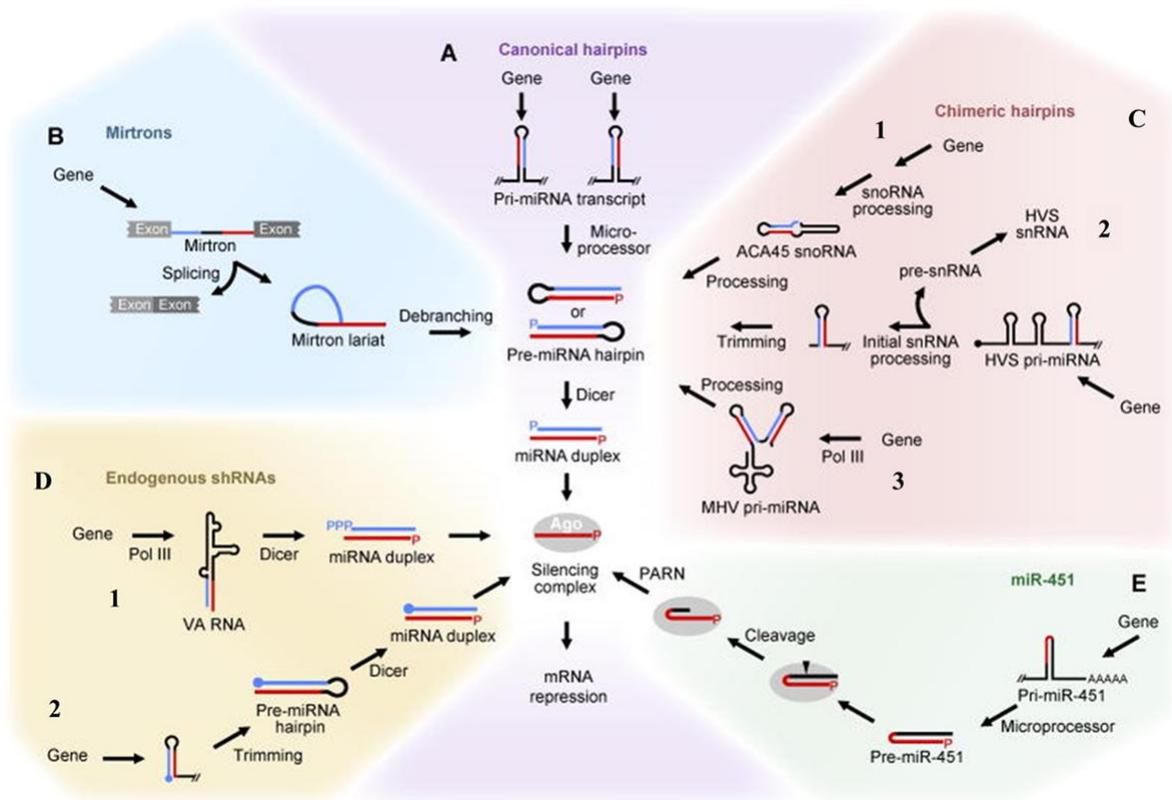


Figure 46 : Synthèse non canonique des microARNs (Bartel, 2018)

^a Ce miR fait partie des miRs les plus exprimés dans les globules rouges des vertébrés

C.3) Mécanisme d'action

Les miRNAs sont capables d'interagir avec des ARNm qu'ils ciblent. La reconnaissance d'un miRNA sur un ARNm cible se produit au niveau une séquence particulière portée par le miRNA. Cette séquence appelée « *Seed* », est constituée de 7 nucléotides situés aux positions 2 à 8 au niveau de l'extrémité 5' du miRNA mature.

Lorsque le miRNA se fixe sur la région **3'-UTR de l'ARNm cible**, il est capable, en fonction du degré de complémentarité des séquences entre le miRNA et l'ARNm (Baulande et al., 2014; Wahid et al., 2010; Williams et al., 2017) d'induire : soit le clivage et la dégradation de l'ARNm (majoritairement chez les plantes), soit le blocage de la traduction de l'ARNm (majoritairement chez les métazoaires) (Bret and Schved, 2009) (Figure 47).

Les miRNAs sont également capables de se fixer dans d'autres régions de l'ARNm, y compris la **région 5'-UTR et la région codante de l'ARNm**, ainsi qu'au niveau des **régions promotrices des gènes**. La liaison du miRNA à la région 5'-UTR et aux régions codantes induirait une répression de l'expression des gènes, tandis que la liaison du miRNA sur les régions promotrices induirait une activation de la transcription des gènes (O'Brien et al., 2018).

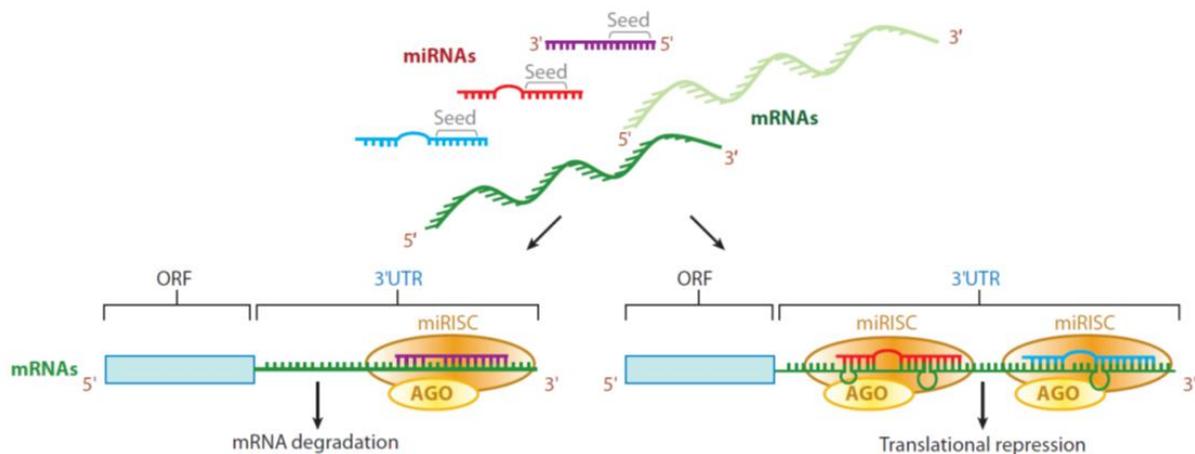


Figure 47 : Schéma représentatif du mode d'action des miRNAs (Sun et al., 2010)

Un microARN peut inhiber la traduction protéique d'un ARNm cible selon des mécanismes directs ou indirects. Nous avons cité ci-dessous quelques exemples du mode d'action du complexe RISC.

De manière directe, le complexe RISC peut :

- Empêcher le recrutement des sous-unités du ribosome (40S et 60S dans les cellules animales) : il s'agit d'un **blocage de l'initiation de la traduction** (Figure 48a).

- Induire une **dissociation des sous-unités ribosomales** (Figure 48b).
- Empêcher la fixation des sous-unités 40S et 60S au cours de l'étape d'élongation (Figure 48c).

De manière indirecte, le complexe RISC peut :

- Induire un phénomène de déadénylation à l'origine de l'élimination de la queue poly-A de l'ARNm. Ce dernier est par la suite soit séquestré au sein de structures nommées « corps P », soit dégradé (Figure 48d).

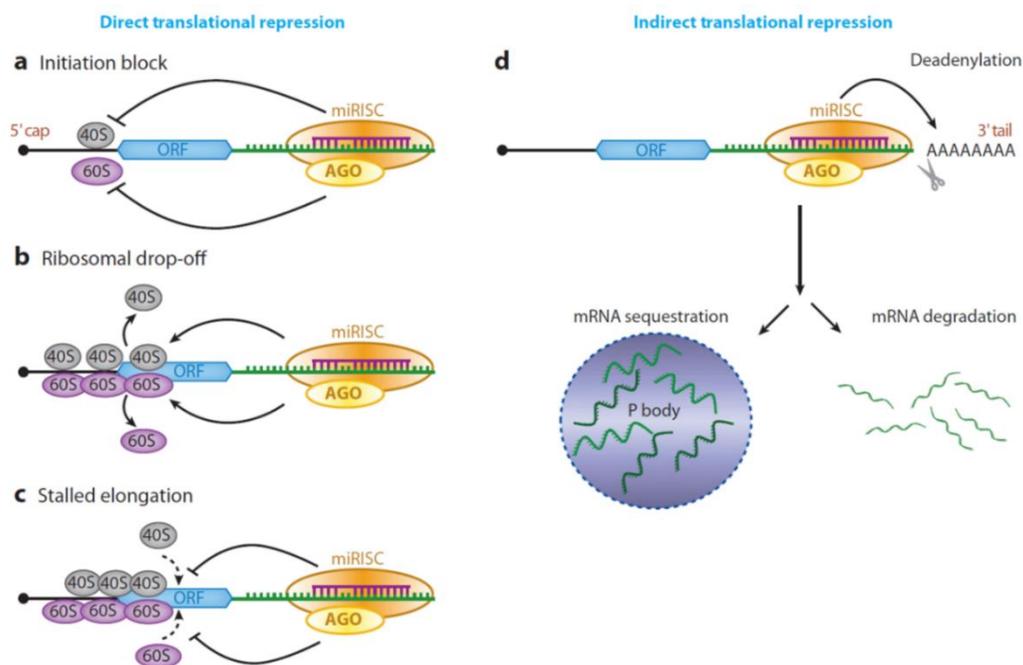


Figure 48 : Un microARN peut inhiber la traduction de l'ARNm cible selon différents mécanismes (Sun et al., 2010)

La capacité pour un miRNA à se lier à l'ARNm cible selon une complémentarité imparfaite de séquence engendre une multitude de cibles possibles, ce qui souligne la puissance de ce mécanisme de régulation génique. De plus, un ARNm peut être ciblé par plusieurs miRNAs différents. La liaison de plusieurs miRNAs sur des sites voisins de l'ARNm peut induire une répression selon un mode « coopératif » (Figure 49).

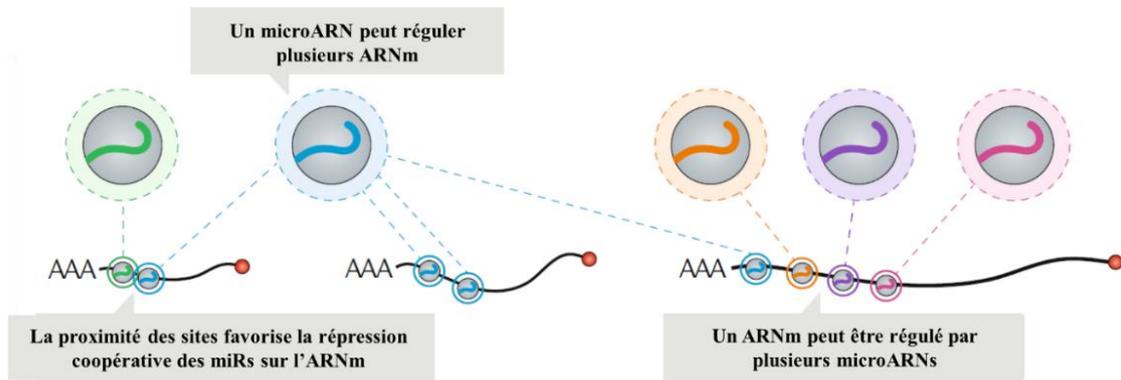


Figure 49 : Schéma représentant la redondance des cibles d'un miRNA, la coopération possible entre différents microARNs ainsi que la redondance des miRNAs pour un ARNm (Gebert and MacRae, 2019)

C . 4) Sécrétion et signalisation des miRNAs dans le milieu extracellulaire

Les miRNAs peuvent être sécrétés par la cellule dans le milieu extracellulaire. Ils sont alors qualifiés « miRNAs circulants ou miRNAs extracellulaires ». Ils peuvent être intégrés au sein de structures membranaires (exosomes, microvésicules, corps apoptotiques) ou être complexés (lipides, lipoprotéines (HDL), protéines de liaison à l'ARN (Ago)) (ils représentent près de 90% des miRNAs circulants totaux) (Figure 50).

Ils sont retrouvés en très faible quantité dans le milieu extracellulaire, y compris les fluides biologiques et les milieux de culture cellulaire. La majorité des miRNAs sont détectés dans le microenvironnement cellulaire. Les miRNAs circulants ont la particularité d'être très stables (résistance aux conditions défavorables et à la RNase endogène) (Sohel, 2016).

Parmi les structures membranaires dans lesquelles les miRNAs peuvent être véhiculés, nous aborderons de manière générale **les exosomes** et **les microvésicules**. Il s'agit de vésicules extracellulaires générées par de nombreux types cellulaires, renfermant à la fois du matériel génétique (ARNm, miRNAs) et des protéines. Ces structures participent activement à la communication intercellulaire et sont retrouvées dans la plupart des fluides biologiques (sérum, urines...) (Kastelowitz and Yin, 2014).

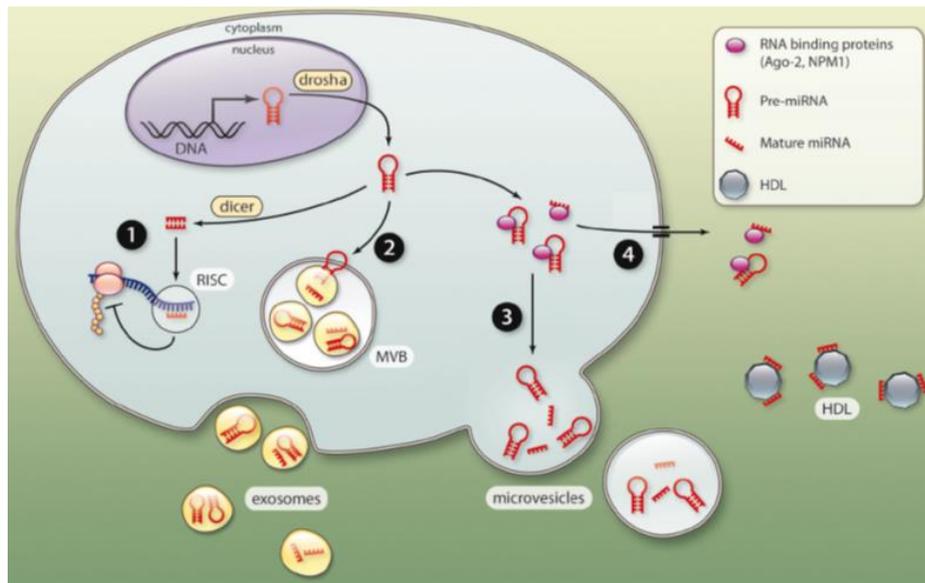


Figure 50 : Mécanismes de libération et systèmes de transport extracellulaire des miRNAs 1) le miRNA mature associé au complexe RISC vient se fixer sur l'ARNm 2) les pré-miRNAs peuvent être incorporés dans des exosomes et être exportés hors de la cellule 3) les pré-miRNAs et les miRNAs peuvent être libérés hors de la cellule dans des microvésicules 4) les miRNAs peuvent être retrouvés dans la circulation liés à des protéines (Ago) ou des lipoprotéines (HDL) (Creemers et al., 2012)

Les **exosomes** sont des nanovésicules de 40-100 nm de diamètre et générés dans le cytoplasme à partir des endosomes (Figure 51). Dans un premier temps, le phénomène d'invagination de la membrane plasmique est à l'origine d'endosomes dits « précoces » (*Early Endosomes* ou EE) présentant un pH proche du milieu extracellulaire (7,4). Après acidification, les endosomes sont dits « tardifs » (pH = 6,5). A l'intérieur de l'endosome tardif, de petites vésicules correspondant aux exosomes, se forment par invagination. A ce stade, les endosomes sont appelés corps multivésiculaires ou MVB (*MultiVesicular Bodies*). Lorsque les MVB fusionnent avec la membrane plasmique de la cellule, les exosomes sont exocytés et libérés dans le milieu extracellulaire (Baulande et al., 2014; Zhang et al., 2015a).

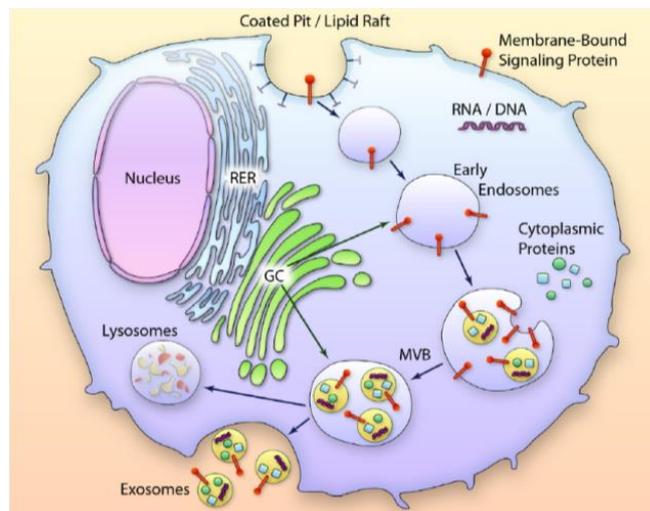


Figure 51 : Formation des exosomes (Waldenstrom and Ronquist, 2014)

Les **microvésicules** sont des structures plus grandes que les exosomes pouvant mesurer jusqu'à 1 µm de diamètre. À la différence des exosomes, les microvésicules sont libérées dans le milieu extracellulaire par un mécanisme de bourgeonnement au niveau de la membrane plasmique (Baulande et al., 2014; Zhang et al., 2015a).

Des études *in vitro* ont montré que les miRNAs circulants pouvaient être transférés d'une cellule à une autre. Au Yeung *et al.*, montrent *in vitro* que le miR-21 est transféré dans des cellules humaines du cancer de l'ovaire après incubation avec des exosomes purifiés à partir de « fibroblastes et d'adipocytes associés au cancer de l'ovaire »^a surexprimant le miR-21. De même, ils montrent *in vivo* que des fibroblastes embryonnaires de souris surexprimant miR-21, injectés à proximité de nodules tumoraux, transféraient ce miRNA aux cellules cancéreuses (Au Yeung et al., 2016). Ainsi, il a pu être suggéré un rôle potentiel de ces miRNAs circulants dans la communication intercellulaire où la cellule « receveuse » pourrait présenter, par la suite, une modification de la régulation des gènes ciblés par les miRNAs circulants.

Des études ont été menées sur l'utilisation potentielle des microARNs circulants en tant que **biomarqueurs**. En effet, un grand nombre d'études se focalise sur leur utilisation pour le diagnostic et le pronostic de pathologies.

Par exemple, dans les urines de patientes atteintes du cancer de sein, il a été décrit une surexpression du miR-155 et une diminution de l'expression des miR-21, -125b et -451 (Erbes et al., 2015).

Dans son étude, Mikamori *et al.* a montré que des cellules d'adénocarcinome canalaire pancréatique de patients surexprimaient le **miR-155** après avoir été exposées à la gemcitabine, et devenaient résistantes à ce médicament (Mikamori et al., 2017).

C . 5) Rôles des miRNAs dans les processus physiologiques

Les microARNs sont des molécules qui interviennent dans de très nombreuses voies biologiques, y compris au cours du développement. Nous avons choisi de citer ci-dessous, de manière non-exhaustive, des microARNs régulant de manière physiologique des deux mécanismes constituant l'axe principal de ce manuscrit : le cycle cellulaire/sénescence (Tableau 4) et l'autophagie (Tableau 5).

^a Ce terme désigne des cellules qui sont activées par des facteurs de croissance ou des chimiokines émis par les cellules tumorales et qui sont détournées au profit de la tumeur.

– Cycle cellulaire/sénescence

miRNA	Protéine régulatrice du cycle cellulaire	Références bibliographiques
miR-19a	Cyclin D1	X. Qin, X. Wang, Y. Wang, Z. Tang, Q. Cui, J. Xi, Y.S. Li, S. Chien, N. Wang, MicroRNA-19a mediates the suppressive effect of laminar flow on cyclin D1 expression in human umbilical vein endothelial cells, Proc. Natl Acad. Sci. USA 107 (2010) 3240–3244.
miR-31	p16 ^{INK4a} , p19 ^{INK4a}	A. Malhas, N.J. Saunders, D.J. Vaux, The nuclear envelope can control gene expression and cell cycle progression via miRNA regulation, Cell Cycle 9 (2010) 531–539.
miR-34a	CDK4, CDK6, Cyclin D1, Cyclin E2, E2F1, E2F3 and c-MYC	F. Sun, H. Fu, Q. Liu, Y. Tie, J. Zhu, R. Xing, Z. Sun, X. Zheng, Downregulation of CCND1 and CDK6 by miR-34a induces cell cycle arrest, FEBS Lett. 582 (2008) 1564–1568. L. He, X. He, L.P. Lim, E. de Stanchina, Z. Xuan, Y. Liang, W. Xue, L. Zender, J. Magnus, D. Ridzon, A.L. Jackson, P.S. Linsley, C. Chen, S.W. Lowe, M.A. Cleary, G.J. Hannon, A microRNA component of the p53 tumour suppressor network, Nature 447 (2007) 1130–1134. H. Tazawa, N. Tsuchiya, M. Izumiya, H. Nakagama, Tumor-suppressive miR-34a induces senescence-like growth arrest through modulation of the E2F pathway in human colon cancer cells, Proc. Natl Acad. Sci. USA 104 (2007) 15472–15477.
miR-181a,b and c	p27 ^{Kip1}	X. Wang, E. Gocek, C.G. Liu, G.P. Studzinski, MicroRNAs181 regulate the expression of p27Kip1 in human myeloid leukemia cells induced to differentiate by 1, 25-dihydroxyvitamin D3, Cell Cycle 8 (2009) 736–741.
miR-322/424 miR-503	CDC25A	S. Sarkar, B.K. Dey, A. Dutta, MiR-322/424 and -503 are induced during muscle differentiation and promote cell cycle quiescence and differentiation by downregulation of Cdc25A, Mol. Biol. Cell 21 (2010) 2138–2149

Tableau 4 : Exemples de miRNAs ciblant des protéines régulatrices du cycle cellulaire et de la sénescence

– Autophagie

miRNA	Protéine régulatrice de l'autophagie	Références bibliographiques
miR-181a	ATG5	Tekirdag KA, Korkmaz G, Ozturk DG, Agami R, Gozuacik D. MIR181A regulates starvation- and rapamycin-induced autophagy through targeting of ATG5. Autophagy (2013) 9(3):374–85. doi:10.4161/auto.23117
miR-204	LC3	Mikhaylova O, Stratton Y, Hall D, Kellner E, Ehmer B, Drew AF, et al. VHL-regulated miR-204 suppresses tumor growth through inhibition of LC3B-mediated autophagy in renal clear cell carcinoma. Cancer Cell (2012) 21(4):532–46
miR-212	SIRT1	Ramalinga M, Roy A, Srivastava A, Bhattarai A, Harish V, Suy S, et al. microRNA-212 negatively regulates starvation induced autophagy in prostate cancer cells by inhibiting SIRT1 and is a modulator of angiogenesis and cellular senescence. Oncotarget (2015) 6(33):34446–57
miR-376a-3p	BECN1, ATG4C	Korkmaz G, Tekirdag KA, Ozturk DG, Kosar A, Sezerman OU, Gozuacik D. MIR376A is a regulator of starvation-induced autophagy. PLoS One (2013) 8(12):e82556.10.1371/journal.pone.0082556
miR-376b-3p		Korkmaz G, le Sage C, Tekirdag KA, Agami R, Gozuacik D. miR-376b controls starvation and mTOR inhibition-related autophagy by targeting ATG4C and BECN1. Autophagy (2012) 8(2):165–76.10.4161/auto.8.2.18351

Tableau 5 : Exemple de miRNAs ciblant des protéines régulatrices de l'autophagie

De par leur rôle central dans la régulation de très nombreux processus physiologiques, les miRNAs sont naturellement impliqués dans un vaste éventail de pathologies que nous avons choisi de ne pas développer en détail dans ce manuscrit (cancers, maladies cardiovasculaires, maladies neurodégénératives, maladies métaboliques...). Outre leur implication dans la physiopathologie de ces maladies, ces molécules constituent aussi des biomarqueurs potentiels utilisables pour le diagnostic, l'établissement d'un pronostic ou encore le suivi de ces pathologies. Les miRNAs constituent enfin des cibles thérapeutiques potentielles que nous aborderons dans la partie C.7.

C. 6) Rôles des miRNAs dans le vieillissement

6. a) Les miRNAs au cours du vieillissement physiologique

Plusieurs travaux se sont intéressés aux rôles des miRNAs au cours du vieillissement dans le modèle *C. elegans*, très utilisé pour l'étude des mécanismes du vieillissement (voir plus haut). Des études ont montré qu'au cours de la vie du ver, l'expression de certains miRNAs était modifiée. Par exemple, Ibanez et al. montrent que le **miR-1**, un miRNA tissu-spécifique du tissu musculaire, très conservé chez la souris et l'Homme, diminuait progressivement au cours de la vie de *C. elegans*. Cette diminution pourrait être impliquée dans l'altération du tissu musculaire observée au cours du vieillissement du ver (Ibanez-Ventoso et al., 2006). De même, le miR-231 est exprimé de manière très importante au cours de la vie du nématode et pourrait inhiber daf-16, un facteur de transcription, et ainsi induire une perte de l'expression de protéines jouant un rôle dans la protection contre le stress et par extension une diminution de la durée de vie de *C. elegans*.

Yang et al. ont décrit une augmentation de l'expression du **miR-34** au cours du vieillissement dans différents organes (cerveau, foie, cœur...) de *C. elegans* (Yang et al., 2013). Ce miRNA semblerait réguler des gènes impliqués dans le phénomène d'autophagie : in vitro, dans des cellules rénales embryonnaires humaines ainsi que dans des cellules HeLa, le miR-34 diminue le flux autophagique en ciblant de manière directe, ATG9A, une protéine essentielle à la formation de l'autophagosome. Chez *C. elegans*, la perte de fonction du miR-34 induit une augmentation de la durée de vie du nématode. Ce qui laisse suggérer que ce miRNA pourrait intervenir dans le phénomène du vieillissement en agissant sur la voie de l'autophagie via la régulation de cibles directes comme par exemple SIRT1, BCL-2... Le miR-34 pourrait être utilisé comme biomarqueur du vieillissement.

Chez l'**Homme**, de nombreux travaux ont montré le rôle de certains miRNAs au cours du vieillissement normal et des complications/pathologies associées. Nous présentons ci-dessous, de manière non-exhaustive, quelques exemples de microARNs régulant de grands mécanismes impliqués dans le vieillissement.

– **Voies de signalisation cellulaire**

○ **Voie ERK-MAP kinase**

L'étude de cœur de souris témoins âgées de 4 et 24 mois a montré que l'expression du **miR-21** augmentait avec l'âge (Zhang et al., 2012). Dans des fibroblastes cardiaques de souris, ce miRNA active la voie **ERK-MAP kinase** *via* l'inhibition d'une protéine inhibitrice de cette même voie, et participe au phénomène de fibrose (Thum et al., 2008), modification structurelle survenant au cours du vieillissement du myocarde.

○ **Voie de la PI3K**

Le **miR-29** est un microARN qui est surexprimé dans les muscles de rongeurs vieillissants. Ce miRNA participe à l'inhibition de la prolifération des cellules musculaires ainsi qu'à la diminution de la capacité de myogenèse des cellules progénitrices musculaires. Le miR-29 inhibe directement l'ARNm d'une protéine intervenant dans la voie de signalisation de la PI3K : **p85 α** (Hu et al., 2014).

○ **Voie de IGF-1**

Dans le cerveau de souris âgées, une étude a montré une surexpression de nombreux miRNAs dont par exemple, le **miR-29b** qui cible directement l'ARNm de **IGF-1**. Cette protéine est un facteur de croissance qui intervient au niveau cérébral et qui module également la réponse immunitaire. La surexpression de ce miRNA ainsi que la diminution de IGF-1 ont également été décrits dans le cerveau de sujets humains âgés (Fenn et al., 2013).

– **Cycle cellulaire / Sénescence**

Les miRNAs de la famille **let-7** sont surexprimés et impliqués dans l'inhibition de la prolifération et de la régénération cellulaire dans le muscle squelettique humain âgé. Parmi les cibles de ces miRNAs, on retrouve des protéines en lien avec la régulation du cycle cellulaire, par exemple **CDK6** et **CDC25A**. Ces protéines sont modulées négativement par la famille **let-7** (Jung et al., 2018).

L'étude du profil d'expression de miRNAs dans des échantillons de derme de sujets jeunes et âgés a montré que dans des fibroblastes dermiques humains de sujets âgés, de nombreux miRNAs étaient dérégulés. Parmi ces miRNAs, certains sont surexprimés, comme par exemple le **miR-34** et le **miR-29**. Le **miR-34** cible des protéines impliquées dans la progression du cycle cellulaire telles que **SIRT1**, **c-Myc** et **E2F3**. Le miR-34 est régulé par l'axe p53/p21 et par p16 (Li et al., 2016). La **famille du miR-29** cible entre autre, dans des

cellules cancéreuses humaines^a, l'ARNm de la **Cycline D2** (CCND2) et celui de **AKT2** (protéine de la famille de AKT) (Gong et al., 2014).

Le **miR-34a** est également surexprimé dans des cellules aortiques de souris témoins âgées. La surexpression induite de ce miR dans des cellules humaines du muscle lisse aortique inhibe la prolifération cellulaire et induit une sénescence *via* une régulation négative de la protéine **SIRT1** (de Lucia et al., 2017).

– Autophagie

Le **miR-34a** régule également des gènes impliqués dans le phénomène d'autophagie : *in vitro*, dans des cellules cancéreuses humaines^b, le miR-34 diminue le flux autophagique en ciblant de manière directe une protéine essentielle à la formation de l'autophagosome, la protéine ATG9A. Yang *et al.* décrivent une augmentation de l'expression du **miR-34** au cours du vieillissement dans différents organes (cerveau, foie, cœur...) de *C. elegans*. Chez *C. elegans*, la perte de fonction du miR-34 induit une augmentation de la durée de vie du nématode (Yang et al., 2013), ce qui laisse suggérer que ce miRNA pourrait intervenir dans le phénomène du vieillissement en agissant sur la voie de l'autophagie *via* la régulation de cibles directes comme par exemple SIRT1, BCL-2... Le miR-34 pourrait être utilisé comme biomarqueur du vieillissement.

L'étude de l'expression de miRNAs dans des kératinocytes humains âgés a montré qu'au cours du vieillissement épidermique, les **miR-30a-3p** et **-5p** augmentaient de manière significative. Le miR-30a inhibe par exemple de manière directe **BECLIN** (diminution de l'autophagie) (Muther et al., 2017).

– SASP

Dans les cellules endothéliales humaines issues de sujets âgés, le **miR-146a/b** qui cible la protéine **IRAK1** (IL-1 Receptor-Associated Kinase 1) est sous-exprimé. L'inhibition d'IRAK1 conduit à une diminution de l'expression des cytokines inflammatoires : Il-6 et Il-8 (SASP) (Ugalde et al., 2011).

^a Cellules humaines pro-myélocyaires et monocyaires

^b Du col de l'utérus et de rein

6. b) Les miRNAs au cours du vieillissement pathologique

Certains microARNs ont été étudiés *in vitro* ou *in vivo* dans des modèles murins de syndromes progéroïdes (Tableau 6).

Laminopathies	microRNAs	Targets	Models	References
	miR-9	LMNA	HeLa cells MEF (<i>Lmna</i> ^{HG/+} , wild-type) <i>Lmna</i> ^{plao-5nt} knock-in mice <i>Lmna</i> ^{plao-utr} knock-in mice Human iPSC and derived cells	Jung et al. (2012) Jung et al. (2014) Nissan et al. (2012)
Progeria and progeroid syndromes	miR-29	<i>Ppm1d</i>	Mouse fibroblasts (<i>Zmpste24</i> ^{-/-} , wild-type)	Ugalde, Español et al. (2011) and Ugalde, Ramsay et al. (2011)
	miR-1	<i>IGF1</i>	Liver tissues from WT and progeroid mice Cultured fibroblasts derived from patients with HGPS	Mariño et al. (2010)
	miR-365	<i>Rasd1</i>	MEF (<i>Zmpste24</i> ^{-/-} , wild-type)	Xiong et al. (2015)
	miR-342-5p	<i>GAS2</i>	MEF (<i>Zmpste24</i> ^{-/-} , wild-type)	Zhang et al. (2017)
	miR-141-3p	<i>ZMPSTE24</i>	hMSC Wild-type mice	Yu et al. (2013)
Lipodystrophy/ atrophy syndromes	miR-335	<i>FXR1</i>	FPLD2 fibroblasts Primary adipose stem cells (<i>LMNA</i> p.R482W)	Oldenburg et al. (2017)
	miR-141-3p	<i>ZMPSTE24</i>	Fibroblasts (<i>LMNA</i> p.R482W, p.D47Y, p.R133L) VSMC (<i>LMNA</i> p.R482W, p.D47Y, p.R133L)	Afonso et al. (2016)
	miR-140	<i>NEAT1</i> (lncRNA)	Primary adipocyte-derived stem cells (miR-140 knock-out mice)	Gernapudi et al. (2016)
Striated muscle diseases	miR-100, miR-192, miR-335	<i>PPP3CA</i> , <i>NFAT5</i> and <i>Sp1</i>	Muscular biopsies of patients (<i>LMNA</i> p.R60G, p.R294Q, p.R321X, p.R377C)	Sylvius et al. (2011)
	miR-1, miR-130a, miR-133a, miR-133b, miR-146b, miR-151-3p, miR-200a, miR-339-3p		<i>Lmna</i> ^{H222P} knock-in mice	Vignier et al. (2013)
Peripheral neuropathies	/	/	/	/
LMNB1-related diseases	miR-23a	<i>LMNB1</i> , <i>PTEN</i> 2700046G09Rik (lncRNA)	Wild-type mice Mice overexpressing mmu-miR-23 Senescent fibroblasts	Lin et al. (2013) Lin and Fu (2009) Lin et al. (2014) Dreesen et al. (2013)
	miR-31	<i>Cdkn2a</i>	<i>Lmnb1</i> ^{Δ/Δ} MEFs	Malhas et al. (2010)

hMSCs, human mesenchymal stem cells; MEFs, mouse embryonic fibroblasts; iPSCs, induced pluripotent stem cells; HGPS, Hutchinson–Gilford progeria syndrome; FPLD2, Dunnigan-type familial partial lipodystrophy, type 2; VSMCs, vascular smooth muscle cells; lncRNA, long-noncoding RNA.

Tableau 6 : microARNs étudiés *in vitro* ou *in vivo* dans des modèles murins de laminopathies (Frankel, Delecourt et al., 2018)

Parmi ces miRNAs, nous allons prendre pour exemple le **miR-9**. Ce miRNA, fortement exprimé dans les neurones, cible de manière directe l'ARNm de la prélamine A. Il se fixe également sur l'ARNm de la progérine, et protège ainsi les neurones des patients HGPS vis-à-vis des effets toxiques de la progérine (Jung et al., 2012). La surexpression de ce miRNA dans des MSC dérivées de cellules iPS de patients HGPS provoque la diminution du pourcentage de noyaux dysmorphiques, en lien avec la diminution de la progérine (Nissan et al., 2012).

Parmi les gènes ciblés par les miRNAs étudiés dans les laminopathies, certains sont impliqués dans la physiopathologie associée à une accélération du vieillissement.

Dans une revue (Caravia et al., 2017), les auteurs proposent que certains miRNAs pourraient avoir un rôle régulateur sur 1 ou plusieurs des 9 caractéristiques communes à la plupart des syndromes progéroïdes et au vieillissement physiologique. Nous rappellerons que

ces 9 caractéristiques sont : une augmentation des dommages de l'ADN, une altération des télomères, des modifications épigénétiques, des altérations de la *lamina* nucléaire, une dérégulation du cycle cellulaire, une induction de la sénescence, des défauts métaboliques, une inflammation et un épuisement des cellules souches (Carrero et al., 2016).

Parmi ces miRNAs, nous avons choisi de représenter dans la Figure 52 ceux ayant une ou des cibles dont nous avons déjà fait référence dans cet ouvrage.

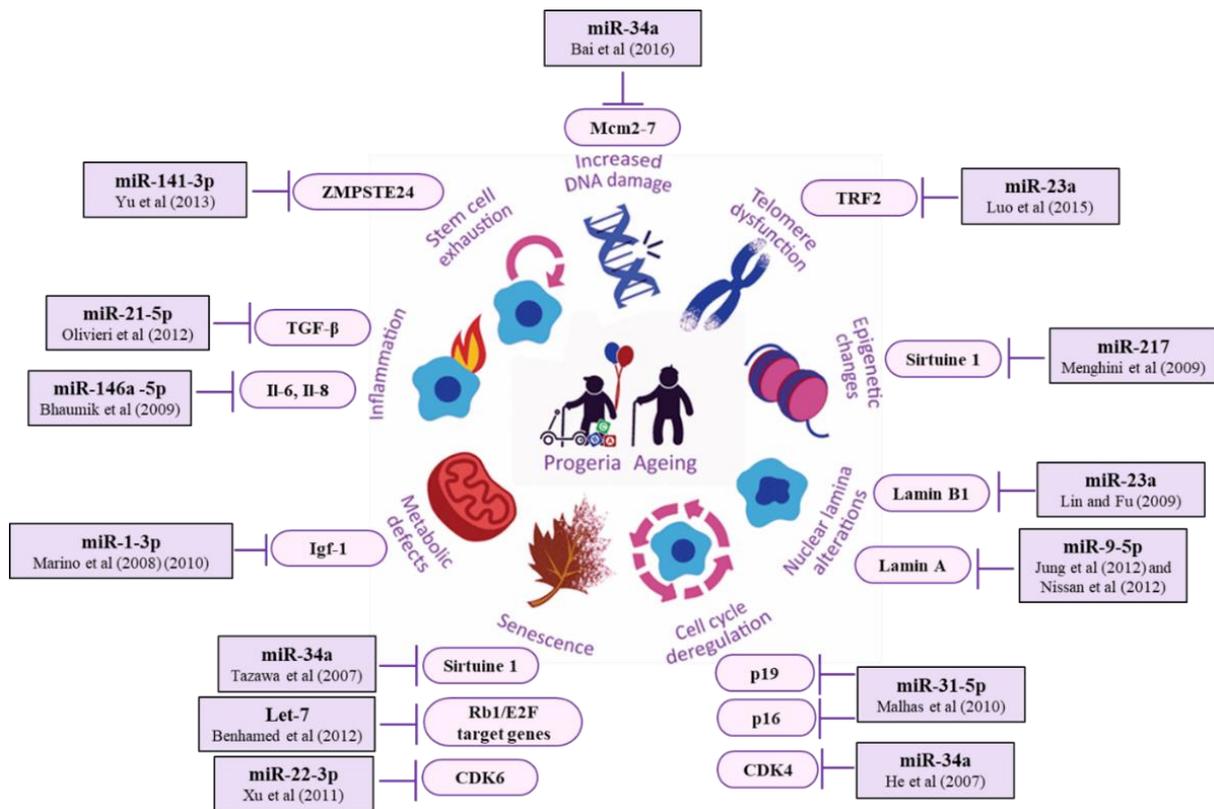


Figure 52 : microARNs potentiellement impliqués dans la physiopathologie des syndromes progéroïdes (Modifié à partir de (Caravia et al., 2017) et (Carrero et al., 2016))

C . 7) Les miRNAs : vers une stratégie thérapeutique ?

7 . a) Les antimiRs

Les **antimiRs** forment un groupe d'oligonucléotides modifiés dirigés contre les microARNs et pouvant les inhiber. Les modifications réalisées sur ces molécules ont pour objectifs de les protéger vis-à-vis des nucléases et d'améliorer ainsi leurs caractéristiques pharmacocinétiques telles que leur demi-vie et leur absorption dans les cellules (Sun et al., 2010).

Nous avons vu plus haut que les miRNAs étaient impliqués dans diverses pathologies et les antimiRs ont déjà fait l'objet de nombreuses études. Les résultats de ces études suggèrent que ces molécules pourraient représenter de nouvelles stratégies thérapeutiques dans certains processus pathologiques (Figure 53).

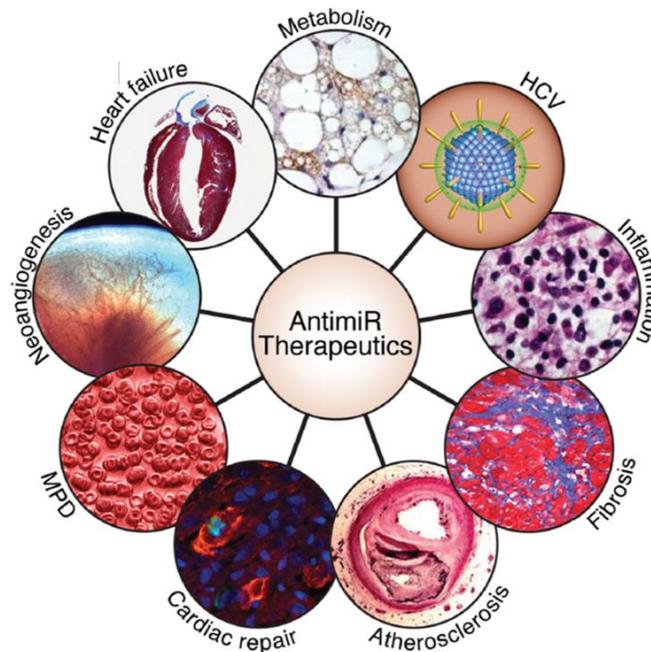


Figure 53 : Exemples de processus pathologiques impliquant les miRNAs pouvant être ciblés par des antimiRs comme stratégie thérapeutique (van Rooij et al., 2012)

Comme exemple, nous décrivons ci-dessous la 1^{ère} stratégie thérapeutique utilisée chez l'Homme basée sur l'inhibition d'un miRNA dans le foie par un antimiR, le **Miravirsen®**, administré par injection sous-cutanée.

Ce dernier inhibe le **miR-122**, très exprimé de manière physiologique dans le foie, qui est utilisé à son avantage par le VHC (Virus de l'Hépatite C) pour se répliquer. Le Miravirsen®, antimiR du miR-122 (Figure 54), a été évalué pour le traitement des hépatites C chroniques chez l'Homme au cours de 2 essais thérapeutiques successifs. Pour le premier essai (ClinicalTrials.gov : NCT01200420), les patients choisis étaient des sujets atteints d'hépatite C chronique n'ayant jamais eu de traitement, tandis que pour le second essai (ClinicalTrials.gov : NCT01727934), les patients inclus étaient des sujets atteints de manière chronique et répondant négativement au traitement de type « Interféron α pégylé + ribavirine ». Les résultats du 1^{er} essai révèlent que l'inhibition du miR-122 entraîne notamment une diminution durable de l'ARN viral et une diminution progressive de la cholestérolémie (en adéquation avec ce qu'il a été

précisé plus haut) (Janssen et al., 2013). Les résultats du 2^{ème} essai ne sont pas encore disponibles à ce jour.

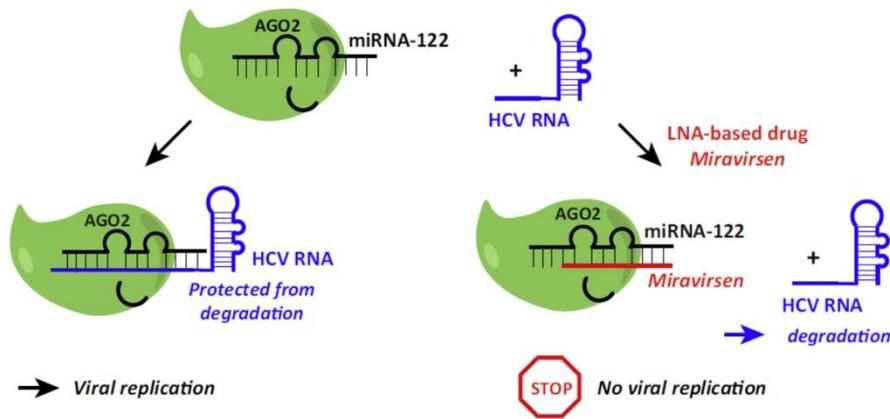


Figure 54 : Le VHC est protégé de la dégradation par la protéine Ago2. En présence de Miravirsin[®], le VHC n'est plus protégé par Ago2 et ne peut plus se répliquer (Schmidt, 2014)

7. b) Les mimics

Les **mimics** sont de petites molécules d'ARN double-brin synthétiques imitant les duplex de miRNAs endogènes matures et qui ont un mécanisme d'action similaire à ces derniers. Des modifications chimiques sont introduites dans la structure de ces ARNs dans le but d'améliorer leur stabilité, de faciliter leur prise en charge par le complexe RISC, de présélectionner le brin passager, ou d'augmenter leur protection contre les nucléases. De plus, l'utilisation de certains vecteurs (polymères, émulsions lipidiques neutres, liposomes...) permet de protéger ces mimics d'une potentielle dégradation au sein de la cellule. Ces mimics visent ainsi à rétablir ou à augmenter l'expression des miRNAs.

De nombreuses études basées sur le développement de thérapies à base de mimics ont été menées et certaines ont donné lieu à des essais cliniques (Tableau 7).

Name (company)	Therapeutic agent	Delivery system	Target diseases	Trial details	ClinicalTrials.gov identifier
miRNA-based therapeutics					
Mirivrasen (Santaris Pharma A/S and Hoffmann-La Roche)	AntimiR-122	LNA-modified antisense inhibitor	Hepatitis C (chronic infections included)	Single-centre phase I, completed	NCT01646489
				Multicentre phase II, completed	NCT01200420
				Multicentre phase II, ongoing	NCT01872936
				Single-centre phase II, ongoing	NCT02031133
				Single-centre phase II, ongoing	NCT02508090
RG-101 (Regulus Therapeutics)	AntimiR-122	GalNAc-conjugated antimiR	Chronic hepatitis C	Phase I, completed	–
RG-125/AZD4076 (Regulus Therapeutics)	AntimiR-103/107	GalNAc-conjugated antimiR	Patients with type 2 diabetes and non-alcoholic fatty liver diseases	Single-centre phase I, ongoing	NCT02612662
				Single-centre phase I/IIa, ongoing	NCT02826525
MRG-106 (miRagen Therapeutics)	AntimiR-155	LNA-modified antisense inhibitor	Cutaneous T cell lymphoma and mycosis fungoides	Multicentre phase I, ongoing	NCT02580552
MRG-201 (miRagen Therapeutics)	miR-29 mimic	Cholesterol-conjugated miRNA duplex	Scleroderma	Single-centre phase I, ongoing	NCT02603224
MesomiR-1 (EnGeneIC)	miR-16 mimic	EnGeneIC delivery vehicle	Mesothelioma, non-small cell lung cancer	Multi-centre Phase I, ongoing	NCT02369198
MRX34 (Mirna Therapeutics)	miR-34 mimic	LNPs (Smarticles)	Multiple solid tumours	Multicentre phase I, terminated	NCT01829971

DOPC, 1,2 dioleoyl-sn glycerol-3 phosphatidylcholine; eIF, eukaryotic initiation factor; GalNAc, N-acetyl-D-galactosamine; HBV, hepatitis B virus; LNA, locked nucleic acid; LNPs, lipid nanoparticles; miRNA, microRNA; PEI, polyethylenimine; RSV, respiratory syncytial virus.

Tableau 7 : Exemples d'essais cliniques basés sur l'utilisation d'antimiRs ou de mimics dans différentes pathologies (Rupaimoole and Slack, 2017)

En raison de la très bonne stabilité des miRNAs circulants ainsi que de leur présence dans les fluides biologiques (par exemple les urines et le sang), l'administration de miRNAs par voie générale est être envisageable en thérapeutique. Les quelques exemples d'études menées *in vivo* citées ci-dessous, révèlent un réel potentiel de l'administration des miRNAs contenus dans des vésicules de type exosomes pour le traitement de pathologies.

L'étude de Tian *et al.* portant sur le rôle du cluster miR-302-367 dans la prolifération des cardiomyocytes murins durant le développement, a montré que l'administration intraveineuse du mimic du **miR-302**, contenu dans une émulsion lipidique neutre, induisait notamment des améliorations dans la capacité de régénération et de prolifération des cardiomyocytes (Tian et al., 2015).

L'effet de l'administration intracardiaque d'exosomes issus du sang périphérique humain et transfectés avec le **miR-21** chez des souris ayant fait un infarctus. montre une modification de l'expression de protéines impliquées dans la fibrose cardiaque (Kang et al., 2019).

Wang *et al.* ont étudié *in vivo* l'effet anti-ostéopénique du mimic du **miR-33-5p** contenu dans des liposomes modifiés pour cibler des ostéoblastes. L'injection intraveineuse chez des souris ostéopéniques améliore la minéralisation osseuse (Wang et al., 2018).

L'étude menée par Zhang *et al.* a montré que l'administration d'exosomes transfectés avec le mimic du **miR-15a** par inhalation à des souris, induisait une augmentation des taux de miR-15a dans les macrophages alvéolaires (Zhang et al., 2017b).

7. c) Les Small RNA zippers

Les small RNA zippers sont des oligonucléotides modifiés chimiquement et sont complémentaires à la fois à l'extrémité 3' d'une molécule de miRNA et à l'extrémité 5' d'une autre molécule de miRNA. De cette manière, ces oligonucléotides connectent bout à bout les molécules de miRNA en inhibant leur fonction : effet de type « anti-miR » (Figure 55). Ces Small RNA zippers ont une très bonne affinité, spécificité et stabilité (Meng et al., 2017). Récemment, l'inhibition du miR-221 à l'aide de *Small RNA zippers* dans des cellules cancéreuses humaines du sein a été réalisée démontrant efficacité supérieure à un anti-miR-221.

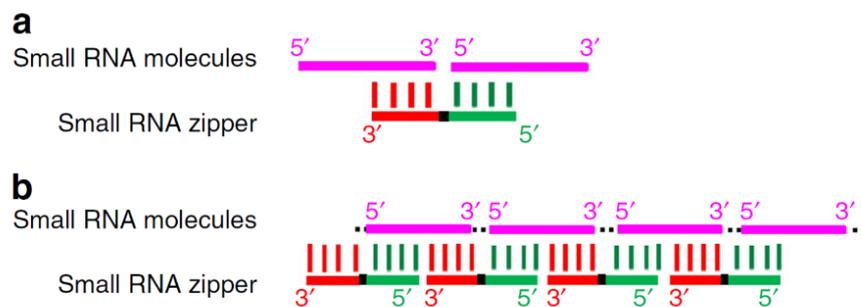


Figure 55 : Représentation schématique du mode d'action des *Small RNA zippers* a. Interaction d'une molécule de *Small RNA zippers* avec 2 molécules de miRs b. Connexion de plusieurs miRs via les *Small RNA zippers* : formation d'un duplex (Meng et al., 2017).

7. d) Les bloqueurs de sites (TSB pour *Target Site Blocker*)

Les **bloqueurs de sites** sont des oligonucléotides antisens conçus afin d'empêcher la fixation du miRNA mature endogène sur la séquence complémentaire de son ARNm cible. Le rôle d'un TSB est de masquer cette séquence cible du miRNA par hybridation avec une haute affinité. De cette manière, le miRNA ne peut plus interagir avec son ARNm d'intérêt. Les TSB n'induisent pas la dégradation de l'ARNm sur lequel ils se fixent (Figure 56).

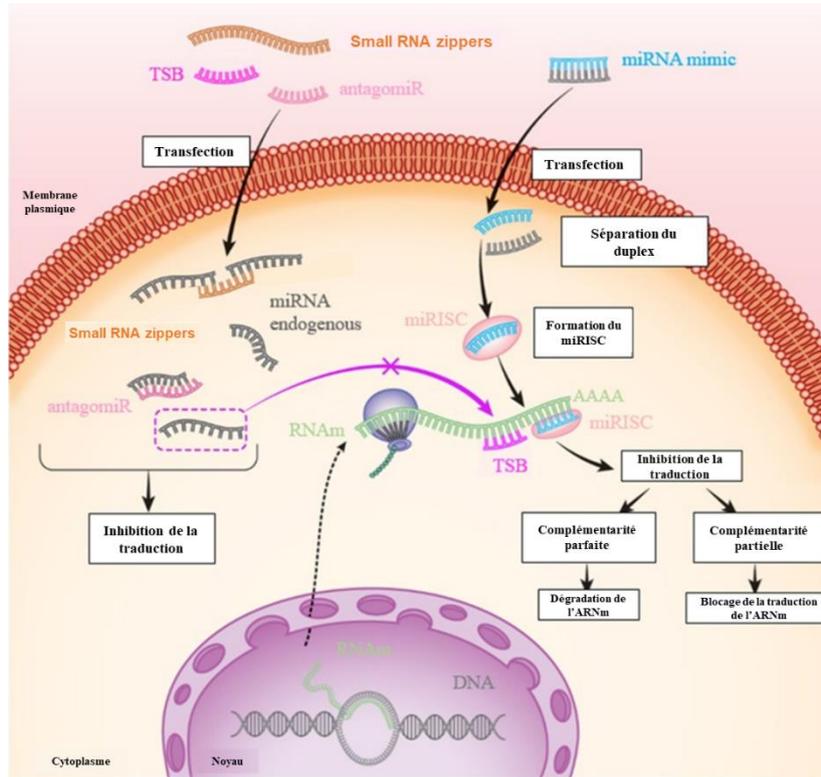


Figure 56 : Mode d'action des anti-miRNAs, des mimics, des *Small RNA zippers* et des TSB (Modifié à partir de (Bardin et al., 2018))

CHAPITRE II : *Résultats et discussion*

II) Dérégulation de miRNAs dans la Progeria : quelle implication dans les processus physiopathologiques ?

II. A) Intérêt, hypothèse et objectifs de l'étude

La Progeria de Hutchinson-Gilford est une maladie génétique très rare caractérisée par un vieillissement précoce et accéléré causée par l'accumulation de progérine dans le noyau de la plupart des cellules de l'organisme. Les microARNs, puissants régulateurs de l'expression génique, sont décrits comme étant dérégulés dans nombreux contextes pathologiques. Certaines de ces dérégulations peuvent participer aux mécanismes physiopathologiques et/ou représenter des biomarqueurs de ces pathologies. De nombreuses études portant sur le lien entre la dérégulation de l'expression des miRNAs et le vieillissement, les pathologies liées à l'âge ou encore la durée de vie dans les organismes modèles ont été réalisées, mais peu d'entre elles se sont focalisées sur la Progeria. Nous avons émis l'hypothèse que des miRNAs pouvaient être dérégulés dans la Progeria, et qu'ils pouvaient participer à la physiopathologie de la Progeria et de syndromes génétiques apparentés.

Ainsi, **en 2014**, notre équipe a initié une étude en réalisant une analyse de l'expression de 375 microARNs (miRNome) par une technique de RT-qPCR dans des fibroblastes dermiques de 5 patients HGPS (forme classique) et de 5 témoins. Nous avons choisi également d'étudier le profil d'expression de ces miRNAs à des passages précoces (P12±2) et tardifs^a (P20±1) afin de déterminer l'impact du nombre de passages, reflétant *in vitro* le « vieillissement » à l'échelle cellulaire, sur la dérégulation de ces miRNAs en lien avec l'accumulation croissante de la progérine. Cette étude miRNome nous a permis de mettre en évidence une dérégulation de 14 miRs (8 surexprimés et 6 sous-exprimés) dans les fibroblastes de patients HGPS. Parmi les miRNAs différentiellement exprimés, j'ai choisi d'étudier le miR-376a-3p et le miR-376b-3p, tous deux identifiés comme surexprimés. Ces miRNAs appartiennent à un même *cluster* de gènes de miRNAs localisé dans la région chromosomique 14q32 et partagent une séquence *seed* identique. J'ai choisi ces 2 miRNAs en me basant sur les données de la littérature décrivant leur implication dans des processus cellulaires du vieillissement, le cycle/prolifération cellulaire et l'autophagie, ces processus étant altérés dans la Progeria. **L'objectif de cette étude** a été d'évaluer, à l'aide de tests fonctionnels, leur implication dans la régulation du cycle cellulaire, de la prolifération, de l'autophagie et dans

^a Ces passages concernent 3 patients et 2 témoins

l'induction de la sénescence par l'étude de fibroblastes de patients HGPS et de témoins, afin de comprendre leur rôle dans la physiopathologie de la Progeria. Nous avons par ailleurs cherché à comprendre le mécanisme à l'origine de la dérégulation de ces miRNAs en lien avec l'accumulation progressive de progérine dans les cellules de ces patients. Ce travail a été réalisé en collaboration, pour la partie bio-informatique, avec le Dr Anaïs Baudot (Groupe « *Networks and Systems Biology for Disease* ») et de son étudiante en Thèse Elva Novoa, et, pour la partie épigénétique, avec le Dr Frédérique Magdinier (Equipe « *Epigenetics, chromatin and disease modeling* »), de son étudiant en Thèse Kilian Mazaleyrat et de Jérôme Robin (chercheur INSERM). Pour la partie concernant le cycle cellulaire, la prolifération et la sénescence, les tests fonctionnels ont été réalisés par moi-même, pour la partie concernant l'autophagie, par le Dr Diane Frankel.

Les résultats de cette étude font l'objet d'un article scientifique original dans lequel je suis co-premier auteur, soumis le 18 août 2019 dans le périodique « *Aging Cell* », intitulé : « *Overexpressed miR-376a-3p and miR-376b-3p in Hutchinson-Gilford Progeria fibroblasts inhibit cell cycle, induce senescence and reduce progeria clearance through autophagy* ».

En 2017, nous avons réalisé une 2nde étude miRNome couplée à une étude transcriptomique incluant les lncRNAs par séquençage haut débit (NGS), dans le cadre d'un projet plus large financé par l'AFM (Association Française contre les Myopathies) visant à étudier des fibroblastes dermiques et des cellules iPS et dérivées d'iPS (MSCs et VSMCs), provenant de témoins, de patients HGPS et de syndromes apparentés. Les premiers résultats de cette étude 'miRNome/transcriptome' seront abordées dans la partie II.D de ce manuscrit. **L'objectif de cette 2nde étude** est d'identifier des dérégulations communes de microARNs et de transcrits chez des patients HGPS et des syndromes apparentés en évaluant leur implication dans la physiopathologie de ces maladies avec vieillissement précoce et accéléré, pour peut-être à terme, proposer des thérapeutiques communes.

ARTICLE

« Overexpressed miR-376a-3p and miR-376b-3p in Hutchinson-Gilford Progeria fibroblasts inhibit cell cycle, induce senescence and reduce progeria clearance through autophagy ».

Diane Frankel*, **Valérie Delecourt***, Elva-María Novoa-del-Toro, Jérôme Robin, Kilian Mazaleyrat, Sophie Perrin, Catherine Bartoli, Frederique Magdinier, Anaïs Baudot, Nicolas Lévy, Elise Kaspi, Patrice Roll*

* These authors contributed equally to this work

Soumission le 18/08/2019 dans « Aging Cell » (IF₂₀₁₈ : 7,346)
« Major revision with resubmission encouraged (09-Oct-2019) »

**Overexpressed miR-376a-3p and miR-376b-3p in Hutchinson-Gilford Progeria fibroblasts
inhibit cell cycle, induce senescence and reduce progerin clearance through autophagy**

Diane Frankel^{1¶}, Valérie Delecourt^{2¶}, Elva-María Novoa-del-Toro², Jérôme D. Robin², Sophie Perrin³,
Catherine Bartoli², Kilian Mazaleyrat², Frederique Magdinier², Anaïs Baudot², Nicolas Lévy⁴, Elise
Kaspi¹, Patrice Roll^{1*}

1- Aix Marseille Univ, APHM, INSERM, MMG, Hôpital la Timone, Service de Biologie Cellulaire,
13385 Marseille, France

2- Aix Marseille Univ, INSERM, MMG, Marseille, France

3- ProGeLife, 13385 Marseille, France

4- Aix Marseille Univ, APHM, INSERM, MMG, Hôpital la Timone, Département de Génétique
Médicale, 13385 Marseille, France

¶ These authors contributed equally to this work.

***Corresponding author:** Patrice Roll, MD, PhD, Aix-Marseille Univ, INSERM, MMG, U 1251,
Faculté de Médecine de la Timone, 27 Bd Jean Moulin, 13385 Marseille Cedex 5, France, E-mail:
patrice.roll@univ-amu.fr, Tel: +33 491 324 939, Fax: +33 33 491 804 319

Authors e-mail addresses: diane.frankel@univ-amu.fr; valeriedelecourt22@gmail.com;

elva.novoa@inserm.fr; jerome.robin@univ-amu.fr; mazaleyrat.kilian@gmail.com;

sophie.perrin@univ-amu.fr; catherine.bartoli@univ-amu.fr; frederique.magdinier@univ-amu.fr;

anais.baudot@univ-amu.fr; nicolas.levy@univ-amu.fr; elise.kaspi@univ-amu.fr; patrice.roll@univ-amu.fr.

Running title: miR-376a/b roles in HGPS

Keywords: lamins, microRNA, Hutchinson-Gilford progeria syndrome, autophagy, senescence, miR-
376

Summary

Hutchinson-Gilford progeria syndrome (HGPS) is a rare genetic disorder, in which an abnormal and toxic protein called progerin, accumulates in cells nuclei leading to major cellular defects. Among them, chromatin remodeling drives gene expression changes, including miRNA deregulations. In our study, we evaluated miRNA expression profiles in HGPS fibroblasts at different passages in comparison to controls. We identified an enrichment of overexpressed miRNAs, particularly those belonging to the 14q32.2-14q32.3 miRNA cluster. Using 3D FISH and chromatin immunoprecipitation, we demonstrated that the overexpression of these miRNAs is mediated by chromatin remodeling at this specific locus in HGPS fibroblasts. Overexpressed miR-376a-3p and miR-376b-3p particularly retained our attention. In control fibroblasts, we demonstrated that their overexpression was modulating cell cycle, thus decreasing proliferation and increasing senescence. In HGPS fibroblasts, inhibition of these miRNAs increases autophagy, leading to progerin clearance. By targeting these major processes linked to aging, these two miRNAs could play a pivotal role in the pathophysiology of HGPS.

1 Introduction

Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome (HGPS; OMIM #176670) is a rare genetic disease affecting about one in 8-10 million children. HGPS children appear healthy at birth and progressively develop clinical features of premature and accelerated aging within the first years of life. Classical symptoms include alopecia, osteoporosis, thin skin, loss of subcutaneous fat and growth retardation, whereas cognitive functions are preserved. Myocardial infarction is the most frequent cause of death, which occurs at the mean age of 14.6 years old (Gordon et al., 2014b). HGPS is mainly caused by a de novo mutation (c.1824C>T, p.G608G) in exon 11 of the LMNA gene, encoding A-type lamins nuclear proteins (De Sandre-Giovannoli et al., 2003; Eriksson et al., 2003). This mutation leads to the production of a 50 amino acids truncated farnesylated prelamin A, called progerin. This toxic protein affects the structure and functions of the nucleus and induces multiple cascades of effects in HGPS cells. For instance, progerin induces mechanical defects, slows down proliferation and cell cycle, alters chromatin organization, impairs DNA repair, thereby enhances senescence (Cau et al., 2014). Moreover, progerin accumulates in cells, probably due to deficiencies in its clearance. Clearance deficiencies might involve autophagy, as suggested by several studies (Cenni et al., 2011; DuBose et al., 2018).

Identification of the role of the miR-9 microRNA (miRNA) HGPS in 2012 led to an incremental understanding of the disease (Jung et al., 2012b; Nissan et al., 2012). MiRNAs are small non-coding RNAs (19-25 nucleotides) that control gene expression mostly by pairing the 3'UTR of messenger RNAs (mRNAs), leading to translational repression or mRNA degradation (Kim and Nam, 2006). MiR-9 which is highly expressed in physiological conditions in neurons is responsible for the absence of lamin A in neuronal cells of healthy subjects and lamin A and progerin in HGPS patients. This miRNA binds to the 3'UTR of wild-type prelamin A and progerin transcripts, triggering their degradation, which could explain the normal neuronal development and the absence of deleterious effects of progerin in the brain of HGPS children. Some miRNAs have been identified as dysregulated in laminopathies and associated with deleterious effects (Frankel et al., 2018b). To note, only 4 miRNAs have been implicated in progeria models, mainly on *Zmpste24*^{-/-} mouse model (Mariño et al., 2010b; Ugalde et al., 2011b;

Xiong et al., 2015a; Zhang et al., 2017a). To our knowledge, no global profiling of miRNAs dysregulation in HGPS fibroblasts has been reported so far.

The aim of our study is to identify miRNAs dysregulated in human HGPS fibroblasts and to assess their potential involvement in the pathophysiology of the disease. We profiled the expression of 375 miRNAs in 5 patients and 5 controls. We identified 14 overexpressed miRNAs and an enrichment of miRNAs from the 14q32.2-14q32.3 cluster associated with chromatin modifications. We focused on miR-376a-3p and miR-376b-3p, two miRNAs from this cluster belonging to the same family. We uncovered the role of these miRNAs as potential actors in HGPS pathophysiology by triggering inhibition of cell cycle, autophagy and progerin clearance, ultimately leading to premature senescence.

2 Results

2.1 Profiling miRNA expression in HGPS fibroblasts

We profiled the expression of 375 miRNAs using a quantitative RT-PCR approach in 5 HGPS and 5 controls fibroblasts at Passage 12 ± 2 (P12 \pm 2). In order to evaluate the evolution of the miRNA expression in the context of ‘cell aging’ (Benson et al., 2010), we also included a later passage (P20 \pm 1) for two controls (C1 and C5) and three patients (HGPS2, HGPS3 and HGPS4). It is to note that the proliferation ceased before P20 for the two other patients (HGPS5 and HGPS6), because of early senescence. We considered 188 out the 375 tested miRNAs as expressed and kept them for further analyses. Surprisingly, unsupervised hierarchical clustering of these 188 expressed miRNAs did not classify the HGPS and control fibroblasts into two separate groups (**Figure 1A**). Neither fibroblast samples from the same subject at different passages cluster together, except for one control (C1).

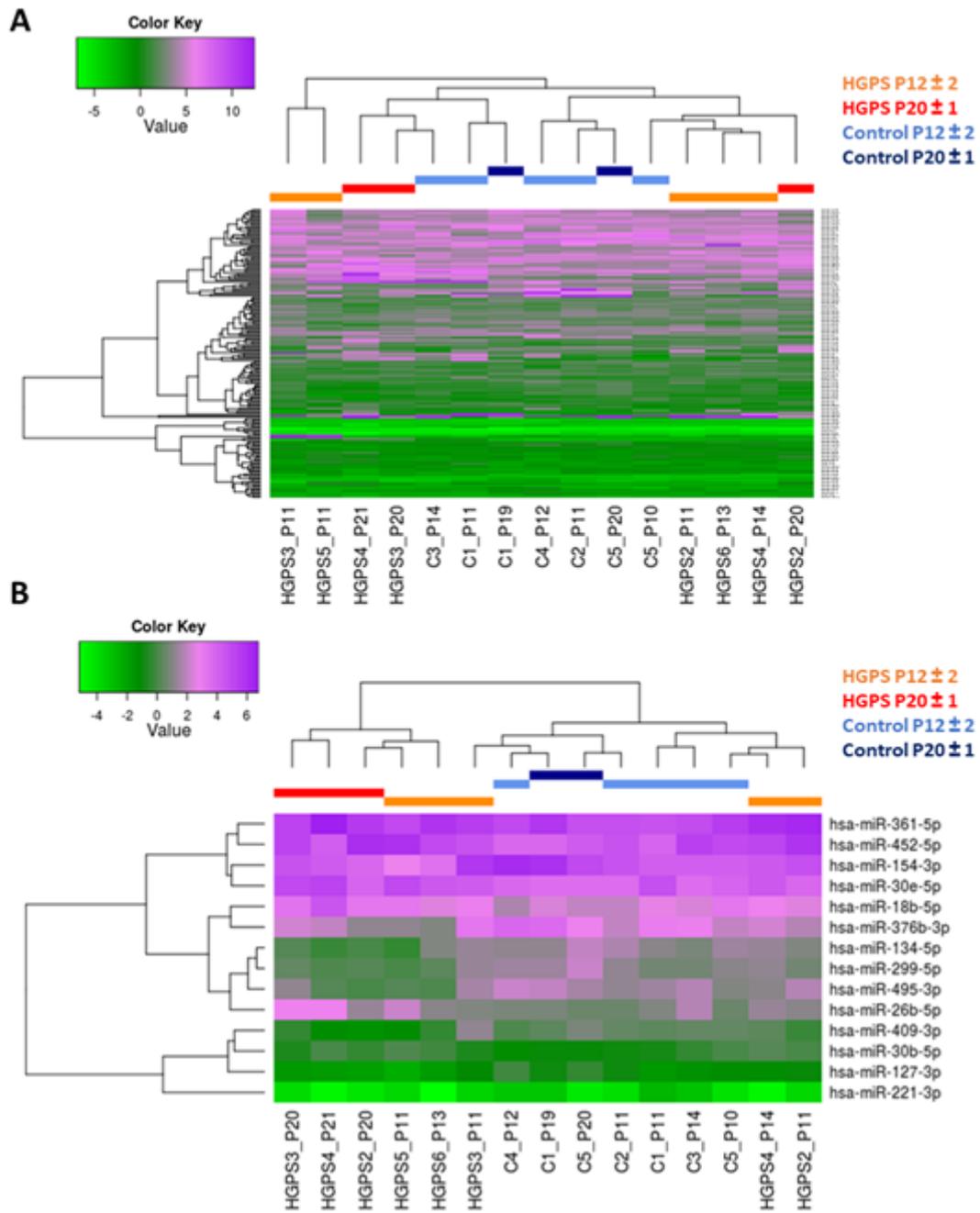


Figure 1: Unsupervised hierarchical clustering of (A) the 188 miRNAs expressed in HGPS and control fibroblasts and (B) the 14 differentially expressed miRNAs in HGPS and control fibroblasts, and without deregulation in controls. Each column represents the miRNAs expression profile in HGPS and control samples (dCq, see Table S1). Color scale correspond to the miRNA expression level represented by ΔCq values.

We then performed statistical analyses to select miRNAs of interest, i.e. differentially expressed ($p < 0.05$ between HGPS and control fibroblasts), and with stable expression in all control samples (fold-change > 0.5 or < 2 between each control and all controls). This analysis revealed 14 miRNAs of interest (**Table 1**). Unsupervised hierarchical clustering of these 14 miRNAs separates samples into two different groups (**Figure 1B**). The first group includes 3 patients' fibroblasts at late passage $P20 \pm 1$ and two patients' fibroblasts at early passage $P12 \pm 2$ whose proliferation ceased before P20. The second group includes all controls and the 3 other patients' samples at $P12 \pm 2$. This clustering suggests that miRNAs expression profile of patients at early passage ($P12 \pm 2$) could be similar to controls or to other patients at later passage ($P20 \pm 1$), probably linked to the senescent state of the cells. Among the 14 miRNAs, only miR-376b-3p and miR-409-3p were upregulated with a Fold-Change > 2 (FC) (**Table 1**). Interestingly, when considering the 14 differentially expressed miRNAs, there is a significant enrichment ($p < 0.05$) of miRNAs located in a large cluster of miRNAs in the chromosomal 14q32.2-14q32.3 region (**Table 1**). In particular, 7 out of the 8 upregulated miRNAs and none of those that are downregulated are located within this cluster. We thus wondered whether these expression changes might result from local chromatin remodeling, enhancing transcription in this miRNA cluster.

miRNA	Fold-Change	<i>p</i>	Chromosomal location
miR-376b-3p	2,22	0.0194	<u>chr14:101040436-101040535</u>
miR-409-3p	2,14	0.0328	<u>chr14:101065300-101065378</u>
miR-134-5p	1,97	0.0113	<u>chr14:101054687-101054759</u>
miR-495-3p	1,93	0.0232	<u>chr14:101033755-101033836</u>
miR-221-3p	1,81	0.0409	chrX:45746157-45746266
miR-154-3p	1,74	0.0349	<u>chr14:101059755-101059838</u>
miR-127-3p	1,66	0.0280	<u>chr14:100882979-100883075</u>
miR-299-5p	1,66	0.0199	<u>chr14:101023794-101023856</u>
miR-30e-5p	0,68	0.0253	chr1:40754355-40754446
miR-30b-5p	0,67	0.0145	chr8:134800520-134800607
miR-26b-5p	0,65	0.0300	chr2:218402646-218402722
miR-361-5p	0,64	0.0134	chrX:85903636-85903707
miR-18b-5p	0,64	0.0244	chrX:134170041-134170111
miR-452-5p	0,60	0.0120	chrX:151959628-151959712

Table 1: 14 miRNAs differentially expressed in HGPS fibroblasts as compared to controls and without deregulation in control fibroblasts. Seven out the 8 overexpressed miRNAs are located in the same chromosomal region (14q32.2-14q32.3). Two miRNAs, miR-376b-3p and miR-409-3p, have a fold-change > 2 (in red).

2.2 miRNAs dysregulation in the 14q32 region is associated with epigenetic changes

A-type lamins are involved in chromatin organization, and contact repressed genomic regions called Lamin Associated Domains (LADs) (Guelen et al., 2008; Robin and Magdinier, 2016b). Since the 14q32.2-14q32.3 miRNA cluster (hereafter called 14q32 cluster) is localized in the vicinity of one of these LADs (Rao et al., 2014), we investigated the topology of the locus by a three-dimensions fluorescence in situ hybridization technique (3D-FISH) using a DNA probe spanning the region of interest (RP11-123M6) and a probe targeting the most unique telomeric region of chromosome 14q (subtelomeric probe) in control fibroblasts C5, and patient fibroblasts HGPS1 and HGPS2 (**Figure 2A and B**). The miRNAs' cluster is localized 5Mb away from the telomeres. The subtelomeric probe was used to evaluate changes in the position of the miRNAs' cluster, relative to the telomeric region.

We assessed the position of the locus, relative to the nuclear periphery and the formation of long-distance loops. In control fibroblasts (C5), we showed that the probe spanning the 14q32 cluster of interest and the subtelomeric probe are colocalized in 70% of the nuclei and are close to the nuclear envelope (**Figure 2B, C and D**). On the contrary, in HGPS fibroblasts, the probes are colocalized in less than 10% of the nuclei ($p < 0.001$, Chi-square test, **Figure 2B and C**). Moreover, as compared to the control cells, the distance between the miRNA cluster probe and the nuclear periphery is significantly increased in HGPS cells, whereas the probe targeting the subtelomeric region stays close to the nuclear periphery ($p < 0.0001$ for HGPS1 and $p < 0.01$ for HGPS2; ANOVA, **Figure 2D**). This indicates that disruption of the integrity of the nuclear lamina in HGPS cells modifies the organization of the miRNA cluster locus. To determine if progerin is the cause of this cluster delocalization, we transfected HGPS5 fibroblasts with antisense morpholinos (AON) targeting exons 10 and 11 of the LMNA gene. These AONs reduce the production of progerin (Harhour et al., 2016b). We showed that AON transfection restores the colocalization between the two probes and the proximity to the nuclear envelope as compared to control conditions (scramble AON and endoprotein, **Figure 2E, F and G**), highlighting the direct link between progerin production and changes in the topology of this locus.

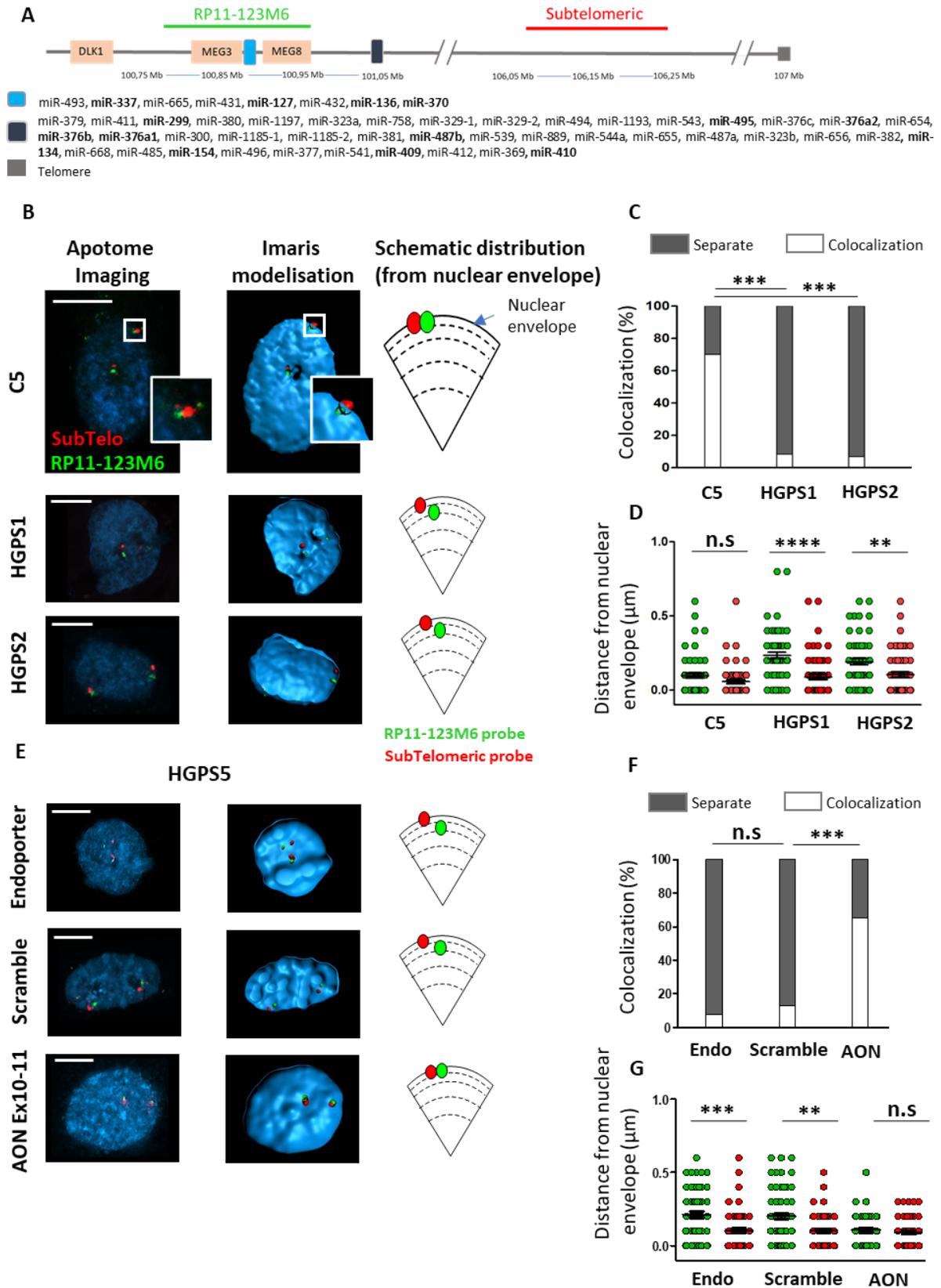


Figure 2: Epigenetic modifications in HGPS fibroblasts.

A: Schematic map of a part of 14q chromosome containing the cluster of miRNAs. The RP11-123M6 probe (green) stains a part of the cluster of miRNAs; a subtelomeric probe (red) targets the most unique telomeric region of chromosome 14q. miRNAs in bold are differentially expressed in our miRNome study. **B and E:** Images of 3D-FISH obtained with apotome microscope (Carl Zeiss Microimaging, Jena, Germany) and processed with IMARIS for $n \approx 30$ nuclei per sample. Schematic distribution of the probes

relative to the nuclear envelope is represented for the three samples. **(B)**: C5, HGPS1 and HGPS2 fibroblasts; **(E)**: HGPS5 fibroblasts transfected with endoportor only, scramble AON or exon 10 and exon 11 AON; representative images are shown; scale bar represents 5 μ m. **C and F**: Percentage of colocalized and separated probes in **(C)** C5, HGPS1 and HGPS2 fibroblasts, **(F)** HGPS5 fibroblasts transfected with endoportor only (Endo), scramble AON or exon 10 and exon 11 AON (Chi-square test, $p < 0.001$). **D and G**: Distance between the probes and the nuclear envelope; **(D)** in control fibroblasts C5, ($p > 0.05$) and in patients HGPS1 and HGPS2, ($p < 0.001$ and $p < 0.01$ respectively; ANOVA) **(G)**: In HGPS5 fibroblasts transfected with endoportor (Endo) or with scramble AON ($p < 0.001$ and $p < 0.001$ respectively; ANOVA), or with exon 10 and 11 AON ($p > 0.05$).

To complete these results, we assessed the local chromatin structure in C5 (P22), HGPS1 (P10 and P22) and HGPS5 (P14 and P19) fibroblasts, by chromatin immunoprecipitation combined with quantification of enrichment by droplet digital polymerase chain reaction (ChiP-ddPCR) for different sites across the cluster, i.e. miR-376a (miR-376a-1 and miR-376a-2), miR-376b and other miRNAs (**Table S2**) using antibodies against CTCF and H3K36me3 shown to be enriched at this locus (UCSC genome browser (Casper et al., 2018)).

miR	Forward (F)/Reverse (R)	Sequence
miR-300	F	CTCTACCATGCAGATCCCA
	R	GGAGTCAGCCTTGTCCCAA
miR-376a1	F	TCGTCTGCCTCATGTGACTT
	R	TGTGTCTGTCCGTCCTGTAC
miR-376a2	F	GCTGCTTTGAAAACCTCGGA
	R	ATTATGTGTGCACCAAGGGC
miR-376b	F	TTTGCCTTTCCAGAGCCCA
	R	GCCCTACGGTCTCTTCCAG
miR-376c	F	TGCTTAGGTTTCATGCTTTCCAG
	R	ACCGACTTTCCACTTACCCT
miR-654	F	CAAATGCTGCCTTGGGATCA
	R	GACAACACACCACAGCCTG
miR-1185-1	F	CAGAGAGAGTTGGCCCATGA
	R	CTCCTGGTGAACACTGGCTA
miR-1185-2	F	AGATGAGGCTTGTCACCGG
	R	ACGCAAATGAGAGTCTCCCC

Table S2: List of primers used for ChiP-ddPCR.

We observed changes in CTCF and H3K36me3 enrichment in HGPS patients as compared to control, and between early and late passages in patients' fibroblasts, suggesting that changes in the expression of different miRNAs at the 14q32 cluster in progerin-expressing cells, is associated with local chromatin changes between early and late passages in HGPS fibroblasts that could explain the evolution of miRNAs expression in this cluster (**Figure S1 A and B**).

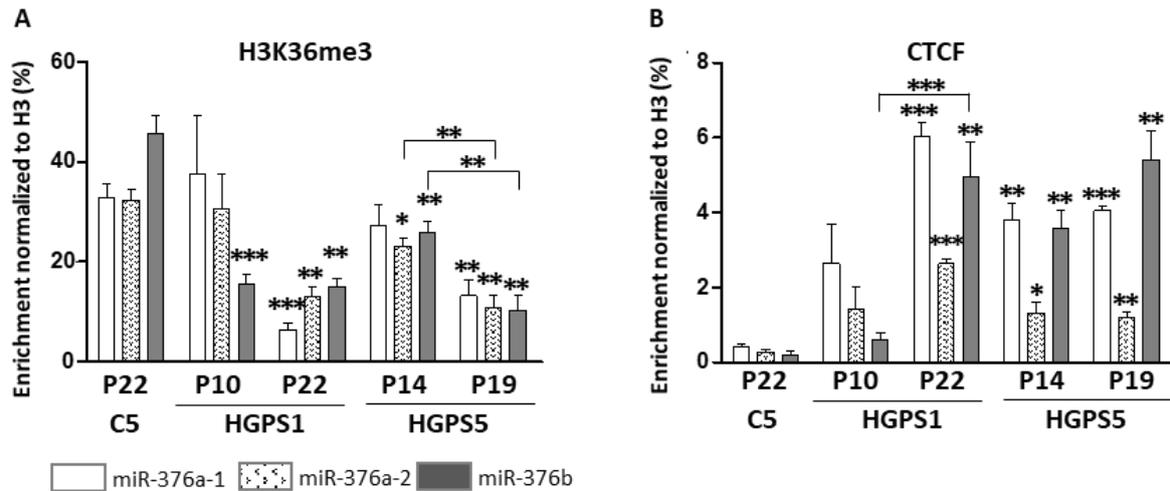


Figure S1: Enrichment of (A) H3K36me3 and (B) CTCF in C5, HGPS1 and HGPS5 at different passages and on 3 different loci that belong to the cluster 14q32. We assessed HGPS1 and HGPS5 fibroblasts at two passages (P10 and P22, P14 and P19 respectively) and C5 fibroblasts at P22. HGPS fibroblasts exhibited lower level of H3K36me3 marks and increased CTCF binding as compared to control. Only HGPS1 at P10 exhibited comparable level of these marks, as compared to the control, except on the miR-376b locus where H3K36me3 was decreased. In HGPS5, H3K36me3 decreased between P14 and P19 on miR-376a-2 and miR-376b locus suggesting chromatin change during culture, whereas CTCF binding is increased at the miR-376b locus in HGPS1 between P10 and P22.

More importantly, progerin accumulation induces changes in long distance chromatin organization at the 14q32 miRNAs' cluster in HGPS fibroblasts, which can be corrected by progerin knock down.

2.3. Selection of miRNAs implicated in major pathways related to aging

Based on the results of miRNA expression profiling in HGPS fibroblasts, we focused our attention to the most upregulated miRNA among the 14 selected, miR-376b-3p (FC = 2.22). This miRNA belongs to the miR-376 family that includes miR-376a, miR-376b and miR-376c, all localized at the 14q32 locus. As miR-376a-3p and miR-376b-3p share a highly conserved sequence and the same seed sequence (**Figure 3A**), which is essential for the recognition of the target mRNA, they might be functionally related. Moreover, miR-376a-3p is upregulated in 3 out of the 5 patients, with a FC > 2 (**Table S1**). Interestingly, miR-376a-3p and miR-376b-3p have been described to inhibit autophagy by targeting Beclin-1, ATG4C and ATG5 in several cell models (Korkmaz et al., 2012a, 2013a; Yang et al., 2018). Additionally, miR-376a-3p has been described to inhibit cell cycle and proliferation in erythroid cells (Wang et al., 2011a). As autophagy is implicated in progerin clearance and as HGPS cells

undergo proliferation defects associated with premature senescence, these two miRNAs are excellent candidates for further functional validation. To confirm the miRNA expression profiling data, we individually quantified miR-376a-3p and miR-376b-3p expression by RT-qPCR analysis in HGPS1 and HGPS5 at different passages and confirmed their overexpression. Compared to controls, fold-change expression of these two miRNAs is within the same ranges at the different passages tested (**Figure 3B**). Furthermore, miR-376a-3p and miR-376b-3p expression is increased in HGPS1 between P10-11 and P19-20, a result consistent with chromatin changes that we observed during culture.

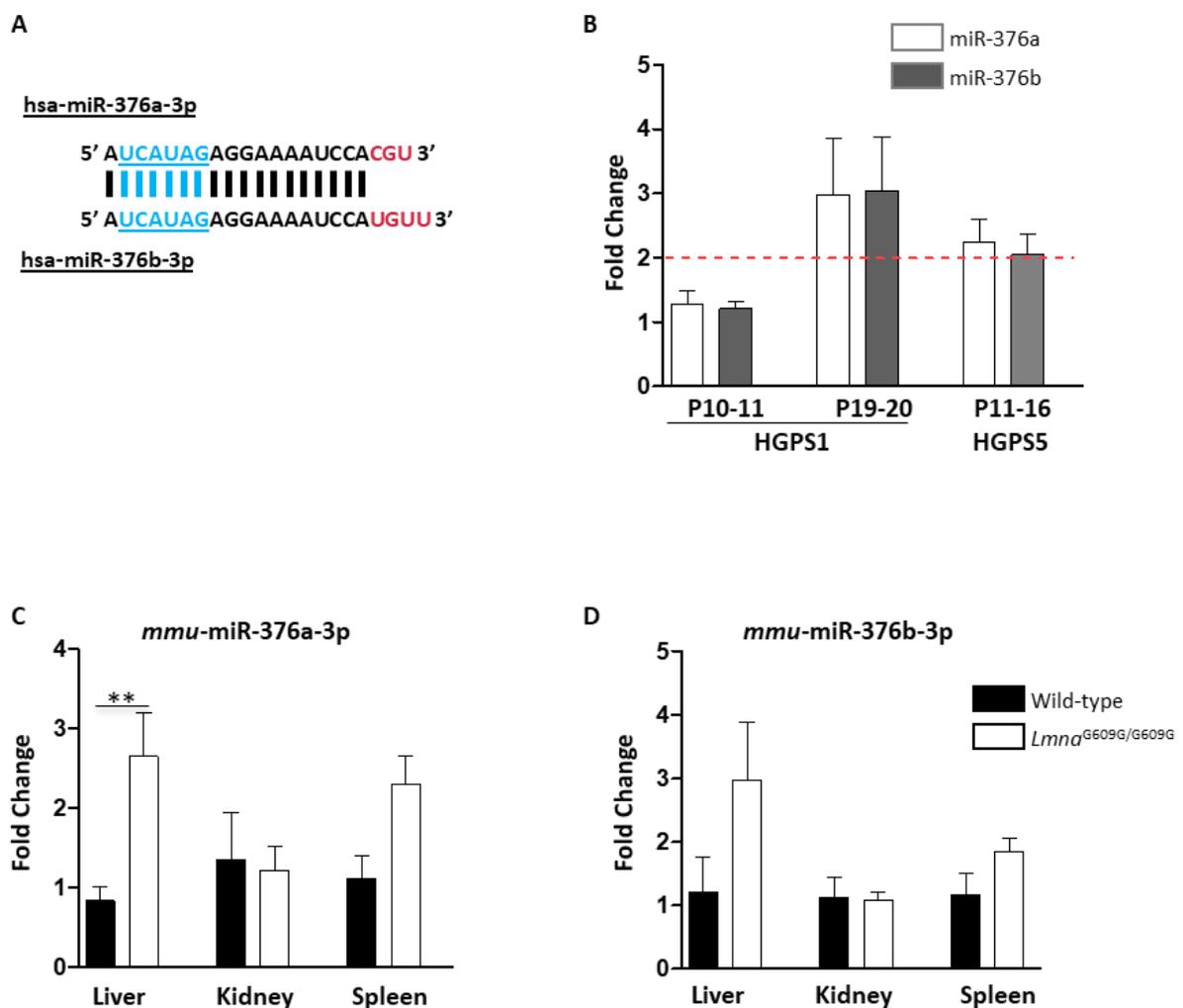


Figure 3: Expression of miR-376a-3p and miR-376b-3p in HGPS fibroblasts, and in wild-type and *Lmna*^{G609G/G609G} mice tissues.

A: *hsa-miR-376a-3p* and *hsa-miR-376b-3p* sequences; these two miRNAs belong to the miR-376 family and share 18 common nucleotides including the seed sequence (in blue), the last nucleotides at the 3' end are different (in red). Expression of miR-376a-3p and miR-376b-3p quantified by RT-qPCR in **(B)** HGPS fibroblasts as compared to control (C5) or **(C)** and **(D)** in the liver, the kidney and the spleen of wild-type and *Lmna*^{G609G/G609G} mice. Data are represented as the mean \pm SD, n=5, Mann-Whitney test.

We then confirmed *in vivo* the relevance of these two miRNAs in the LmnaG609G/G609G mouse model. This mouse model, which mimics the human (pG608G) mutation and part of the phenotype of HGPS patients, is an appropriate *in vivo* model of HGPS (Osorio et al., 2011b). We evaluated the expression of mmu-miR-376a-3p and mmu-miR-376b-3p in the liver, spleen and kidney of LmnaG609G/G609G mice as compared to wild-type mice. Among the tested organs, we observed an overexpression of mmu-miR-376a-3p in the liver of LmnaG609G/G609G mice (**Figure 3C**, Mann-Whitney t-test, $p = 0.0079$). Expression of the mmu-miR-376b-3p was also increased in the liver, although not significantly (**Figure 3D**, Mann-Whitney t-test, $p = 0.055$).

Altogether, these results, associated with data from the literature that shows an increased senescence in liver of LmnaG609G/G609G mice (Osorio et al., 2011b), suggest that miR-376a-3p and miR-376b-3p may be involved in the pathophysiology of the disease.

2.4 miR-376a-3p and miR376b-3p inhibit cell cycle and proliferation, leading to premature senescence in control fibroblasts

HGPS fibroblasts undergo premature senescence (Benson et al., 2010) and proliferate at a lower rate than controls (ANOVA, $p < 0.001$, **Figure 4A**). As miR-376a-3p and miR-376b-3p are overexpressed in HGPS fibroblasts, we hypothesized that they could play a role in cellular mechanisms. We transfected each of these two miRNAs or a miR-control in control fibroblasts (C5) (to reproduce the overexpression found in HGPS fibroblasts) and evaluated their effect on cell proliferation, cell cycle and senescence. Transfection with miR-376a-3p and miR-376b-3p significantly decreased proliferation as compared to the miR-control (Unpaired t-test, $p = 0.0029$, and $p < 0.0001$ respectively, **Figure 4B**). We coupled the proliferation test to a toxicity test and confirmed that the inhibitory cell proliferation effect of miR-376a-3p and miR-376b-3p is due to the miRNA, and not to a toxic effect of the transfection (**Figure S2**). Interestingly, miR-376a-3p overexpression decreases toxicity, suggesting that this miRNA could have a protective effect in fibroblasts.

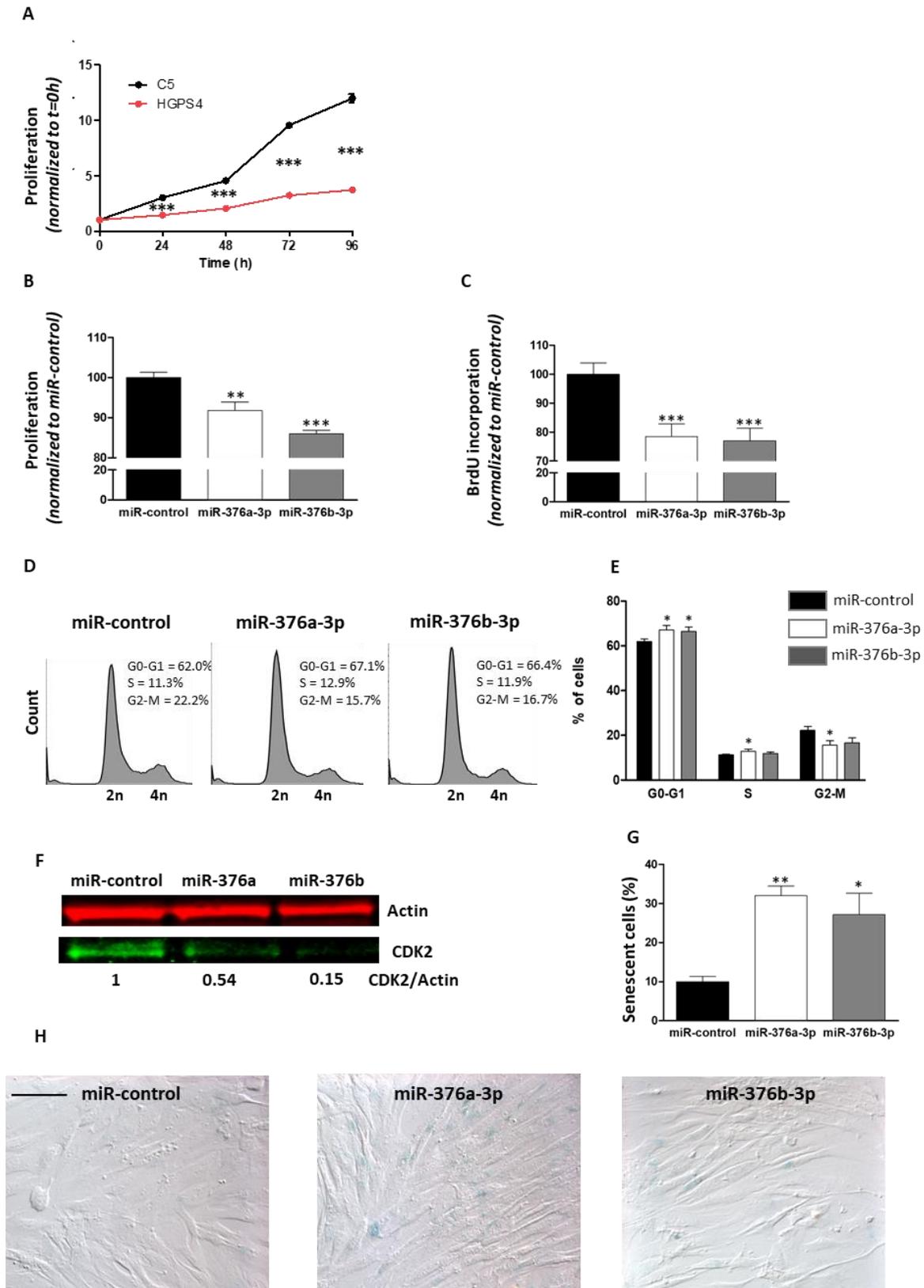


Figure 4: miR-376a-3p and miR-376b-3p modulate proliferation, cell cycle and senescence in C5 fibroblasts.

A: Proliferation of HGPS4 and C5 fibroblasts (ANOVA, n=3), values are normalized to t=0h. **B:** Cell proliferation measured with CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay (unpaired t-test, n=3), values are normalized to miR-control. **C:** DNA replication measured with BrdU relative expression (unpaired t-test, n=5). **D** and **E:** Cell cycle analysis. The histogram displays the percentage changes of G0-G1, S and G2-M when cells are transfected with miR-376a-3p, miR-376b-3p or miR-control (Mann-

Whitney test, one-tailed). **F**: Western blot analysis on fibroblast whole cell lysates. Immunodetection of CDK2 and actin after miR-376a-3p and miR-376b-3p transfection as compared to miR-control. **G** and **H**: SA- β -gal staining of cells transfected with miR-control, miR-376a-3p and miR-376b-3p. (Mann Whitney test, n=3), Scale bar represents 5 μ m. Data are represented as the mean \pm SD.

Moreover, the inhibitory effect induced by miR-376a-3p and miR-376b-3p overexpression on proliferation is also supported by a decrease of BrdU incorporation (unpaired t-test, p=0.007 and p=0.003, **Figure 4C**). All these results confirm the inhibitory properties of miR-376a-3p and miR-376b-3p on cell proliferation, particularly by impacting the DNA replication process at the S phase.

We next investigated whether miR-376a-3p and miR-376b-3p inhibit cell cycle progression using a flow cytometry approach. As shown in **Figure 4D and E**, control fibroblasts overexpressing miR-376a-3p and miR-376b-3p display a higher proportion of cells in the G0/G1 phase and a lower proportion of cells in the G2/M phase, as compared to miR-control, suggesting a slight modulation of cell cycle by these miRNAs. Moreover, as miR-376a is described to directly target CDK2, a cyclin-dependent kinase promoting G1/S transition (Wang et al., 2011a), we evaluated the level of this protein by western blot. The transfection of miR-376a-3p and miR-376b-3p induces a marked reduction in the CDK2 protein level (**Figure 4F**), which could explain the modification of cell cycle phase repartition after transfection.

Finally, we evaluated the proportion of senescent cells using a senescence-associated- β -galactosidase staining after miR-376a-3p or miR-376b-3p transfection and observed an increased percentage of senescent fibroblasts (Mann-Whitney test, p=0.005 and p=0.0237, **Figure 4G and H**).

Altogether, these results indicate that overexpression of miR-376a-3p or miR-376b-3p in control fibroblasts reduces cell proliferation, induces senescence, and impacts CDK2 that might, to a certain extent, modulate cell cycle progression.

2.5 miR-376a-3p and miR376b-3p inhibit autophagy and progerin clearance in HGPS fibroblasts

Autophagy recently became a pathway of major interest in HGPS, due to its role in progerin clearance (Harhoury et al., 2018b). However, little is known on the basal level of autophagy in HGPS fibroblasts. We first quantified autophagy in basal condition by flow cytometry using monodansylcadaverine

incorporation, associated with a viability marker, in fibroblasts from 3 HGPS patients and 4 controls. We followed the median fluorescence intensity (MFI) evolution between P13 and P20, when HGPS cells have a percentage of senescent cells comparable to controls (data not shown). This kinetics of autophagy level according to passage shows that i) there is an upward trend for patients and ii) the MFI is lower in HGPS fibroblasts as compared to control at P19-P20, corresponding to the passage before their entry in senescence (**Figure 5A**, Mann-Whitney t test, $p=0.0381$).

miR-376a-3p and miR-376b-3p have been described as autophagy inhibitors in several cell lines under starvation condition (Korkmaz et al., 2012a, 2013a). To assess the impact of these miRNAs on autophagy level in HGPS fibroblasts, we transfected anti-miR-376a-3p or anti-miR-376b-3p to specifically inhibit these endogenous overexpressed miRNAs. Transfection of anti-miR-376a-3p and anti-miR-376b-3p significantly increases the MFI, reflecting an autophagy level enhancement induced by transfection (**Figure 5B to E**, paired t-test $p<0.0001$ and $p=0.0433$ respectively). Furthermore, both anti-miR-376a-3p and anti-miR-376b-3p transfection enhance autophagy as compared to anti-miR-control, in HGPS cells, regardless of the passage, but at a variable level (**Figure 5B and C**).

To confirm these data and to evaluate the autophagic flux, we used ptfLC3, a mRFP-GFP tandem fluorescent-tagged LC3 plasmid (Kimura et al., 2007). This plasmid allows the discrimination between autophagosomes, which exhibit GFP and mRFP signals before the fusion with lysosomes, and autolysosomes that only exhibit the mRFP signal. The GFP-LC3 signal is lost in autolysosomes due to the lysosomal acidic and degradative conditions. The number of autophagosomes increased in HGPS fibroblasts, 48h after the anti-miR-376a-3p or anti-miR-376b-3p transfection (corresponding to 24 hours after the ptfLC3 plasmid transfection) as compared to control (**Figure 5F and G**). This boost could be a consequence of either an increased autophagic flux or an inhibition of the degradation step of autophagy. We then starved cells in HBSS medium in order to induce autophagy. Alternatively, we treated cells with an autophagic inhibitor, chloroquine, which alters the acidic pH of lysosomes, leading to inhibition of the fusion between autophagosomes and lysosomes, and thus to autophagosomes accumulation. The number of autophagosomes increased in cells treated with anti-miR-376a-3p or anti-miR-376b-3p under starvation, as compared to anti-miR-control, reflecting autophagy stimulation in these conditions. Surprisingly, starvation did not enhance autophagosomes formation as compared to

untreated cells. This observation may be explained by an inappropriate response to starvation in HGPS cells. As expected, antimiR-control transfected cells treated with chloroquine exhibit a higher number of autophagosomes as compared to untreated cells. Again, in the chloroquine condition, antimiR-376a or antimiR-376b transfection increases autophagosomes formation in comparison with antimiR-control. This result indicates that, in untreated cells, an increase of autophagosomes after antimiR-376a-3p or antimiR-376b-3p transfection may not result from inhibition of the fusion between autophagosomes and lysosomes but should be the consequence of autophagic flux stimulation. The ptfLC3 plasmid allows to differentiate autophagosomes from autolysosomes, however, the number of autolysosomes was low regardless the treatment.

Moreover, LC3B was also quantified using western blot, as a third test to evaluate the autophagy level, since the conversion LC3BI to LC3BII provides an indicator of the autophagic activity. As expected, LC3BII/LC3BI ratio was increased following antimiR-376a-3p and antimiR-376b-3p treatment, concomitantly with the decrease of progerin level (**Figure 5H**). Altogether, these results indicate that miR-376a-3p and miR376b-3p inhibit autophagy and progerin clearance in HGPS fibroblasts, as their inhibition using antimiRNAs leads to an autophagy activation associated with progerin decrease.

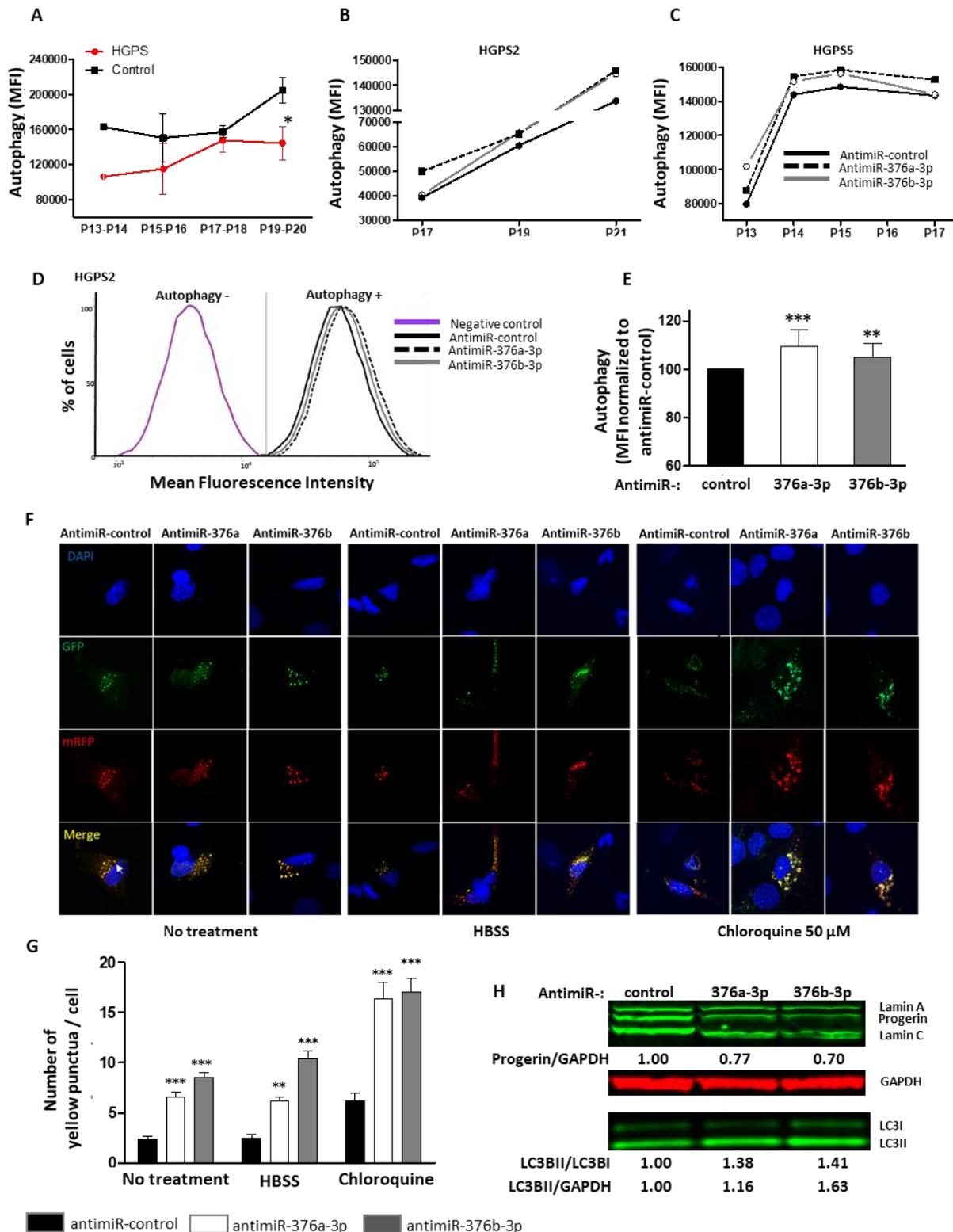


Figure 5: antimiR-376a-3p and antimiR-376b-3p increase autophagy and progerin clearance in HGPS fibroblasts.

A: Basal autophagy levels, represented by the mean fluorescent intensity (\pm SEM), performed by flow cytometry, on 4 controls and 3 HGPS fibroblasts from P13 to P20. Each subject has been tested at least at 3 passages. **B and C:** Autophagy levels after transfection of antimiR-control, antimiR-376a-3p or antimiR-376b-3p in **(B)** HGPS2 and **(C)** HGPS5. **D:** The histogram shows a representative experiment (HGPS2 P19) of autophagy level quantification by flow cytometry. **E:** MFI normalized to antimiR-control after transfection of antimiR-376a-3p or antimiR-376b-3p. $n = 5$, for three different patient

fibroblasts, Mann-Whitney test. **F**: Representative experiment of HGPS1 cells transiently transfected with anti-miRNAs and ptfLC3 plasmid and analyzed with fluorescence microscope (obj x63). **G**: The histogram shows autophagosomes quantification and indicates statistically significant increase of number of autophagosomes ($n = 3$). **H**: Western blot analysis on fibroblasts whole cell lysates. Immunodetection of lamin A/C, progerin, GAPDH and LC3BI and BII after anti-miR-376a-3p and miR-376b-3p transfection as compared to miR-control. Quantification of progerin and LC3BII/GAPDH ratio and LC3BII/LC3BI ratio ($n = 3$, from three different patients' fibroblasts). Data are represented as the mean \pm SD.

3 Discussion

The present study profiles the first miRNAs expression landscape in HGPS fibroblasts. As HGPS is a severe multisystem disease, we expected to observe different miRNAs expression profiles between HGPS and control fibroblasts. While unsupervised classification does not demonstrate a clear separation between expression profiles in patients versus controls, further focus on 14 differentially expressed miRNAs highlights that patient profiles at 'early' passage, segregate either with controls (representing a non-senescent state) or with patients at later passage (representing an advanced senescent state). Overall, we observed a high heterogeneity of miRNAs expression in all samples. In particular, miRNA expression varies according to cellular passages, emphasizing the need to consider this aspect.

To our knowledge, only two other studies reported miRNAs expression profiling in a progeroid context, either from mouse embryonic fibroblasts issued from the murine *Zmpste24*^{-/-} model, phenotypically close to HGPS (Xiong et al., 2015a; Zhang et al., 2017a) or from *Zmpste24*^{-/-} mouse liver. In these studies, several miRNAs such as miR-342-5p and miR-365 (Mariño et al., 2010b) or miR-1 and miR-29 family (Ugalde et al., 2011b), were found differentially expressed. These miRNAs are not dysregulated in our model but differences in the study model could explain this difference.

We identified 14 differentially expressed miRNAs, 6 under-expressed and 8 overexpressed in HGPS fibroblasts as compared to controls, with 7 out of the 8 overexpressed miRNAs belonging to the same cluster at the 14q32 region. This region is an imprinted locus that contains both maternally imprinted non-coding RNAs (MEG3, MEG8 and AS-RTL1) and paternally imprinted genes (DLK1, DIO3 and RTL1). Dysregulation of miRNAs belonging to this region has been described in several pathologies, mostly in cancers (Benetatos et al., 2013; Merkerova et al., 2018). In HGPS cells, progerin accumulates with passages and induces chromatin conformational changes (Harhour et al., 2017b; Robin and Magdinier, 2016b; Shumaker et al., 2006). We thus hypothesized that enrichment of overexpressed

miRNAs from the same region could be secondary to chromatin modulation. We observed that this locus at the vicinity of the inner nuclear membrane in control fibroblasts, whereas the distance is significantly increased in HGPS fibroblasts, suggesting the loss of its anchoring to the lamina. In addition, we observed modifications in the enrichment of the H3K36me3 chromatin mark and in the CTCF insulator protein across the miR-376a and miR-376b loci, both between patient and control fibroblasts, and at different passages in HGPS fibroblasts. These results suggest that overexpression of several miRNAs, including miR-376a-3p and miR-376b-3p, encoded from this cluster, could be mediated by modifications in the chromatin organization of this region, a hypothesis supported by other studies. Indeed, the spatial genome organization and compartmentalization in active and inactive chromatin domains is similar in control and proliferating HGPS cells (passage P17), whereas at later passage (P19) when HGPS cells have entered premature senescence, compartmentalization is lost and associated with changes in lamin A/C binding and H3K27me3 enrichment (McCord et al., 2013b). Moreover, Oldenburg et al. demonstrated that miR-335 is upregulated in human primary adipose progenitor cells carrying the LMNA p.R482W mutation. This mutation causes the loss of lamin A/C binding to the MIR335 locus and prevents acetylation of enhancers that also participates to miR-335 overexpression (Oldenburg et al., 2017). Additionally, in agreement with a role of chromatin in the regulation of this locus, other studies demonstrated that the treatment with an inhibitor of DNA methylation (i.e azacytidine) rescues the expression of miRNAs at the 14q32 cluster (Merkerova et al., 2018). Finally, the decrease of progerin induced by AON transfection relocates the miRNA cluster at the nuclear envelope, confirming the major role of A-type lamins in the topological organization of the genome and the deleterious effect of progerin accumulation on chromatin organization of HGPS cells' nuclei. These results also highlight the possibility of restoring the nuclear topology by a direct and targeted inhibition of progerin.

We demonstrated that miR-376a-3p or miR-376b-3p overexpression contributes to the cellular phenotype of HGPS fibroblasts. In our model, miR-376a-3p is upregulated in HGPS cells depending on the number of passages, and we demonstrated that its overexpression in control fibroblasts induces a decrease in proliferation. miR-376a-3p directly targets CDK2, a cyclin-dependent kinase promoting G1/S transition, in hematopoietic progenitor cells (Wang et al., 2011a). Our experiments demonstrate that overexpression of miR-376a-3p in control fibroblasts leads to a decrease in CDK2 expression,

suggesting that cell cycle modulation and proliferation inhibition in HGPS cells might result from the same mechanism. miR-376a-3p overexpression decreases other proteins involved in cell cycle such as CHK1, Cyclin D2 and Cyclin A (Martinho et al., 1998; Sheng et al., 2013; Yao et al., 2018), suggesting that other proteins involved in cell cycle regulation can be controlled by miR-376a-3p, even if these variations could be the result of indirect effects of the miRNA on cell cycle progression. In our study, miR-376b-3p overexpression also increases the proportion of cells in G0/G1. Therefore, as miR-376b-3p shares the same seed sequence as miR-376a-3p, CDK2 could also be directly targeted by this miRNA.

In our study, miR-376a-3p and miR-376b-3p increase cellular senescence. A decreased expression of miR-376a-3p in senescent endothelial cells after 6 and 12 weeks of cell culture has been previously shown (Yentrapalli et al., 2015). In contrast, our data show an increase of miR-376a-3p expression in cultured HGPS fibroblasts, probably revealing a cell type-dependent miRNA expression. A growing list of miRNAs is linked to senescence or other cellular mechanisms related to aging (i.e., telomere attrition, oxidative stress, DNA damage, autophagy) and are named ‘geromiRs’ (Williams et al., 2017b).

We investigated the consequence of miR-376a-3p and miR-376b-3p overexpression on autophagy in HGPS fibroblasts. We demonstrated that, in basal conditions, autophagy is decreased in HGPS fibroblasts at late passage (P19-20) as compared to controls. The inhibition of miR-376a-3p or miR-376b-3p significantly increases autophagy. We confirmed these results by autophagosomes quantification and western blot. We found a higher number of autophagosomes after anti-miR-376a-3p or anti-miR-376b-3p transfection, and an increase of the LC3BII/LC3BI ratio. These miRNAs decrease autophagy by targeting major autophagic proteins: ATG4c, Beclin-1, and ATG5, which could explain the increase of autophagosomes after the inhibition of those miRNAs (Korkmaz et al., 2012a, 2013a; Yang et al., 2018).

miR-376b-3p has been recently classified as a geromiR for its role in the loss of proteostasis via autophagy regulation (Caravia and López-Otín, 2015b). This mechanism of degradation and recycling of cellular components, including misfolded, mutant or abnormal proteins, has been increasingly explored in HGPS models as a therapeutic alternative, the activation of autophagy decreasing progerin accumulation in HGPS cells (Cao et al., 2011c; Cenni et al., 2011; DuBose et al., 2018; Gabriel et al., 2016; Harhour et al., 2017b). By inhibiting miR-376a-3p and miR-376b-3p, we demonstrated that the

increase of autophagy decreases progerin expression in HGPS cells, supporting results from other studies, including towards the development of therapeutic approaches. In agreement, a phase I/II monocentric clinical trial (NCT02579044) associating everolimus (an analogue of rapamycin that inhibits mTOR pathway and activates autophagy) and lonafarnib (a farnesyltransferase inhibitor) is currently conducted on HGPS patients. Other therapeutic alternatives targeting autophagy to enhance progerin clearance, such as specific proteasome inhibitors, are currently pursued in preclinical studies (Harhoury et al., 2017b).

Finally, to evaluate the relevance of our results *in vivo*, we quantified the expression of mmu-miR-376a-3p and mmu-miR-376b-3p in different organs from LmnaG609G/G609G mice. In liver, we found a significant overexpression of miR-376a-3p and a higher expression for miR-376b-3p. Interestingly, Osorio et al. demonstrated an increase of senescent cells in liver of LmnaG609G/G609G as compared to wild-type mice (Osorio et al., 2011b). This seems to be relevant for HGPS pathophysiology, in accordance with Wang et al., who performed a healthy human multiple-tissue expression profile and demonstrated an expression of miR-376a in brain, kidney and ovary, but a weak or absent expression in the liver (Wang et al., 2011a).

Altogether, our results further illustrate the complexity of the HGPS pathophysiology. We propose a pathophysiological model in which the accumulation of progerin leads to epigenetic modifications during cell culture in HGPS cells, leading to the overexpression of several miRNAs encoding genes located in the 14q32 cluster. Among them, miR-376a-3p and miR-376b-3p participate in the cell cycle modulation, leading to a decreased proliferation and a premature entry of cells into senescence. Moreover, miR-376a-3p and miR-376b-3p overexpression could amplify progerin accumulation in HGPS cells by targeting mRNAs encoding major proteins involved in the early stages of the autophagy process, thereby generating a deleterious vicious cycle (**Figure 6**).

Several limitations of our study warrant mention. Firstly, we demonstrated the role of miR-376a-3p and miR-376b-3p on proliferation, cell cycle and senescence using control fibroblasts as HGPS fibroblasts enter prematurely into senescence (a permanent and irreversible cell cycle arrest) and proliferate less. Based on our *in vitro* data, it could be of great interest to explore the role of these miRNAs *in vivo* in our LmnaG609G/G609G mouse model after administration of anti-miRNA LNA

inhibitors or by AAV-mediated delivery, as already performed in other pathological contexts (Xie et al., 2012). Moreover, even if we show a direct impact of miR-376a-3p overexpression on proven targets such as CDK2, we could not exclude that the effect on protein expression is indirect.

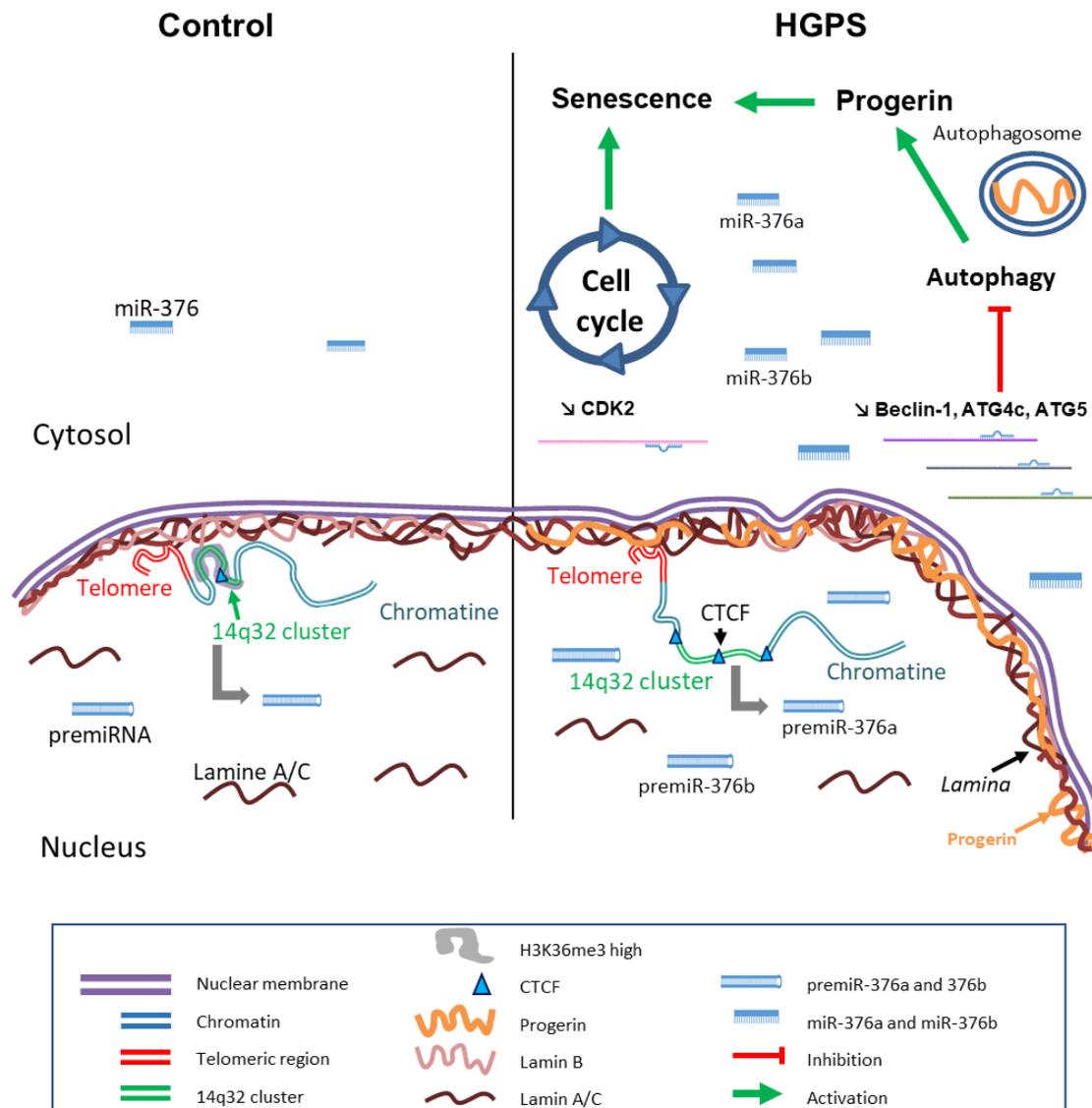


Figure 6: Hypothesis of molecular mechanisms involving miR-376a and miR-376b in HGPS fibroblasts. Progerin accumulation leads to a change in chromatin organization in the 14q32 miRNAs cluster resulting in the overexpression of several miRNAs. Among them, miR-376a-3p and miR-376b-3p overexpression decreases proliferation by modulating cell cycle and increases senescence. In HGPS fibroblasts, the inhibition of these miRNAs increases autophagy, leading to progerin clearance. Nuclear pores, plasma membrane, pri-miRNAs and proteins are not represented.

In conclusion, we propose that miR-376a-3p and miR-376b-3p participate to the pathophysiology of HGPS by modulating at least two main processes, cell cycle and autophagy, already described as impacted or playing a role in the disease. We further demonstrated how epigenetic modifications

participate in the dysregulation of several miRNAs in HGPS fibroblasts, with a direct role of progerin accumulation on the regulation of the miR-376a-3p and miR-376b-3p locus and the consequences of overexpression of these two miRNAs on cell cycle, proliferation, senescence, autophagy and progerin clearance. By targeting these major processes linked to aging, these two miRNAs could play a major role in the pathophysiology of HGPS. Our results thus, contribute to better understanding of the molecular processes occurring in HGPS cells, paving the way to new therapeutic strategies in this dramatic and to date, non-curable rare disease.

4 Experimental Procedures

4.1 Cells

Dermal fibroblasts from patients were issued from a skin biopsy, cultured and stored by the labeled Biological Resource Center (CRB TAC) (La Timone hospital, Assistance Publique des Hôpitaux de Marseille, France) or were purchased from the Coriell Institute for Medical Research (**Table 2**). All biological samples from CRB TAC were accompanied by a signed informed consent to use them for research purpose. In the manuscript, patients and controls are named as described in **Table 2**.

Patients						Controls				
CRB TAC	CRB TAC	CRB TAC	Coriell	Coriell	Coriell	CRB TAC	Coriell	Coriell	Coriell	Coriell
13-8243	13-5968	13-13622	AG 01972	AG 11498	AG 11513	13-13090	AG 07095	AG 08471	GM 08398	AG 08498
HGPS1	HGPS2	HGPS3	HGPS4	HGPS5	HGPS6	C1	C2	C3	C4	C5

Table 2: Identification and origin of fibroblasts.

4.2 Cell culture and transfection

Cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium low glucose (VWR, Radnor, Pennsylvania, USA), supplemented with 15% fetal bovine serum (ThermoFisher, Waltham, MA, USA), 2 mM L-glutamine (ThermoFisher) and 100 U/mL of penicillin, streptomycin and amphotericin B mix (ThermoFisher), at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. Mimics (hsa-miR-376b-3p, hsa-miR-376a-3p, Mimic Negative Control #1) were purchased from Dharmacon (Lafayette, Colorado,

USA). miRNA Inhibitors ('antimiR') (miRCURY LNATM miRNA power inhibitors hsa-miR-376a-3p and hsa-miR-376b-3p, miRCURY LNATM microRNA inhibitor control) were purchased from Qiagen (Valencia, CA, USA). Mimics (50 nM) and antimiR (25nM) were transfected using Lipofectamine RNAiMAX kit (ThermoFisher), according to the manufacturer's instructions. ptfLC3 was a gift from Tamotsu Yoshimori (Addgene plasmid # 21074). 250 ng of the plasmid were transfected using JetPRIME kit (Polypus transfection, Illkirch, France), according to the manufacturer's instructions. Images were acquired with an apotom system (Zeiss), at least 100 cells were examined per condition. Chloroquine was provided in the Autophagy Detection Kit (ab139484, Abcam) and cells were treated for 3h at 50µM. HBSS (ThermoFisher) was used for starvation (3 h). For the antisens morpholino oligonucleotides (AON) delivery, we used the endopoter system as previously described (Harhour et al., 2016b; Osorio et al., 2011b). HGPS5 fibroblasts were transfected with endopoter, with scrambled AON or with AON targeting *LMNA* exon 10 and exon 11 (Gene Tools, LLC, Philomath, OR, USA).

4.3 Mice

Total RNA was extracted for RT-qPCR from liver, kidney and spleen of four months-old wild-type mice and knock-in mouse model *Lmna*^{G609G/G609G}, carrying the c.1827C>T (p.Gly609Gly) mutation (Osorio et al., 2011b) (n = 5 of each). Animal experiments have been carried out in compliance with the ARRIVE (Animal Research: Reporting of in vivo Experiments) guidelines, the European guidelines for the care and use of laboratory animals (EU directive 2010/63/EU), and in accordance with the recommendations provided by the guide for the care and use of laboratory animals of the French National Institute for Health and Medical Research (INSERM) and the ethical committee of Aix Marseille University.

4.4 miRNA profiling by quantitative RT-PCR

We performed a miRNome analysis on fibroblasts from 5 patients (HGPS2 to HGPS6) and 5 controls (C1 to C5) at passage (P) 12 ± 2. For three of the five patients (HGPS2, HGPS3, HGPS4), the analysis was also performed at P20 ± 1. Among the 5 controls, two were also tested at P20 ± 1 (C1 and C5). Overall, 15 samples were profiled for miRNA expression (8 patient and 7 control samples).

Total RNA was extracted from dermal fibroblasts using the miRNeasy kit (Qiagen), according to the manufacturer's instructions. Samples were quantified by absorbance using NanoDrop DN-1000 spectrophotometer (ThermoFisher). cDNA was synthesized from 30 ng of total RNA using miRCURY LNA™ Universal RT microRNA PCR, Universal cDNA Synthesis Kit II (Qiagen), according to the manufacturer's instructions. microRNAs expression was investigated using microRNA Ready-to-use PCR, Human panel I (Qiagen). A 384-wells plate was prepared with a Biomek 3000 robot (Beckman, Brea, California, USA) and analyzed using the LightCycler 480 (Roche, Berlin, Germany). Quantification cycle (Cq) was used to calculate relative miRNA expression, using interpolate calibrators present in the 384-wells microRNA Human Panel I and Exiqon GenEx® software. To avoid inaccurate results, miRNAs with a Cq > 35 in at least 50% of samples were considered as not expressed and excluded from the analysis. Normalization (ΔCq) was calculated using the global mean of all expressed miRNAs (Cq \leq 35; n=114) and miRNAs relative expression (fold-change (FC)) was calculated by the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method, compared to controls mean (Mestdagh et al., 2009). During the last step of our miRNAs selection process, we excluded miRNAs presenting a fold-change > 2 or < 0.5 in at least one of the tested controls.

We performed t-tests on the normalized data (ΔCq), comparing the expression level of every miRNA in patients vs controls. We considered a miRNA to be significantly differentially expressed if the resulting *p*-value was < 0.05. To generate the heatmaps, we also used the normalized data (ΔCq). We calculated the euclidian distance between patient and control samples and used Ward D2 as the agglomeration method for the hierarchical clustering.

4.5 Quantification of individual miRNAs by quantitative RT-PCR

The expression level of specific miRNAs was obtained using miRCURY LNA™ Universal RT microRNA PCR, Exilent SYBR® Green master mix (Qiagen). Quantitative PCR amplifications were performed in triplicate using the primers for *hsa*-miR-376a-3p, *hsa*-miR-376b-3p, *mmu*-miR-376a-3p and *mmu*-miR-376b-3p (Qiagen) on a LightCycler 480 (Roche). Threshold cycle (Cq) was used to calculate relative miRNA expression by the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method, using normalization to *hsa*-SNORD49A or *mmu*-SNORD110 expression (Qiagen), which was defined using GeNorm and NormFinder in Exiqon

GenEx[®] software as the optimal reference for fibroblasts in our miRNome analysis. miRNAs were considered as upregulated as compared to control samples if the fold-change was ≥ 2 and down-regulated if the fold-change was ≤ 0.5 .

4.6 3D DNA FISH

We used a commercial probe against the most subtelomeric region of chromosome 14q (i.e., 14q32: 106,078,392- 106,261,579) along with a probe generated by Nick translation using the BAC clone RP11-123M6 (miRNA cluster: 100,834,432-100,861,026; CHORI) as template, following the same protocol and the same image processing described in (Robin et al., 2014). Images were acquired with a confocal system (LSM 800 with Airyscan Zeiss). After 3D reconstruction, at least 30 nuclei (60 alleles) were examined per condition, the volume of the probes, distances between their gravity centers, distances to the nuclear membranes and volume of nuclei were calculated and used for statistical analysis.

4.7 Chromatin immunoprecipitation (ChIP)

ChIP for H3, CTCF and H3K36me3 (Millipore) was performed according to the manufacturer's instructions (TruChIP, Covaris; and Magna ChIPA/G, Milipore). ChIPs were processed using a 4°C overnight incubation (concentration of antibodies at 1.5 μ g); 1 μ l of each preparation: IP, IgG, Rabbit non-immune Serum, No crosslink control, no Antibody control and 1% input were used as controls for digital droplet PCR analysis (Ludlow et al., 2014). Primers were designed for each miRNAs and surrounding regions enriched with histone marks using the UCSC genome browsers' tools (Table S2). Each PCR primer pairs was tested on genomic DNA to verify specificity and efficiency. Results were normalized to inputs and normalized to H3.

4.8 Proliferation and Toxicity assays

Control fibroblasts were seeded at 5,000 cells per well in 96-well with 100 μ L DMEM supplemented. The toxicity and the proliferation rates were determined 96h post transfection, using CellTox[®] Green Cytotoxicity Assay and CellTiter-Glo[®], respectively (Promega, Madison, WI, USA) according to the

manufacturer's instructions. The fluorescence and the luminescence were measured using GloMax[®] (Promega). All experiments were performed in triplicate.

The proliferation/replication was also evaluated 96 hours after miRNAs transfection, using the BrdU cell Proliferation ELISA Kit (ab126556, Abcam, Cambridge, UK) according to the manufacturer's instructions. In 3 wells, cells or BrdU were omitted to serve as negative controls for nonspecific binding. The absorbance was measured at 450 nm on GloMax[®] (Promega). Three independent experiments were performed for each assay.

4.9 Cell Cycle analysis

Cell cycle was analyzed on control fibroblasts using FxCycle[™] Far Red Stain (ThermoFisher), 48h post transfection. After trypsinization and centrifugation, cells were washed in PBS, centrifuged and fixed with Fixation Buffer (Biolegend, San Diego, USA) for 20 min at RT. Cells were washed with Intracellular Staining Permeabilization Wash Buffer (1/10, Biolegend), centrifugated and permeabilized with the same solution for 20 min at RT. After a last centrifugation, cells were resuspended with 1 mL of PBS, containing 1 μ L of FX Cycle Far Red and 5 μ L of PureLink[™] RNase A (ThermoFisher) and incubated 30 min at RT. Cell cycle distribution was analyzed on Attune cytometer (ThermoFisher). Results were analyzed using the FlowJo software (FlowJo software, Oregon, USA). Four independent experiments were performed for each assay.

4.10 Senescence Associated β -galactosidase Staining

Senescence was evaluated 96h post-transfection, on fibroblasts seeded in 4 chamber-wells slides (SPL Lifesciences, Korea), using a Senescence β -Galactosidase Staining Kit (Cell Signaling Technology Leiden, The Netherlands) according to the manufacturer's instructions. The percentage of stained cells was evaluated on a microscope (Leica, Wetzlar, Germany) by two independent observers using a manual blind counting. At least 100 fibroblasts were randomly selected for each condition. Results are expressed graphically as the mean percentage of senescent cells. Three independent experiments were performed.

4.11 Autophagy level quantification by flow cytometry

Autophagy was measured 48h post transfection with the Autophagy Detection Kit (ab139484, Abcam) according to manufacturer's instructions. Sytox (1/2,000 dilution, AAdvanced™ Dead Cell Stain Kits, ThermoFisher) was added at the last step to evaluate the percentage of dead cells and measure the autophagy level specifically on living cells. Samples were assessed using an Attune cytometer (ThermoFisher).

4.12 Western blot analysis

Western blot were performed as described in (Harhour et al., 2016b). The primary antibodies used were anti-lamin A/C (1/1000, sc-6215, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA), anti-progerin (1/1,000, sc-81611, Santa Cruz Biotechnology), anti-LC3B (1/1,000, sc-271625, Santa Cruz Biotechnology), anti-CDK2 (1/800, ab32147, Abcam, anti-GADPH (1/40,000, MAB374, Merck Millipore) and anti-actin (1/20,000, MAB1501R, Merck Millipore) and revealed with 1/10,000 IR-Dye 700-conjugated secondary donkey anti-rabbit or anti-mouse, IR-Dye 800-conjugated secondary anti-rabbit or anti-mouse antibodies (LI-COR Biosciences Lincoln, NE, USA). For IR-Dye 800 and IR-Dye 700 detection, an Odyssey Infrared Imaging System (LI-COR Biosciences) was used. GAPDH or β -actin was used as a total cellular protein loading control.

4.13 Statistical analysis

Statistical analysis was performed by GraphPad Prism 5.04 (GraphPad Software, Inc. San Diego, CA, USA). *P*-value ≤ 0.05 was considered significant (**p*<0.05, ***p*<0.01 and ****p*<0.001).

Acknowledgments: The authors are grateful to Pierre Cau, Andrée Robaglia-Schlupp, Karim Harhour and Annachiara De Sandre-Giovanoli for critical discussions. We thank Carole Kretz-Rémy for providing ptfLC3 plasmid, Maxime Mondolini, Jennifer Enrich-Bengoa, Aurore Merle and Danielle Depetris for technical help. We thank Karine Bertaux and Cécile Mouradian (TAC Biological Resource Center) for dermal fibroblasts culture and storage.

Author contributions: DF, VD, JR, SP, CB and KM performed the experiments. DF, VD, EN, JR and KM analyzed the data. PR and NL were responsible for designing and supervising the project. DF, VD, EK and PR conceived and designed the experiments. DF, EK, JR, FM, AB and PR wrote the manuscript.

Funding: This work was supported by grants from Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Aix-Marseille University, and the Association Française contre les Myopathies (TRIM-RD 2016-2020 to NL).

Conflict of interest: authors have no conflict of interest to declare

Data Availability Statement: The data that support the findings of this study are reported in the supplementary figures. The data regarding the miRNome assay is reported in **Table S1** and are openly available in [repository “figshare”] at <https://doi.org/10.6084/m9.figshare.9642803.v1>. Methods to interpret the data are detailed in the Method section of this manuscript.

References

- Benetatos, L., Hatzimichael, E., Londin, E., Vartholomatos, G., Loher, P., Rigoutsos, I., & Briasoulis, E. (2013). The microRNAs within the DLK1-DIO3 genomic region: Involvement in disease pathogenesis. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 70(5), 795–814. <https://doi.org/10.1007/s00018-012-1080-8>
- Benson, E. K., Lee, S. W., & Aaronson, S. A. (2010). Role of progerin-induced telomere dysfunction in HGPS premature cellular senescence. *J Cell Sci*, 123(15), 2605–2612. <https://doi.org/10.1242/jcs.067306>
- Cao, K., Graziotto, J. J., Blair, C. D., Mazzulli, J. R., Erdos, M. R., Krainc, D., & Collins, F. S. (2011). Rapamycin reverses cellular phenotypes and enhances mutant protein clearance in Hutchinson-Gilford progeria syndrome cells. *Science Translational Medicine*, 3(89), 89ra58. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3002346>
- Caravia, X. M., & López-Otín, C. (2015). Regulatory Roles of miRNAs in Aging. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 887, 213–230. https://doi.org/10.1007/978-3-319-22380-3_11
- Casper, J., Zweig, A. S., Villarreal, C., Tyner, C., Speir, M. L., Rosenbloom, K. R., ... Kent, W. J. (2018). The UCSC Genome Browser database: 2018 update. *Nucleic Acids Research*, 46(D1), D762–D769. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1020>
- Cau, P., Navarro, C., Harhour, K., Roll, P., Sigaudy, S., Kaspi, E., ... Lévy, N. (2014). Nuclear matrix, nuclear envelope and premature aging syndromes in a translational research perspective. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 29(Supplement C), 125–147. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2014.03.021>
- Cenni, V., Capanni, C., Columbaro, M., Ortolani, M., D'Apice, M. R., Novelli, G., ... Lattanzi, G. (2011). Autophagic degradation of farnesylated prelamin A as a therapeutic approach to lamin-linked progeria. *European Journal of Histochemistry: EJH*, 55(4), e36.
- De Sandre-Giovannoli, A., Bernard, R., Cau, P., Navarro, C., Amiel, J., Boccaccio, I., ... Lévy, N. (2003). Lamin a truncation in Hutchinson-Gilford progeria. *Science (New York, N.Y.)*, 300(5628), 2055. <https://doi.org/10.1126/science.1084125>
- DuBose, A. J., Lichtenstein, S. T., Petrash, N. M., Erdos, M. R., Gordon, L. B., & Collins, F. S. (2018). Everolimus rescues multiple cellular defects in laminopathy-patient fibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. <https://doi.org/10.1073/pnas.1802811115>
- Eriksson, M., Brown, W. T., Gordon, L. B., Glynn, M. W., Singer, J., Scott, L., ... Collins, F. S. (2003). Recurrent de novo point mutations in lamin A cause Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Nature*, 423(6937), 293–298. <https://doi.org/10.1038/nature01629>
- Frankel, D., Delecourt, V., Harhour, K., De Sandre-Giovannoli, A., Lévy, N., Kaspi, E., & Roll, P. (2018). MicroRNAs in hereditary and sporadic premature aging syndromes and other laminopathies. *Aging Cell*, e12766. <https://doi.org/10.1111/acer.12766>
- Gabriel, D., Gordon, L. B., & Djabali, K. (2016). Temsirolimus Partially Rescues the Hutchinson-Gilford Progeria Cellular Phenotype. *PloS One*, 11(12), e0168988. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0168988>

- Gordon, L. B., Massaro, J., D'Agostino, R. B., Campbell, S. E., Brazier, J., Brown, W. T., ... Progeria Clinical Trials Collaborative. (2014). Impact of farnesylation inhibitors on survival in Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Circulation*, 130(1), 27–34. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.113.008285>
- Guelen, L., Pagie, L., Brasset, E., Meuleman, W., Faza, M. B., Talhout, W., ... van Steensel, B. (2008). Domain organization of human chromosomes revealed by mapping of nuclear lamina interactions. *Nature*, 453(7197), 948–951. <https://doi.org/10.1038/nature06947>
- Harhour, K., Frankel, D., Bartoli, C., Roll, P., De Sandre-Giovannoli, A., & Lévy, N. (2018). An overview of treatment strategies for Hutchinson-Gilford Progeria syndrome. *Nucleus (Austin, Tex.)*, 9(1), 246–257. <https://doi.org/10.1080/19491034.2018.1460045>
- Harhour, K., Navarro, C., Baquerre, C., Da Silva, N., Bartoli, C., Casey, F., ... De Sandre-Giovannoli, A. (2016). Antisense-Based Progerin Downregulation in HGPS-Like Patients' Cells. *Cells*, 5(3). <https://doi.org/10.3390/cells5030031>
- Harhour, K., Navarro, C., Depetris, D., Mattei, M.-G., Nissan, X., Cau, P., ... Lévy, N. (2017). MG132-induced progerin clearance is mediated by autophagy activation and splicing regulation. *EMBO Molecular Medicine*. <https://doi.org/10.15252/emmm.201607315>
- Jung, H.-J., Coffinier, C., Choe, Y., Beigneux, A. P., Davies, B. S. J., Yang, S. H., ... Fong, L. G. (2012). Regulation of prelamin A but not lamin C by miR-9, a brain-specific microRNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(7), E423-431. <https://doi.org/10.1073/pnas.1111780109>
- Kim, V. N., & Nam, J.-W. (2006). Genomics of microRNA. *Trends in Genetics: TIG*, 22(3), 165–173. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2006.01.003>
- Kimura, S., Noda, T., & Yoshimori, T. (2007). Dissection of the autophagosome maturation process by a novel reporter protein, tandem fluorescent-tagged LC3. *Autophagy*, 3(5), 452–460.
- Korkmaz, G., le Sage, C., Tekirdag, K. A., Agami, R., & Gozuacik, D. (2012). miR-376b controls starvation and mTOR inhibition-related autophagy by targeting ATG4C and BECN1. *Autophagy*, 8(2), 165–176. <https://doi.org/10.4161/auto.8.2.18351>
- Korkmaz, G., Tekirdag, K. A., Ozturk, D. G., Kosar, A., Sezer, O. U., & Gozuacik, D. (2013). MIR376A is a regulator of starvation-induced autophagy. *PloS One*, 8(12), e82556. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0082556>
- Ludlow, A. T., Robin, J. D., Sayed, M., Litterst, C. M., Shelton, D. N., Shay, J. W., & Wright, W. E. (2014). Quantitative telomerase enzyme activity determination using droplet digital PCR with single cell resolution. *Nucleic Acids Research*, 42(13), e104. <https://doi.org/10.1093/nar/gku439>
- Mariño, G., Ugalde, A. P., Fernández, A. F., Osorio, F. G., Fueyo, A., Freije, J. M. P., & López-Otín, C. (2010). Insulin-like growth factor 1 treatment extends longevity in a mouse model of human premature aging by restoring somatotroph axis function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(37), 16268–16273. <https://doi.org/10.1073/pnas.1002696107>
- Martinho, R. G., Lindsay, H. D., Flaggs, G., DeMaggio, A. J., Hoekstra, M. F., Carr, A. M., & Bentley, N. J. (1998). Analysis of Rad3 and Chk1 protein kinases defines different checkpoint responses. *The EMBO Journal*, 17(24), 7239–7249. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.24.7239>

- McCord, R. P., Nazario-Toole, A., Zhang, H., Chines, P. S., Zhan, Y., Erdos, M. R., ... Cao, K. (2013). Correlated alterations in genome organization, histone methylation, and DNA-lamin A/C interactions in Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Genome Research*, 23(2), 260–269. <https://doi.org/10.1101/gr.138032.112>
- Merkerova, M. D., Remesova, H., Krejcik, Z., Loudova, N., Hrustincova, A., Szikszai, K., ... Belickova, M. (2018). Relationship between Altered miRNA Expression and DNA Methylation of the DLK1-DIO3 Region in Azacitidine-Treated Patients with Myelodysplastic Syndromes and Acute Myeloid Leukemia with Myelodysplasia-Related Changes. *Cells*, 7(9). <https://doi.org/10.3390/cells7090138>
- Mestdagh, P., Van Vlierberghe, P., De Weer, A., Muth, D., Westermann, F., Speleman, F., & Vandesompele, J. (2009). A novel and universal method for microRNA RT-qPCR data normalization. *Genome Biology*, 10(6), R64. <https://doi.org/10.1186/gb-2009-10-6-r64>
- Nissan, X., Blondel, S., Navarro, C., Maury, Y., Denis, C., Girard, M., ... Peschanski, M. (2012). Unique Preservation of Neural Cells in Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome Is Due to the Expression of the Neural-Specific miR-9 MicroRNA. *Cell Reports*, 2(1), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2012.05.015>
- Oldenburg, A., Briand, N., Sørensen, A. L., Cahyani, I., Shah, A., Moskaug, J. Ø., & Collas, P. (2017). A lipodystrophy-causing lamin A mutant alters conformation and epigenetic regulation of the anti-adipogenic MIR335 locus. *The Journal of Cell Biology*, 216(9), 2731–2743. <https://doi.org/10.1083/jcb.201701043>
- Osorio, F. G., Navarro, C. L., Cadiñanos, J., López-Mejía, I. C., Quirós, P. M., Bartoli, C., ... López-Otín, C. (2011). Splicing-directed therapy in a new mouse model of human accelerated aging. *Science Translational Medicine*, 3(106), 106ra107. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3002847>
- Rao, S. S. P., Huntley, M. H., Durand, N. C., Stamenova, E. K., Bochkov, I. D., Robinson, J. T., ... Aiden, E. L. (2014). A 3D map of the human genome at kilobase resolution reveals principles of chromatin looping. *Cell*, 159(7), 1665–1680. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.11.021>
- Robin, J. D., Ludlow, A. T., Batten, K., Magdinier, F., Stadler, G., Wagner, K. R., ... Wright, W. E. (2014). Telomere position effect: Regulation of gene expression with progressive telomere shortening over long distances. *Genes & Development*, 28(22), 2464–2476. <https://doi.org/10.1101/gad.251041.114>
- Robin, J. D., & Magdinier, F. (2016). Physiological and Pathological Aging Affects Chromatin Dynamics, Structure and Function at the Nuclear Edge. *Frontiers in Genetics*, 7, 153. <https://doi.org/10.3389/fgene.2016.00153>
- Sheng, J., Luo, W., Yu, F., Gao, N., & Hu, B. (2013). MicroRNA-376a sensitizes cells following DNA damage by downregulating MEPE expression. *Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals*, 28(7), 523–529. <https://doi.org/10.1089/cbr.2012.1446>
- Shumaker, D. K., Dechat, T., Kohlmaier, A., Adam, S. A., Bozovsky, M. R., Erdos, M. R., ... Goldman, R. D. (2006). Mutant nuclear lamin A leads to progressive alterations of epigenetic control in premature aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(23), 8703–8708. <https://doi.org/10.1073/pnas.0602569103>
- Ugalde, A. P., Ramsay, A. J., de la Rosa, J., Varela, I., Mariño, G., Cadiñanos, J., ... López-Otín, C. (2011). Aging and chronic DNA damage response activate a regulatory pathway involving miR-29 and p53. *The EMBO Journal*, 30(11), 2219–2232. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.124>

- Wang, F., Yu, J., Yang, G.-H., Wang, X.-S., & Zhang, J.-W. (2011). Regulation of erythroid differentiation by miR-376a and its targets. *Cell Research*, 21(8), 1196–1209. <https://doi.org/10.1038/cr.2011.79>
- Williams, J., Smith, F., Kumar, S., Vijayan, M., & Reddy, P. H. (2017). Are microRNAs true sensors of ageing and cellular senescence? *Ageing Research Reviews*, 35, 350–363. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2016.11.008>
- Xie, J., Ameres, S. L., Friedline, R., Hung, J.-H., Zhang, Y., Xie, Q., ... Gao, G. (2012). Long-term, efficient inhibition of microRNA function in mice using rAAV vectors. *Nature Methods*, 9(4), 403–409. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1903>
- Xiong, X., Jung, H. J., Gombar, S., Park, J. Y., Zhang, C., Zheng, H., ... Suh, Y. (2015). MicroRNA transcriptome analysis identifies miR-365 as a novel negative regulator of cell proliferation in *Zmpste24*-deficient mouse embryonic fibroblasts. *Mutation Research*, 777, 69–78. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2015.04.010>
- Yang, S., Abdulla, R., Lu, C., & Zhang, L. (2018). Inhibition of microRNA-376b Protects Against Renal Interstitial Fibrosis via Inducing Macrophage Autophagy by Upregulating *Atg5* in Mice with Chronic Kidney Disease. *Kidney & Blood Pressure Research*, 43(6), 1749–1764. <https://doi.org/10.1159/000495394>
- Yao, S., Liu, Y., Yao, Z., Zhao, Y., Wang, H., Xu, Y., ... Yang, S. (2018). MicroRNA-376a regulates cell proliferation and apoptosis by targeting forkhead box protein P2 in lymphoma. *Oncology Letters*, 16(3), 3169–3176. <https://doi.org/10.3892/ol.2018.9012>
- Yentrapalli, R., Azimzadeh, O., Kraemer, A., Malinowsky, K., Sarioglu, H., Becker, K.-F., ... Tapio, S. (2015). Quantitative and integrated proteome and microRNA analysis of endothelial replicative senescence. *Journal of Proteomics*, 126, 12–23. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2015.05.023>
- Zhang, C.-L., Liu, X., He, Q.-J., Zheng, H., Xu, S., Xiong, X.-D., ... Deng, S. (2017). miR-342-5p promotes *Zmpste24*-deficient mouse embryonic fibroblasts proliferation by suppressing *GAS2*. *Molecular Medicine Reports*. Retrieved from <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/mmr.2017.7731/abstract>

II . B) Résultats complémentaires de l'article

B . 1) Le miR-376a-3p et le miR-376b-3p altèrent l'expression de protéines intervenant dans la régulation du cycle cellulaire

1 . a) Objectifs de l'expérience

Le miR-376a-3p a été décrit dans la littérature comme ciblant directement le transcrit de la protéine **CDK2**, régulatrice du cycle cellulaire, dans des cellules progénitrices érythroïdes (Wang et al., 2011; Zheng et al., 2012). Nous avons voulu vérifier, dans un contexte de surexpression, les propriétés inhibitrices du miR-376a-3p et du miR-376b-3p sur cette cible dans des fibroblastes dermiques témoins.

Par ailleurs, afin d'apporter des résultats complémentaires à l'étude du cycle cellulaire par cytométrie en flux, nous avons étudié l'expression d'autres protéines impliquées dans la régulation du cycle cellulaire, après surexpression des 2 miRNAs d'intérêt : **Cycline D1** et **p21**.

1 . b) Matériels et méthodes

J'ai transfecté des fibroblastes du témoin AG08498 avec le miR-376a-3p et le miR-376b-3p (50 nM) de manière isolée et réalisé un Western-Blot à partir des protéines cellulaires totales extraites à 96h post-transfection. Les anticorps primaires utilisés sont : anticorps monoclonal anti-p21 (Abcam) (dilution : 1/5000 ; espèce : lapin) ; anticorps purifié anti-CDK2 (Abcam) (dilution : 1/1000; espèce : lapin) ; anticorps monoclonal anti-Cycline D1 (ThermoFisher) (dilution : 1/2000 ; espèce : lapin) et anticorps primaire anti-actine (Millipore) (dilution : 1/10000 ; espèce : mouse). Les anticorps secondaires (Li-Cor) utilisés sont : IRDye® 800CW Donkey Anti-Rabbit IgG (dilution : 1/15000) et IRDye® 680RD Donkey Anti-Mouse IgG » (dilution : 1/15000).

1 . c) Résultats et discussion

La transfection du miR-376a-3p ou du miR-376b-3p induit à 96h post-transfection une **diminution significative de l'expression de CDK2 pour les 2 conditions** ($p=0,0284$), une **diminution significative de p21 pour le miR-376a-3p** ($p=0,0284$) et une tendance à la **diminution de la Cycline D1 pour les 2 conditions testées** ($p=0,3065$) (Figure 57 et 58).

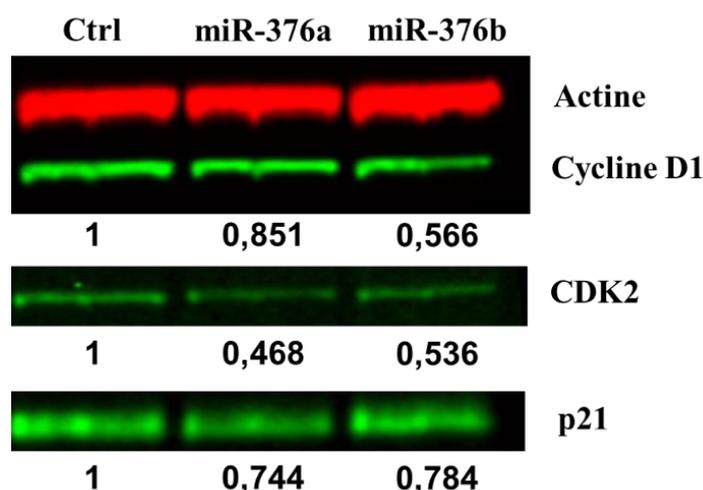


Figure 57 : Analyse par Western-Blot de l'expression de Cycline D1, CDK2 et p21 dans les fibroblastes du témoin AG08498 P20 à 96h post-transfection. Le ratio indiqué protéine d'intérêt / actine a été normalisé par rapport à la condition Contrôle (Ctrl). Illustration par un blot représentatif des résultats obtenus (n=4)

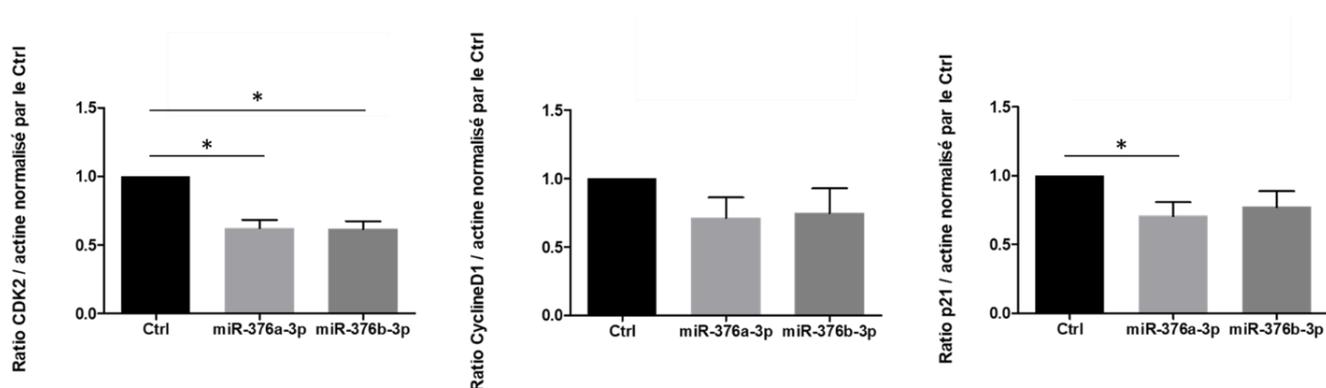


Figure 58 : Représentation de l'expression de CDK2, Cycline D1 et p21 dans les fibroblastes du témoin AG08498 à 96h post-transfection (P18-P27-P20-P21) (n=4).

La surexpression de chacun des 2 miRNAs d'intérêt induit une **diminution de protéines régulatrices du cycle cellulaire**.

Nous confirmons ici dans notre modèle cellulaire d'intérêt, les fibroblastes dermiques, le rôle inhibiteur du miR-376a-3p sur l'expression de **CDK2**, précédemment décrit dans des cellules progénitrices érythroïdes (Wang et al., 2011; Zheng et al., 2012). Nous montrons par ailleurs, une régulation négative comparable pour le miR-376b-3p, non décrite à ce jour. Cette capacité inhibitrice était prévisible en raison de la similitude de séquences entre les miR-376a-3p et -376b-3p qui partage 18 nucléotides en commun dont une séquence *seed* identique, essentielle dans la reconnaissance de l'ARNm cible (Cf Figure 3 de l'article). Un test à l'aide d'un gène rapporteur de type luciférase pourrait être réalisé afin de confirmer que le transcrite de CDK2 est bien une cible directe du miR-376b-3p.

La diminution de **p21** observée dans notre expérience peut surprendre dans la mesure où les cellules sénescents sont habituellement caractérisées par une élévation de p21 en lien avec l'activation de p53. Cependant, dans les fibroblastes HGPS, l'expression de CDK2 serait inhibée directement par les miR-376a-3p et -376b-3p, en aval et de manière indépendante de p21, décrite comme régulant l'activité du complexe CDK2/Cycline E. La diminution d'expression de p21 observée dans notre contexte pourrait alors être le résultat d'un rétrocontrôle négatif induit par la faible expression de CDK2. Des tests complémentaires sont nécessaires pour pouvoir répondre à cette interrogation en décortiquant ce mécanisme de régulation (expression protéique de p53, expression du transcrit de p53 et de p21...).

B . 2) Le miR-376a-3p induit une diminution du transcrit de CDK2

2 . a) Objectif de l'expérience

En complément de l'étude de l'expression de CDK2 en Western-Blot, je me suis intéressée à la cinétique d'expression de son transcrit. Je voulais ainsi mettre en parallèle la modification de l'expression protéique avec celle de son ARNm après transfection des miRNAs d'intérêt.

2 . b) Matériels et méthodes

J'ai transfecté chacun des 2 miRNAs (50 nM) de manière isolée dans des fibroblastes du témoin AG08498 P18. J'ai réalisé des culots cellulaires à 12h, 24h et 48h post-transfection, puis j'ai effectué une extraction d'ARN suivie d'une RT-qPCR ciblée pour quantifier le transcrit de CDK2. Le Fold Change (FC) représenté ci-dessous (Figure 59) permet de comparer l'expression du transcrit pour chaque miRNA par rapport à la condition où les fibroblastes sont transfectés avec un miRNA contrôle.

2 . c) Résultats et discussion

L'expression du transcrit de CDK2 est **diminuée d'environ 20% à partir de 24h post-transfection du miR-376a-3p**. Ce résultat n'est pas retrouvé pour le miR-376b-3p (Figure 59).

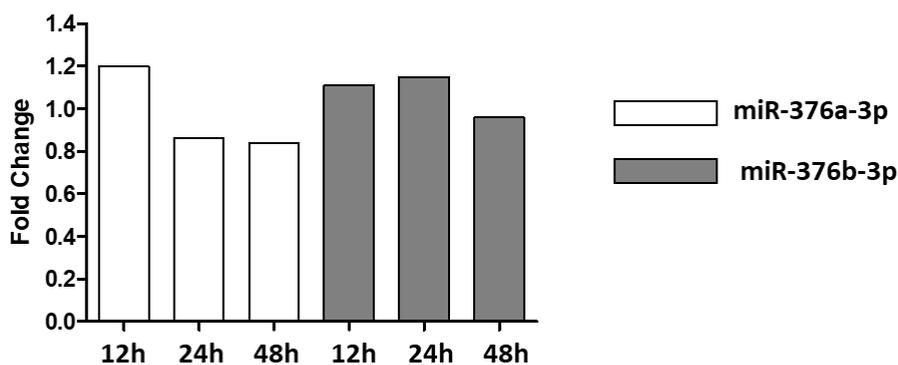


Figure 59 : Représentation de l'expression du transcrite de CDK2 à 12h, 24h et 48h post-transfection comparativement à la condition contrôle (exprimée en FC) (n=1)

Ces résultats préliminaires (n=1) doivent être confirmés sur des expériences répétées. L'effet observé pour le miR-376a-3p va dans le sens d'une dégradation du transcrite de CDK2, même si celle-ci reste modeste. L'absence d'effet pour miR-376b-3p ne permet pas d'exclure un rôle inhibiteur de ce miRNA sur CDK2 dans la mesure où, chez l'Homme, l'action des miRNAs passe dans la majorité des cas par une inhibition de la traduction du transcrite et dans une très faible proportion par la dégradation de l'ARNm cible (Cf Introduction).

B . 3) Impact des antimiRs après une surexpression des miRNAs d'intérêts

Après avoir étudié l'impact du miR-376a-3p et du miR-376b-3p sur la prolifération, le cycle cellulaire et la sénescence dans des fibroblastes de témoins, je me suis intéressée à l'impact de leur inhibition par des antimiRs.

3 . a) Objectif de l'expérience

Nous avons montré que la surexpression du miR-376a-3p et du miR-376b-3p induisait une modulation du cycle cellulaire avec une accumulation significative des cellules en phase G0-G1, une diminution significative de la prolifération et de la réplication et une augmentation significative de la sénescence de fibroblastes dermiques témoins. La surexpression de ces 2 miRNAs étant retrouvée dans les fibroblastes de patients HGPS, il était alors intéressant d'étudier l'impact de leur inhibition sur le cycle cellulaire, la prolifération et l'entrée en sénescence. Dans ce cadre, l'idéal aurait été de réaliser ces expériences dans les fibroblastes de patients. Cependant, nous nous sommes heurtés à des problèmes techniques essentiellement dus à une fenêtre d'étude trop courte entre l'apparition de la surexpression des 2 miRNAs et l'entrée en sénescence de ces cellules. En attendant de résoudre ce challenge technique, nous avons

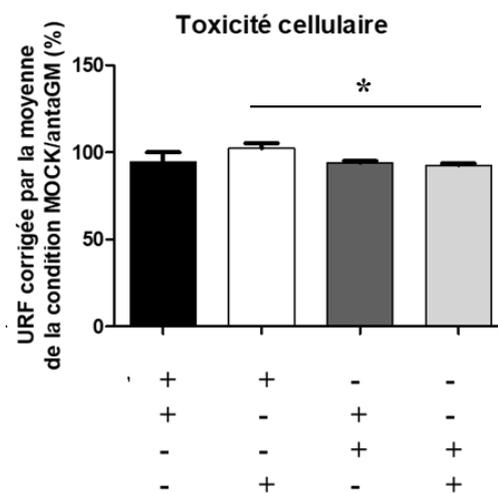
utilisé un modèle passant par la surexpression transitoire induite de ces miRNAs dans des fibroblastes témoins.

3 . b) Matériels et méthodes

Dans cette expérience, j'ai induit une surexpression de chacun de ces 2 miRNAs (25 nM) dans des fibroblastes du témoin AG08498 (P12-P14-P20), puis j'ai transfecté 24h après, ces mêmes cellules avec les antimiRs spécifiques (25 nM) correspondants. Les résultats obtenus pour le miR-376b-3p ne seront pas montrés dans ce manuscrit.

3 . c) Résultats et discussion

Les 2 transfections successives (miRNA, puis antimiR) n'induisent **pas significativement de toxicité cellulaire.**



La condition « miR-376a-3p + antimiR-ctrl » induit une diminution significative de la prolifération et de la réplication comparativement à la condition « miR-ctrl + antimiR-ctrl » (Figure 59 A et B). Ces résultats confirment l'effet inhibiteur du miR-376a-3p à 25 nM sur la prolifération et la réplication, et ce, en condition de double transfection avec un antimiR-ctrl.

La condition « miR-376a-3p + antimiR-376a-3p » induit une augmentation significative de la prolifération et de la réplication comparativement à la condition « miR-376a-3p + antimiR-ctrl » (Figure 60 A et B).

Si on compare la condition « miR-376a-3p + antimiR-376a-3p » à celle du « miR-ctrl + antimiR-ctrl », nous pouvons observer qu'il y a une perte complète de l'effet du mimic en présence de l' antimiR spécifique en ce qui concerne la prolifération, mais que l'effet du mimic

n'est pas complètement inhibé en ce qui concerne la réplication de l'ADN (diminution significative par rapport à la condition « miR-ctrl + antimiR-ctrl »).

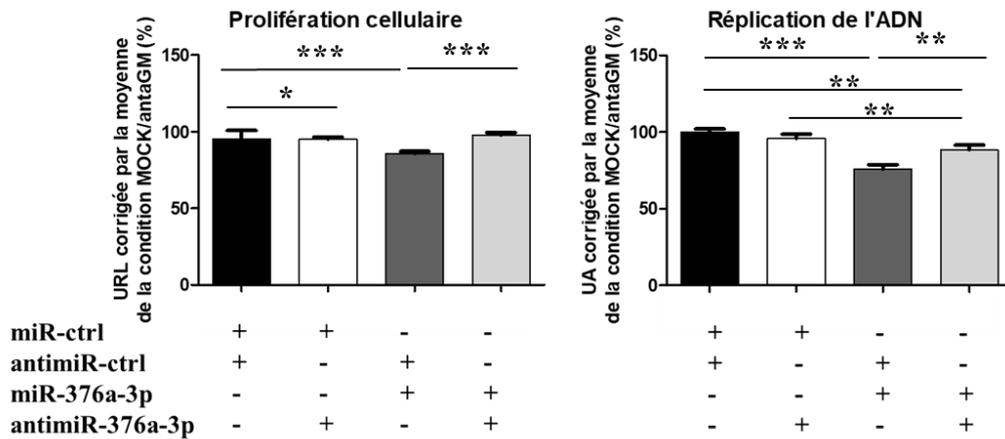


Figure 60 : Transfection du miR-contrôle (miR-ctrl), du miR-376a-3p et de leur antimiR : représentations graphiques de la prolifération cellulaire (A), de la réplication de l'ADN (B) dans les fibroblastes AG08498. Le miR-ctrl et le miR-376a-3p (25 nM) ont été transfectés à J0. L'antimiR-contrôle (antimiR-ctrl) et l'antimiR-376a-3p ont été transfectés (25 nM) à J1. Les tests fonctionnels ont été réalisés à J4 (n=3).

L'ensemble de ces résultats montrent de manière significative que la transfection de l'antimiR-376a-3p à 25 nM 24h après la surexpression du miR-376a-3p à 25 nM est suffisamment efficace pour inhiber et surpasser les effets induits par ce miRNA sur la prolifération cellulaire et sur la réplication de l'ADN.

B . 4) Étude *ex vivo* de la sénescence de cellules hépatiques et rénales de souris HGPS

4 . a) Objectif de l'expérience

Comme nous l'avons vu dans l'article, nous avons montré une surexpression du miR-376a-3p et augmentation (non significative) du miR-376b-3p dans le foie de souris HGPS *Lmna*^{G609G/G609G}. De plus, *in vitro*, la surexpression de ces 2 miRNAs dans des fibroblastes de témoins induit une augmentation du nombre de cellules sénescents. Nous avons donc décidé de réaliser le test de β -galactosidase acide sur des coupes de foie de souris HGPS présentant une surexpression des 2 miRNAs. Nous avons également choisi d'étudier la sénescence des cellules du rein des souris HGPS, bien qu'il ne présente pas cette surexpression des 2 miRNAs (augmentation mais non significative), la sénescence de ce tissu a déjà été décrite dans la littérature (de même que le foie) chez les souris HGPS *Lmna*^{G609G/G609G} (Osorio et al., 2011a).

4 . b) Matériels et méthodes

À l'aide du Cryostat, nous avons réalisé des coupes de foie et de rate d'une souris $Lmna^{+/+}$ (WT) et d'une souris $Lmna^{G609G/G609G}$ (HGPS) toutes deux âgées de 4 mois. Puis, j'ai réalisé le test de β -galactosidase acide et observé les cellules à l'aide d'un microscope en contraste interférentiel de Nomarski.

4 . c) Résultats et discussion

Nous observons, dans les le rein et le foie, une augmentation du nombre de cellules sénescents chez les souris HGPS par rapport aux souris WT (Figure 61).

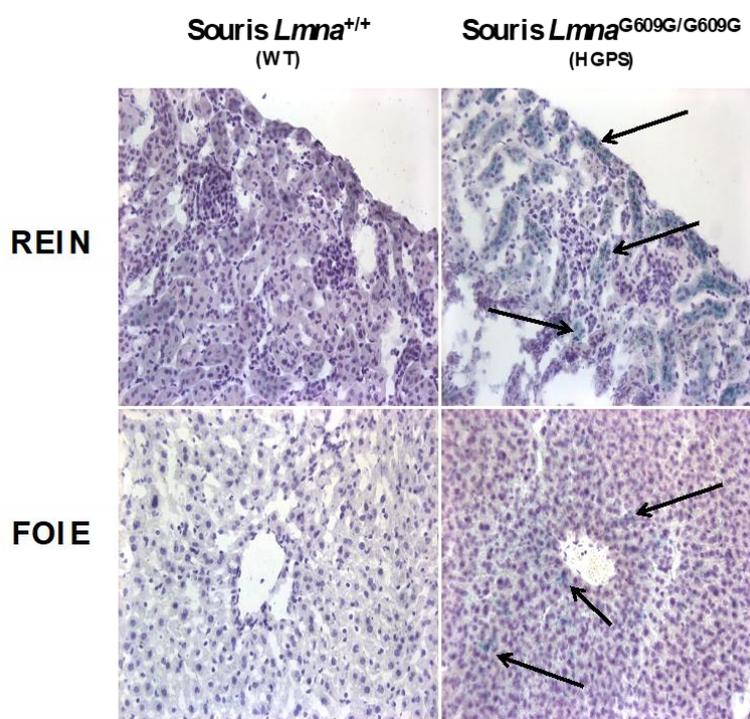


Figure 61 : Test de β -galactosidase acide sur les coupes de rein et de foie d'une souris WT vs une souris HGPS (objectif x20). Les flèches noires indiquent des cellules positives à la β -galactosidase acide.

Nos résultats *in vivo* sont en accord avec ceux de Osorio *et al.* qui décrivent une augmentation de la sénescence dans le rein et le foie de souris homozygotes $Lmna^{G609G/G609G}$, mise en évidence par le test de la β -galactosidase (Osorio *et al.*, 2011a). Dans le foie des souris homozygotes $Lmna^{G609G/G609G}$, la surexpression des miR-376a-3p et le miR-376b-3p est donc associée à une sénescence cellulaire accrue.

B . 5) Discussion et perspectives

L'hypothèse initiale de ce travail était que la dérégulation de miRNAs dans la Progeria pouvait avoir un rôle dans les altérations cellulaires observées au cours de la maladie et sa physiopathologie. Une analyse du miRNome à partir de fibroblastes dermiques de patient qui représentent un modèle cellulaire de choix dans cette maladie en raison de la forte expression de la progérine et des anomalies cellulaires induites dans ce type cellulaire. Cette étude nous a permis d'identifier des miRNAs dérégulés dont certains, surexprimés, pourraient réguler négativement le cycle cellulaire, selon les données de la littérature. Ces miRNAs pourraient ainsi avoir un rôle clé dans la physiopathologie de la maladie en inhibant la prolifération cellulaire et en induisant une entrée prématurée des cellules en sénescence. Les tests fonctionnels de « CellTiter » et de « BrdU », techniques indépendantes permettant d'étudier la prolifération cellulaire, ont mis en évidence l'effet inhibiteur du miR-376a-3p et du miR-376b-3p sans effet toxique de ces miRNAs. La **modulation négative du miR-376a-3p sur la prolifération** a déjà été décrite dans la littérature dans des cellules cancéreuses humaines hépatiques et sanguines (Wang et al., 2011; Zheng et al., 2012).

De plus, nous avons mis en évidence un **effet inhibiteur sur le cycle cellulaire du miR-376a-3p** qui induit une modification de la répartition des cellules dans les différentes phases du cycle. La diminution significative de l'incorporation du BrdU dans l'ADN néo-synthétisé que nous montrons, reflète une altération de la phase S. Les expériences de cytométrie en flux permettent d'observer de manière plus globale cette altération des phases du cycle : le miR-376a-3p induit une accumulation des cellules en phase G₀/G₁ accompagnée d'une diminution du nombre de cellules en phase G₂/M. L'accumulation en G₁ après transfection du miR-376a-3p a déjà été décrite par Wang *et al.* dans des cellules cancéreuses hématopoïétiques humaines en cytométrie en flux (Wang et al., 2011).

En ce qui concerne **le miR-376b-3p**, nous montrons dans nos expériences que, comme le miR-376a-3p, il semble avoir un effet sur la prolifération des cellules ainsi que sur leur progression dans le cycle cellulaire. Ces modulations négatives pourraient être à l'origine de l'augmentation du nombre de cellules sénescents observée au cours de nos expériences. Ce miRNA a déjà été décrit dans des cellules cancéreuses hépatiques humaines comme exerçant une action inhibitrice sur la prolifération cellulaire (Cartier et al., 2017). Dans ce même article, il est montré que ce miRNA induit, tout comme le miR-376a-3p, une augmentation du pourcentage de cellules en phase G₀/G₁ associé à un effet minime sur la phase G₂/M. Ces résultats sont en accord avec ce que nous montrons dans notre étude.

Dans des cellules cancéreuses humaines mammaires et hépatiques, les miR-376a-3p et -376b-3p apparaissent dans la littérature comme ayant un rôle de régulateur négatif de l'expression des protéines ATG4C et BECN1 qui sont impliquées dans l'**autophagie** (Korkmaz et al., 2012, 2013). L'autophagie est un des mécanismes impliqués dans le vieillissement cellulaire. Un article traitant de l'augmentation du nombre de vacuoles autophagiques marquées par une activité accrue de la β -galactosidase au sein de fibroblastes sénescents (Gerland et al., 2003) suggère que les 2 miRNAs que nous étudions pourraient également induire une sénescence cellulaire *via* une inhibition de l'autophagie. Ainsi, il est possible que la sénescence révélée par nos tests de β -galactosidase soit liée à une diminution de l'activité autophagique associée à une régulation négative du cycle cellulaire.

Parmi les nombreuses cibles directes du miR-376a-3p, il a été décrit que ce dernier modulait **p85 α** , une protéine intervenant dans la voie de signalisation PI3K et ciblait également directement **CDK2**, une protéine clé régulant le cycle cellulaire (Wang et al., 2011; Zheng et al., 2012). En complément de l'étude de CDK2, nous avons choisi d'explorer également les protéines p21 et Cycline D1. En effet, il a été précisé en introduction que la protéine **p21** était un des facteurs clés dans la **régulation du cycle cellulaire**, ainsi que dans l'**entrée en sénescence**, et que la **Cycline D1** était impliquée dans la **progression du cycle cellulaire en phase G₁**. La transfection de manière isolée du miR-376a-3p et du miR-376b-3p dans les fibroblastes de témoins diminue l'expression de CDK2, de la Cycline D1 et de p21. Ces résultats confirment ceux obtenus par Wang *et al.* dans des cellules humaines leucémiques myéloïdes où la transfection du pré-miR-376a induit une diminution de CDK2 associée à un arrêt du cycle cellulaire en G₁/S (Wang et al., 2011). Nous pensons que la surexpression du miR-376a-3p, associée à celle du miR-376b-3p, pourrait participer au blocage la progression du cycle cellulaire en G₁/S *via* une inhibition de l'expression de CDK2. Nous avons vu en introduction que les complexes Cycline E,A/CDK2 étaient modulés de manière négative par **p21**. La **Cycline D1** sous forme complexée avec les CDKs partenaires (CDK4,6) est surexprimée dans de nombreux cancers et l'inhibition de ces CDKs bloque la progression du cycle cellulaire contrôlée par la Cycline D1 (Qie and Diehl, 2016). Ainsi, dans un contexte de sénescence induite par des miRNAs, il est possible que l'expression de la Cycline D1 évolue vers une diminution, expliquant un arrêt de la progression du cycle cellulaire au-delà de la phase G₁.

Les antimiRs constituent une classe de molécules de plus en plus utilisée notamment pour étudier le rôle fonctionnel des miRNAs. Wang *et al.* montrent que la transfection de l'antimiR-376a induit une augmentation de l'expression de CDK2, ainsi que de son transcrit

(Wang et al., 2011). Il serait intéressant d'étudier l'expression de cette protéine et de son ARNm après transfection de l'antimiR-376a et -376b dans des fibroblastes témoins surexprimant le miR-376a-3p et le miR-376b-3p. Par ailleurs, comme expliqué plus haut, nous n'avons pas réussi pour le moment à étudier les effets de l'inhibition des miR-376a-3p et le miR-376b-3p directement dans les cellules de patients. Les contraintes techniques sont en effet trop importantes en raison de l'apparition précoce et rapide de la sénescence dans les cellules qui surexpriment ces miRNAs. Afin de s'affranchir de cette difficulté technique, nous envisageons d'induire une expression stable des 2 antimiRs avant l'apparition de la surexpression (en lien avec les modifications épigénétiques du cluster 14q32 secondaires à l'accumulation de progérine) pour étudier leur impact sur les mécanismes cellulaires altérés (cycle cellulaire, prolifération et autophagie) et sur la sénescence.

De plus, au vu des résultats de toutes nos expériences *in vitro* et de ceux de la littérature, nous avons voulu étudier le miR-376a-3p et le miR-376b-3p dans des organes prélevés sur des souris WT et des souris *Lmna*^{G609G/G609G}. Dans ce dernier modèle mimant la Progeria, nous observons une surexpression des miR-376a-3p et miR-376b-3p dans le foie des souris *Lmna*^{G609G/G609G}, associée à une sénescence accrue de cet organe. Ces résultats sont concordants avec notre étude *in vitro* qui montre une surexpression de ces miRNAs dans les fibroblastes de la majorité des patients étudiés. Nos résultats *in vivo* sont également en accord avec ceux de Osorio *et al.* qui décrivent une augmentation de la sénescence dans le rein et le foie de souris *Lmna*^{G609G/G609G}, mise en évidence par le test de la β -galactosidase (Osorio et al., 2011a). Dans un autre modèle murin homozygote, *Zmpste24*^{-/-}, des miRNAs appartenant à la famille du miR-29 ont été retrouvés surexprimés dans le foie, ainsi que dans le muscle. L'augmentation de l'expression du miR-29 induit une diminution de la prolifération des cellules, ainsi qu'une augmentation de la sénescence (Ugalde et al., 2011). Il est intéressant de préciser que le miR-29 est également surexprimé au cours du vieillissement physiologique et qu'il stabilise indirectement la protéine p53 (Smith-Vikos and Slack, 2012). Ce même modèle de souris a également permis d'observer une surexpression du miR-1 dans le foie. Ce miRNA cible l'ARNm codant pour IGF-1 qui peut interagir avec des voies de signalisation telles que PI3K et MAPK (Marino et al., 2010). Ces études semblent montrer que le foie présente une dérégulation de nombreux miRNAs, dont les miRs-376a-3p et -376b-3p, en lien avec la sénescence observée. À ce jour, aucun article ne décrit l'état de sénescence du foie de patients atteints de Progeria. L'utilisation de cellules iPS issues de cellules somatiques de patients HGPS, reprogrammées en hépatocytes, pourraient être une solution afin d'étudier plus en avant la sénescence du foie, en lien avec l'expression des miR-376a/b (activité de la β -galactosidase,

p16^{INK4a}). De plus, dans une expérience préliminaire chez une souris de chaque groupe, différents autres organes/tissus ont été explorés (peau, poumon, testicules, muscle, cœur, cerveau) et nous n'avons pas mis en évidence de surexpression des miRs-376a-3p et 376b-3p notamment dans des tissus particulièrement touchés par la maladie, comme par exemple la peau et le cœur. Il est possible que ces miRNAs aient une expression tissu-spécifique. Les patients HGPS souffrent de complications ostéo-articulaires majeures. Il aurait été intéressant d'étudier, chez les souris HGPS, le profil d'expression des miRs-376a-3p et 376b-3p dans le tissu osseux. Dans des cellules cancéreuses osseuses, la restauration de l'expression du miR-376a-3p conduit à une diminution de la croissance tumorale (Herr et al., 2017).

Les miRNAs possèdent une place importante dans la régulation de la prolifération, du cycle cellulaire et de la sénescence, comme le montre par exemple une étude sur des MEFs *Zmpste24*^{-/-} dans laquelle, le miR-342-5p et le miR-365 sont sous-exprimés par rapport à des souris WT. Après la transfection de ces miRNAs dans les MEFs *Zmpste24*^{-/-}, la prolifération des cellules augmente et la sénescence cellulaire diminue pour ces 2 miRNAs. De plus, il est décrit pour le miR-342-5p, une augmentation du nombre de cellule en phase G₂/M (Xiong et al., 2015; Zhang et al., 2017a).

À terme, en fonction des résultats obtenus *in vitro* sur les fibroblastes HGPS ou les cellules dérivées d'IPS HPGS (dont nous disposons dans notre Unité), nous pourrions envisager d'étendre *in vivo* notre étude sur miRs-376a-3p et -376b-3p dans notre modèle murin *Lmna*^{G609G/G609G}, par exemple par l'étude des effets de l'injection de ces antimirs sur le phénotype de ces souris, à l'échelle cellulaire et de l'organisme.

II. C) Rôle des microARNs dans la Progeria de Hutchinson-Gilford et les syndromes apparentés : Analyses en NGS (Next-Generation Sequencing)

Plus récemment, nous avons réalisé une 2nde étude miRNome dans le cadre d'un projet financé par l'AFM, incluant l'étude combinée des ARNm et des lncARNs (longs ARNs non-codants) par NGS (Séquençage Haut Débit) à partir des fibroblastes dermiques, de cellules iPS (Cellules Souches Pluripotentes induites) et dérivées d'iPS (MSCs). Cette étude a pour objectif d'identifier des voies moléculaires communes dérégulées dans la Progeria et les syndromes génétiques apparentés associés ou non à une accumulation de progérine (HGPS-*like* et APS – Cf Introduction) permettant d'envisager à terme de mêmes approches thérapeutiques.

Les culots cellulaires préparés en 2017-2018 ont été envoyés à la société Integragen, qui a réalisé l'extraction des ARNs totaux et leur séquençage. Concernant la préparation des culots cellulaires à partir des fibroblastes de patients, nous avons sélectionné les passages à partir desquels plus de 90% des noyaux des cellules exprimaient de la progérine (Immunofluorescence). Nous avons également réalisé un Western-Blot afin de renforcer les résultats de l'immunofluorescence et de quantifier les niveaux de progérine (Figure 62 A et B). Nous avons choisi d'inclure les fibroblastes de témoins à des passages aussi proches que possible de ceux des fibroblastes de patients.

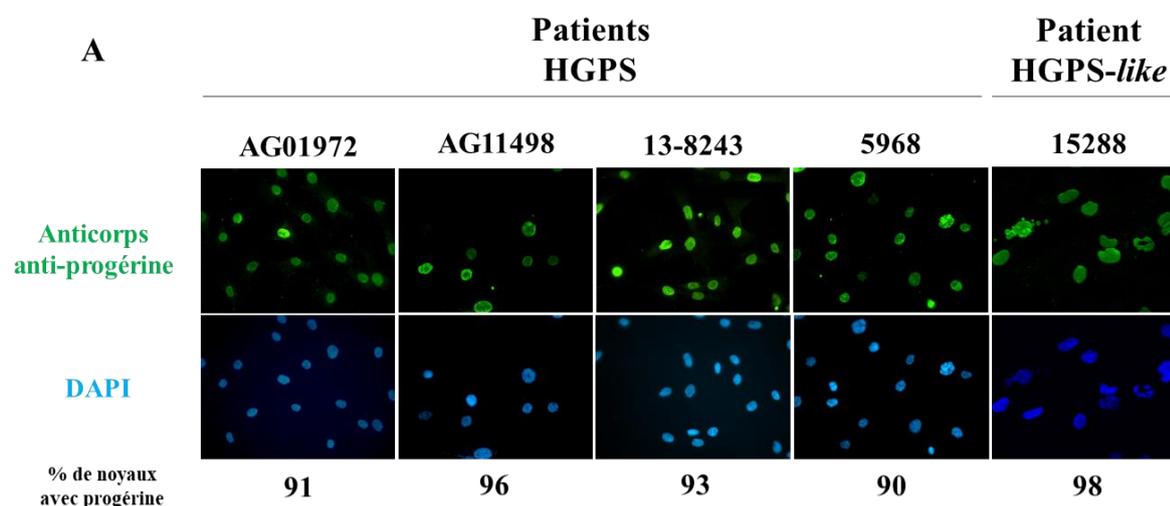


Figure 62 : Expression de la progérine dans les fibroblastes envoyés pour le séquençage en NGS
A) Technique d'Immunofluorescence (Objectif x40) (Marquage à l'aide d'un anticorps anti-progérine spécifique)

B

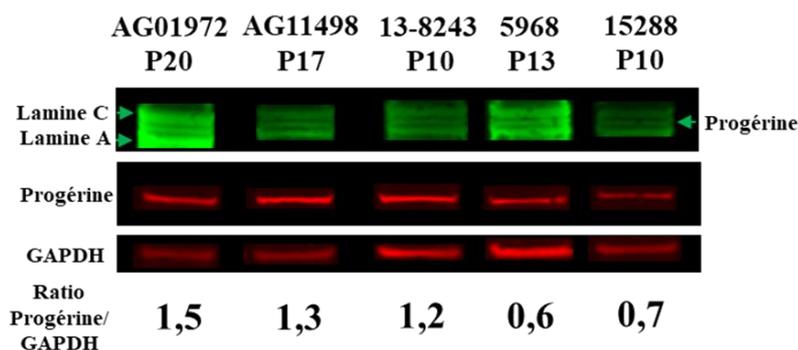


Figure 62 (suite) : Expression de la progérine dans les fibroblastes envoyés pour le séquençage en NGS B) Technique de Western-Blot (Détection à l'aide d'un anticorps anti-lamine A/C et d'un anticorps anti-progérine spécifique)

Les culots cellulaires d'iPSCs et de MSCs ont été préparés au sein de notre unité par la Plateforme de Reprogrammation et Différenciation cellulaire dirigée par le Dr. Frédérique Magdinier. L'ensemble du matériel fourni à la société Integragen est présenté dans le tableau 6. Les résultats de cette étude actuellement disponibles proviennent de l'analyse des données du miRNome et du transcriptome (ARNm) issues du NGS à partir des fibroblastes dermiques de témoins, patients HGPS et HGPS-like. Seuls ces résultats seront présentés dans ce manuscrit. Les autres données sont en cours d'analyse.

	TYPE CELLULAIRE	NOM DE LA LIGNEE	PASSAGE	AGE	FOURNISSEUR	
SYNDROMES HGPS ET APPARENTES	HGPS (p.G608G)	Fibroblastes	AG-11498	P17	14	Coriell
		Fibroblastes	AG01972	P20	14	Coriell
		Fibroblastes	13-5968	P13	5	CRB
		Fibroblastes	13-8243	P10	5	CRB
	iPSC	1972	P120	14	Coriell	
	MSC	1972	P8	14	Coriell	
	HGPS-like (c.1968+1G>A, p.T623S)	Fibroblastes	13-15288	P13	6	CRB
		iPSC	11126	P59	20	CRB
		MSC	11126	P9	20	CRB
	APS (c.1583C>T, p.T528M)	Fibroblastes	13-14042	P14	10	CRB
		iPSC	13-14042	P37	10	CRB
		MSC	13-14042	P8	10	CRB
TEMOINS	Fibroblastes	hFF15	P12	Nouveau-né	Coriell	
		10742	P7	82	CRB	
		AG08498	P17	1	Coriell	
		13090	P13 et P15	7	CRB	
	iPSC	hFF15	P59	Nouveau-né	Coriell	
		10742	P34	82	CRB	
	MSC	hFF15	P8	Nouveau-né	Coriell	
		10742	P8	82	CRB	

Tableau 8 : Séquençage en NGS sur les culots cellulaires envoyés en 2017 (les culots 13-14042 et 13090 ont été envoyés en 2018) par Integragen

C. 1) Résultats du miRNome réalisé à partir de fibroblastes issus de patients HGPS, HGPS-like et de témoins

L'analyse bio-informatique des données du NGS a été réalisée en collaboration avec le Dr Anaïs Baudot et son étudiante en Thèse, Elva Novoa. Nous avons identifié 693 miRNAs exprimés dans les fibroblastes (patients et témoins). En se basant sur la valeur du FDR^a (*False Discovery Rate*) et du Fold Change, 6 miRs ont été identifiés comme surexprimés (Fold Change ≥ 2) et 4 miRNAs comme sous-exprimés (Fold Change $\leq 0,5$) dans les fibroblastes de patients progéroïdes (HGPS et HGPS-like) *versus* témoins.

À partir de ces 10 microARNs, nous avons réalisé une sélection basée sur des valeurs de CPM (*Count-Per-Million*), ainsi que sur l'**homogénéité d'expression** des miRNAs au sein d'un même groupe, c'est-à-dire groupe « Patients » et groupe « Témoins ».

Nous avons d'abord exclu de l'analyse les miRNAs pour lesquels le niveau d'expression était très faible (CPM <10), en considérant leur rôle fonctionnel probablement négligeable à ce faible niveau d'expression. L'**homogénéité d'expression** d'un miRNA a été également prise comme critère de sélection dans la mesure où, afin de pouvoir distinguer de manière franche le groupe de patients et le groupe de témoins, il était nécessaire qu'un miRNA soit exprimé de manière similaire chez les individus d'un même groupe, même si une différence statistique était retrouvée entre ces 2 groupes.

Afin d'illustrer les propos précédents, la figure 63 représente un microARN sélectionné et un microARN non sélectionné en fonction des critères énoncés ci-dessus.

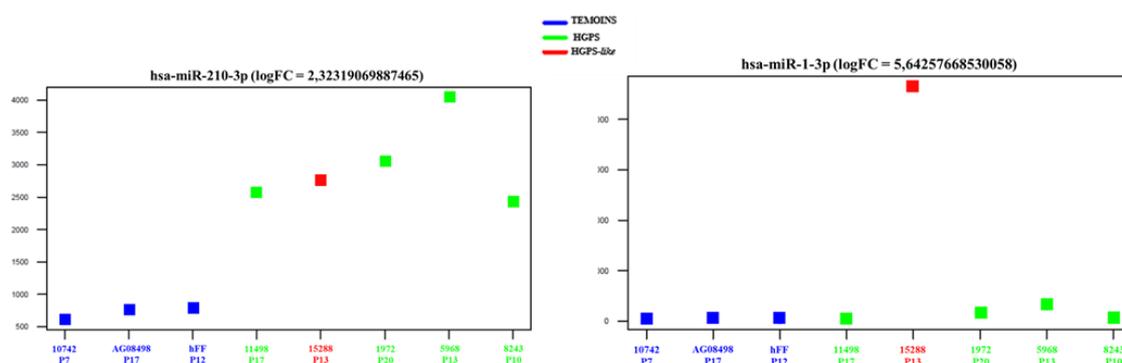


Figure 63 : Exemple du hsa-miR-210-3p sélectionné et hsa-miR-1-3p non sélectionné parmi les 10 miRNAs différentiellement exprimés dans les fibroblastes de patients *versus* témoins. Le miR-1-3p n'a pas été sélectionné en raison d'une expression très forte et isolée chez le patient HGPS-like.

^a Le FDR correspond à une normalisation de la p-value. Valeur seuil de FDR = 0,05.

L'application de ces critères de sélection nous a permis de définir 5 miRs candidats parmi les 10 identifiés au départ sur des critères purement statistiques : **miR-140-3p**, **miR-140-5p**, **miR-210-3p**, **miR-424-3p** et le **miR-503-3p** (Figure 64)

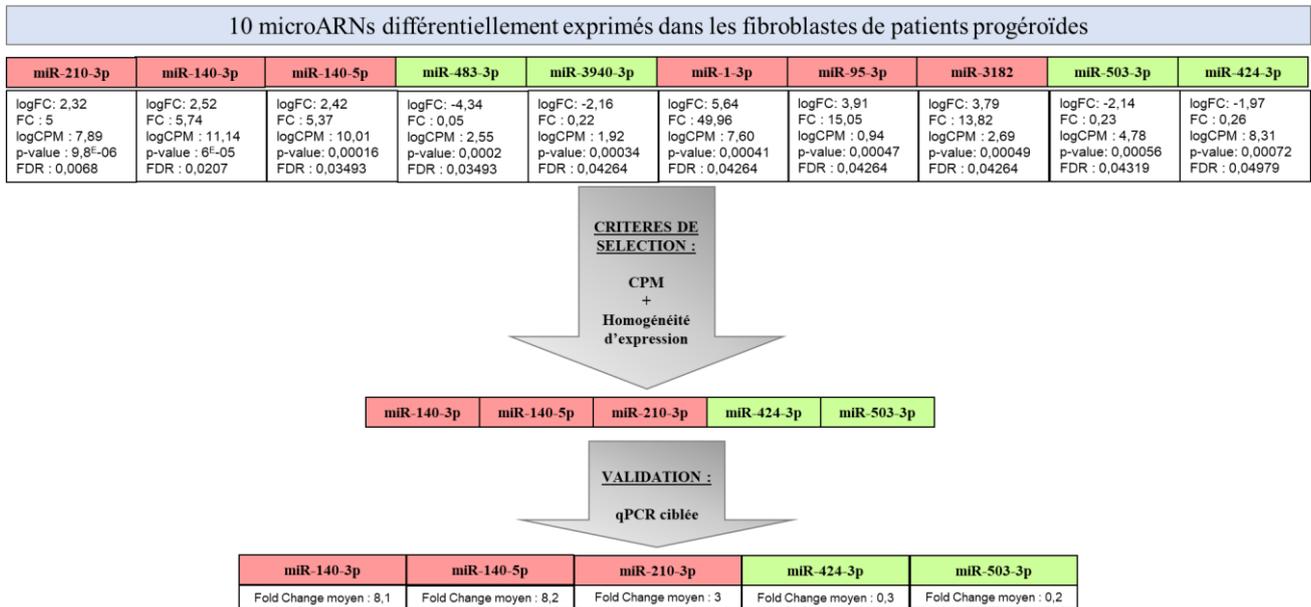


Figure 64 : Sélection de 5 miRs candidats à partir de 10 miRs différenciellement exprimés de manière significative dans les fibroblastes de patients progéroïdes (en rouge ; miRs surexprimés ; en vert ; miRs sous-exprimés).

Afin de confirmer les résultats obtenus par NGS, nous avons réalisé une RT-qPCR ciblée à partir des ARNs renvoyés après séquençage par la Société Integragen. Les miRNAs sont considérés comme surexprimés lorsqu'ils ont un Fold Change ≥ 2 et sous-exprimés lorsqu'ils ont un Fold Change $\leq 0,5$ (Cf. Partie 'Matériels et Méthodes' de l'article « *Overexpressed miR-376a-3p and miR-376b-3p in Hutchinson-Gilford Progeria fibroblasts inhibit cell cycle, induce senescence and reduce progeria clearance through autophagy* »).

Nous avons ensuite réalisé une étude bibliographique sur ces 5 miRs afin d'identifier leurs transcrits cibles et leurs rôles potentiels dans les voies physiologiques et/ou pathologiques en lien avec le vieillissement.

Nous ne présenterons dans ce manuscrit que quelques exemples de cibles de ces miRNAs, considérées comme pertinentes dans le contexte du vieillissement physiologique et pathologique (Figure 65).

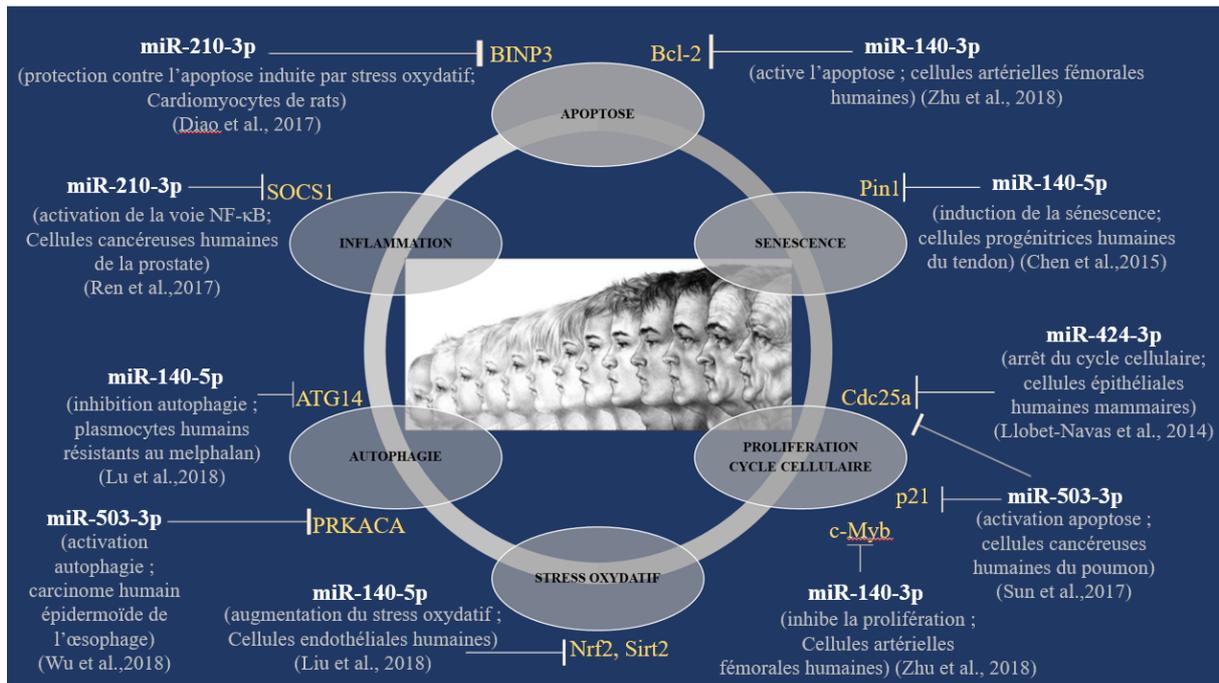


Figure 65 : Exemples de cibles des 5 miRNAs candidats

Le **miR-210-3p** est exprimé dans des cellules rénales de rats et humaines en réponse à l'hypoxie *via* des facteurs de transcriptions (HIFs pour *Hypoxia-Inducible Factors*) (Liu et al., 2017) et cible directement le transcrite de la protéine apoptotique **BINP3** (Bcl-2 adenovirus E1B 19kDa-interacting protein 3). Dans des cellules cancéreuses humaines prostatiques, le miR-210-3p cible de manière directe la protéine **SOCS1** (*Suppressor Of Cytokine Signaling Protein 1*) qui est impliquée dans l'inhibition de la voie NF-κB. Précédemment, nous avons vu que les fibroblastes HGPS présentaient une suractivation de cette voie et la surexpression du miR-210-3p pourrait participer à son activation. Ce miR est également impliqué dans les phénomènes de migration et d'invasion des cellules cancéreuses (Ren et al., 2017).

Wu *et al.* montrent que le **miR-503-3p** cible directement la sous-unité catalytique α de la PKA, la **PRKACA** (*Protein Kinase CAMP-activated catalytic subunit alpha*) dans des cellules cancéreuses humaines (cancer de l'œsophage). La PKA fait partie de la voie de signalisation PKA/mTOR inhibant l'autophagie (Wu et al., 2018). Le miR-503-3p diminue la prolifération et le phénomène de métastase des cellules par l'activation de l'autophagie. Dans des cellules cancéreuses humaines du poumon, le miR-503-3p inhibe directement une autre cible : **p21**. En régulant cette cible, ce miR induit une inhibition de la prolifération et une altération du cycle cellulaire (Sun et al., 2017).

Le gène du **miR-424-3p** fait partie du même cluster de gènes que celui du **miR-503-3p**. Dans des cellules épithéliales mammaires humaines, ces 2 miRs ciblent directement la **Cdc25a**.

La surexpression de ces miRs conduit à un arrêt du cycle cellulaire en phase G₁. Dans cette même étude, il a été montré que l'inhibition de la voie TGF- β induisait la diminution de l'expression de ces miRs qui était accompagnée d'une élévation de la quantité de Cdc25a (Llobet-Navas et al., 2014).

Zhu *et al.*, montrent que le **miR-140-3p** cible directement **c-Myb**^a et **Bcl-2**^b dans des cellules artérielles humaines fémorales. Sa surexpression conduit à une diminution de la prolifération cellulaire ainsi qu'à une induction de l'apoptose (Zhu et al., 2018).

Le **miR-140-5p** cible, dans des cellules souches humaines du tendon, le transcrite de la protéine **Pin1**^c, qui régule de manière négative la sénescence cellulaire (Chen et al., 2015). La surexpression du miR-140-5p dans les fibroblastes HGPS pourrait participer à l'activation et/ou au maintien de la **sénescence** de ces cellules. Dans une autre étude, deux autres cibles directes de ce miR ont été identifiées : **Nrf2** et **Sirt2** dans des cellules endothéliales humaines. Ces protéines interviennent dans la voie du **stress oxydant** en induisant la synthèse de protéines anti-oxydantes (Liu et al., 2018). La voie de l'**autophagie** est également régulée par ce miR. En effet, dans des plasmocytes humains de myélome multiple résistants au melphalan^d, Lu *et al.*, montrent que le miR-140-5p est surexprimé et qu'il inhibe directement la protéine **ATG14** impliquée dans l'autophagie (Lu et al., 2018). Le miR-140-5p est également impliqué dans la **différenciation ostéoblastique et adipocytaire**. En effet, il régule le développement du tissu osseux et cartilagineux en inhibant le processus d'ostéogenèse de MSC humaines en ciblant directement la protéine **BMP2** (*Bone Morphogenetic Protein 2*) (Hwang et al., 2014). Dans son étude, Luo *et al.* montrent que le miR-140-5p est régulé positivement en réponse au calcitriol^e. Le calcitriol exerce ses effets biologiques *via* son récepteur, le VDR (*Vitamine D Receptor*) qui est un facteur de transcription. Lorsque le VDR est inhibé par un siRNA, le taux de miR-140-5p diminue et l'expression des protéines appartenant à la voie de la MAPK augmente (Luo et al., 2018). Les adipocytes proviennent de la même cellule souche mésenchymateuse que les ostéoblastes. De ce fait, le miR-140-5p pourrait peut-être également jouer un rôle dans la différenciation des adipocytes. Par exemple, dans des cellules progénitrices murines, le miR-140-5p inhibe de manière directe la protéine **TGFBR1** (*Transforming Growth Factor Beta Receptor I*) impliquée dans le processus de différenciation adipocytaire (Zhang et al., 2015b).

^a Facteur de transcription impliqué notamment dans la régulation du cycle cellulaire et la prolifération

^b Protéine anti-apoptotique

^c Cette protéine joue un rôle notamment dans la progression du cycle cellulaire et la survie des cellules.

^d Le melphalan est un agent alkylant utilisé dans certains protocoles de chimiothérapies.

^e Le Calcitriol ou 1,25-dihydroxycholécalférol est la forme active de la vitamine D.

Dans notre étude, les miR-424-3p et miR-503-3p sont sous-exprimés dans les fibroblastes de patients HGPS et HGPS-*like* par rapport aux fibroblastes de témoins et les miR-210-3p, -140-3p et -140-5p sont surexprimés. Ces 5 miRs semblent représenter des miRs candidats pertinents car ils sont impliqués dans des voies moléculaires altérées dans la Progeria et les syndromes apparentés, telles que l'apoptose, la sénescence, le stress oxydant, l'inflammation, l'autophagie et la prolifération cellulaire. Des tests fonctionnels sont maintenant nécessaires afin de valider ces miRs en tant qu'acteurs impliqués dans la physiopathologie de la Progeria et des syndromes apparentés.

C.2) Résultats du Transcriptome réalisé à partir de fibroblastes issus de patients HGPS, HGPS-*like* et de témoins

L'analyse de 16 989 transcrits par NGS dans les fibroblastes de patients a montré que 233 ARNm, basés sur la valeur de leur FDR^a, étaient différentiellement exprimés dans les fibroblastes de patients *versus* les fibroblastes de témoins. Parmi eux, 139 ARNm sont surexprimés (Fold Change ≥ 2) et 94 ARNm sont sous-exprimés (Fold Change $\leq 0,5$).

À partir de ces 233 transcrits, nous avons réalisé une 1^{ère} sélection basée sur des valeurs de **TPM** (Transcrits Par Million), ainsi que, comme vu précédemment pour les miRs, sur **l'homogénéité d'expression** des ARNm au sein d'un même groupe (Figure 66).

Afin d'illustrer les propos précédents, j'ai sélectionné 3 représentations montrant un ARNm sélectionné et 2 ARNm non sélectionnés en fonction des critères énoncés ci-dessus (Figure 67).

^a Valeur seuil de FDR = 0,05

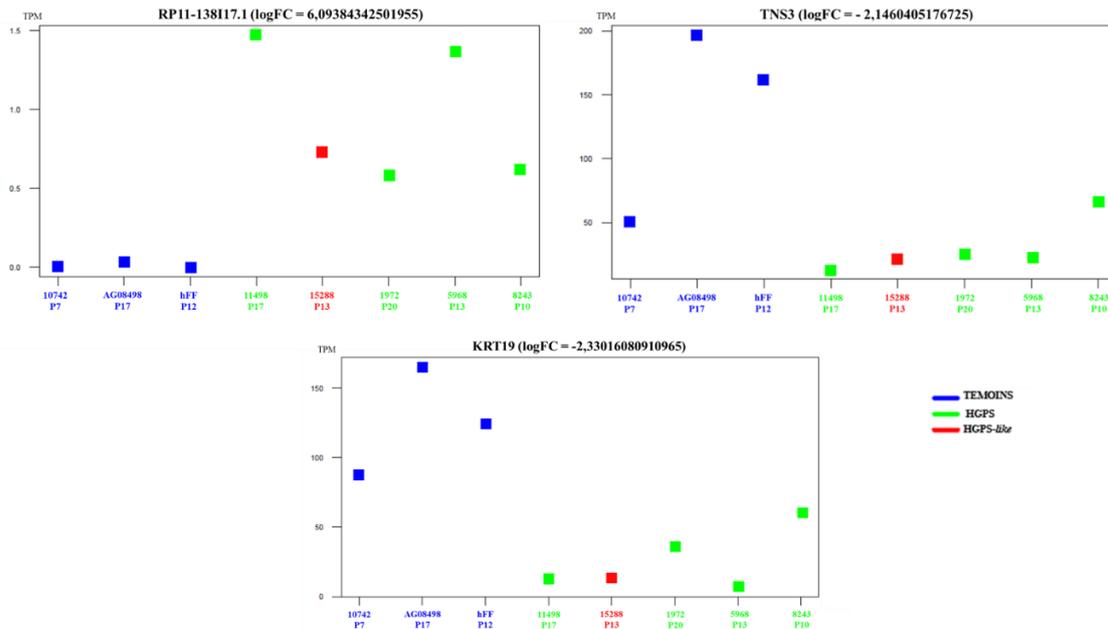


Figure 66 : Exemple des transcrits RP11-138117.1 et TNS3 non sélectionnés et du transcrit KRT19 sélectionné parmi les 233 transcrits différentiellement exprimés dans les fibroblastes de patients *versus* témoins. (RP11-138117.1 non sélectionné à cause du niveau d'expression très faible. TNS3 non sélectionné à cause de la non-homogénéité d'expression du transcrit chez les témoins)

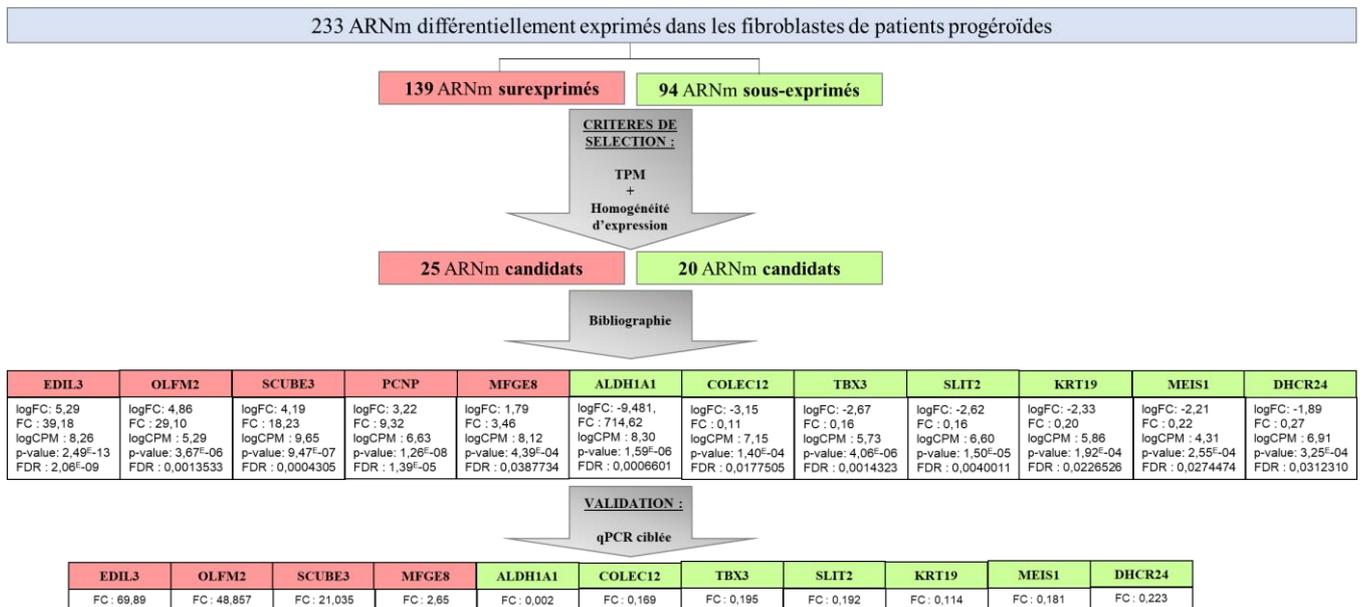


Figure 67 : Sélection de 11 ARNm candidats à partir de 233 ARNm différentiellement exprimés de manière significative dans les fibroblastes de patients progéroïdes (en rouge : ARNm surexprimés ; en vert : ARNm sous-exprimés).

À partir de ces critères, nous avons sélectionné 25 ARNm surexprimés et 20 ARNm sous-exprimés. Par la suite, nous avons réalisé une 2^{nde} sélection basée cette fois-ci sur une étude bibliographique orientée sur l'implication de ces transcrits dans les voies physiologiques et/ou pathologiques en lien avec le vieillissement.

Les données bibliographiques nous ont permis de sélectionner 5 ARNm surexprimés (**EDIL3**, **OLFM2**, **SCUBE3**, **PCNP**, **MFGE8**) et 7 ARNm sous-exprimés (**ALDH1A1**, **COLEC12**, **TBX3**, **SLIT2**, **KRT19**, **MEIS1**, **DHCR24**). J'ai réalisé une RT-qPCR ciblée à partir des mêmes ARNs renvoyés par la Société Integragen, afin de valider les résultats obtenus par NGS. Un des 5 ARNm, identifié comme surexprimés en NGS, n'a pas été confirmé comme dérégulé par RT-qPCR : il s'agit de PCNP, qui n'a donc pas été retenu pour la suite de l'étude.

L'analyse bibliographique a permis de mettre en évidence les fonctions suivantes, potentiellement en rapport avec la physiopathologie de la Progeria et des syndromes apparentés.

- **Prolifération cellulaire / Cycle cellulaire**

La protéine **EDIL3** (*Epidermal growth factor-like repeats and Discoidin I Like domain 3*) stimule la différenciation des ostéoblastes en interagissant notamment avec la voie $\alpha 5\beta 1$ /ERK/Runx2 (Oh et al., 2017). L'inhibition d'Edil3 dans des cellules endothéliales rétiniennes humaines conduit à une diminution de la prolifération, à un arrêt du cycle cellulaire en phase G₁ et à une diminution des Cyclines D1 et E1 (Shen et al., 2017).

Dans des cellules de chondrosarcome, **TBX3** (*T-box transcription factor 3*) est décrit comme ciblant de manière directe la p21. L'inhibition de p21 par TBX3 conduit à une diminution de la prolifération des cellules (Willmer et al., 2016).

SLIT2 inhibe la voie signalisation de VEGF-Notch et induit une diminution de la prolifération et de la migration des cellules endothéliales (Li et al., 2017). L'inhibition de SLIT2 dans des cellules cancéreuses gastriques conduit à une activation de la voie AKT/ β -caténine (élévation de c-Myc et Cycline D1 par exemple), à une diminution de l'apoptose, à une augmentation de la migration et de l'invasion des cellules (Shi et al., 2014b).

KRT19 (*Keratin 19*) est une protéine interagissant avec la β -caténine dans la voie de signalisation Notch dans des cellules cancéreuses mammaires. La surexpression induite de KRT19 induit une diminution de la prolifération cellulaire, de la migration et de l'invasion ainsi que de la résistance aux traitements médicamenteux dans des cellules présentant un phénotype de cellules souches cancéreuses (Saha et al., 2018, 2017).

Dans des cardiomyocytes de rats, **MEIS1** induit une augmentation de l'expression de CDKIs, dont p16 et p21, responsable d'un arrêt du cycle cellulaire (Mahmoud et al., 2013).

- **Transcription génique**

Au cours de la différenciation de MSCs humaines en cellules du muscle lisse, induite par le facteur TGF- β (*Transforming Growth Factor*), la protéine **OLFM2** (*Olfactomedin 2*) s'accumule dans le noyau et joue le rôle de co-facteur nucléaire en se liant notamment au facteur de transcription SRF (*Serum Response Factor*). Cette interaction participe à la diminution de l'interaction entre SRF et HERP1 et de son expression. HERP1 inhibe la transcription de gènes dont ceux impliqués dans la différenciation du muscle lisse (Shi et al., 2014a). Dans des cellules du muscle lisse aortique de rat, HERP1 est une cible de Notch (Iso et al., 2002).

- **Cancérogenèse**

L'inhibition de **SCUBE3**, dans des cellules de cancer du poumon et dans un modèle de xénotransgreffe de cellules d'adénocarcinome pulmonaire à des souris immunodéprimées, inhibe la migration et l'invasion des cellules cancéreuses. La protéine Scube3 peut également, *via* son extrémité C-terminale clivée, moduler les récepteurs au facteur TGF- β 1 et intervenir dans d'autres processus cellulaires comme par exemple la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT), le remodelage de la matrice extracellulaire, l'angiogenèse... (Wu et al., 2011).

- **Inflammation**

Une réponse inflammatoire est induite lors de l'interaction entre la bactérie *Helicobacter pylori* et la protéine transmembranaire **COLEC12** (*Collectin subfamily member 12*) des cellules du tissu gastrique. Cette inflammation est caractérisée par la libération de PGE2 (Prostaglandine E₂) par les cellules stromales gastriques induisant la libération d'IL-23 par les cellules dendritiques de la muqueuse gastrique (Chang et al., 2018).

- **Stress oxydant**

MFGE8 (*Milf Fat Globule-Epidermal growth factor 8*) est une protéine impliquée dans la protection anti-oxydante au cours de l'inflammation neuronale induite par les LPS (lipopolysaccharides). Un pré-traitement avec MFGE8 réduit l'effet oxydant des LPS : augmentation de Nrf-2, diminution de la quantité de ROS, augmentation d'enzymes anti-oxydantes (GSH : glutathion, SOD) (Li et al., 2019) ...

Dans des cellules cancéreuses ovariennes, un taux élevé de **ALDH1A1** (*Aldéhyde déhydrogénase 1A1*) induit une activation du facteur de transcription NRF2 (*Nuclear Factor Erythroid 2*) *via* l'activation de la voie de la p62 (Kim et al., 2018). NRF2 est impliqué dans la

réponse au stress oxydant en activant la transcription de gènes codant notamment des enzymes anti-oxydantes.

Dans un modèle murin de cardiomyopathie dilatée, **DHCR24** (*24-Dehydrocholesterol reductase*) active la voie de la PI3K et diminue l'apoptose des myocytes (Dong et al., 2018). Dans des neurones primaires et des cellules de neuroblastome, DHCR24 participe à la protection contre le stress oxydant. Une exposition aigue au stress oxydant augmente l'expression de DHCR24, ce qui est associé à une augmentation de la synthèse de cholestérol, conférant une résistance au stress oxydant (Kuehnle et al., 2008). Des expériences ont montré que la teneur en cholestérol de la membrane plasmique de cellules endothéliales participait à la réponse au stress oxydant *via* la voie de la MAP/ERK (Yang et al., 2006). Par ailleurs, le niveau de DHCR24 est diminué lors d'une exposition chronique au stress oxydant, associée à une diminution du niveau de p53 (Kuehnle et al., 2008).

C. 3) Discussion et perspectives

Nous avons réalisé une étude globale associant miRNome et transcriptome en NGS, à partir de fibroblastes dermiques, de cellules iPS et dérivées d'iPS (MSC) de patients atteints de syndromes progéroïdes (dont 4 patients HGPS, 1 HGPS-like et 1 APS) et de 3 témoins, dans le but de mettre en évidence des dérégulations communes à ces syndromes progéroïdes. Les objectifs de ce projet sont 1/ d'analyser les données obtenues à partir du NGS pour identifier des miRs et des transcrits d'intérêt ; 2/ à partir de modèles *in vitro* et d'un modèle murin, de réaliser des études fonctionnelles pour des miRNAs et des transcrits sélectionnés afin de comprendre leur implication dans la physiopathologie de la Progeria et des syndromes apparentés ; 3/ d'évaluer ces miRNAs et ces transcrits en tant que nouvelles cibles thérapeutiques.

Pour répondre au 1^{er} objectif, une analyse des données issues du NGS a été réalisée avec l'aide de la plateforme de Bioinformatique et de Génomique de notre unité, dirigée par le Dr. Valérie Delague, suivie d'une analyse bibliographique afin d'identifier des microARNs, des transcrits et des voies métaboliques dérégulés communément à la Progeria et aux syndromes apparentés, en s'appuyant sur la biologie des systèmes.

J'ai déjà initié ce travail par l'analyse des données sur des fibroblastes dermiques issus de patients Progeria et syndromes apparentés. Nous avons identifié 5 miRNAs (parmi lesquels 3 sont surexprimés et 2 sous-exprimés) et réalisé une étude bibliographique afin d'évaluer l'implication de ces derniers dans le vieillissement. Parmi ces 5 candidats, nous avons choisi de sélectionner le miR-140-5p pour la suite de notre projet sur la base des données scientifiques à disposition dans la littérature, en lien avec les altérations moléculaires et le phénotype clinique des syndromes progéroïdes : la sénescence, l'autophagie, la différenciation adipocytaire et osseuse ainsi que le stress oxydant. Concernant les ARNm candidats, nous avons sélectionnés 12 ARNm (dont 5 sont surexprimés et 7 sous-exprimés) parmi lesquels 3 d'entre eux (MFGE8, DHCR24 et ALDH1A1) sont impliqués dans le stress oxydant, un des mécanismes moléculaires à l'origine de la sénescence prématurée.

Sur la base des données du séquençage NGS, nous avons recherché des liens directs entre les miRNAs et les ARNm identifiés comme dérégulés dans notre étude, en regardant par exemple si les ARNm sous-exprimés n'étaient pas des cibles décrites de miRNAs surexprimés, et inversement. Un réseau d'interactions miRNAs/ARNm à partir des bases de données d'interactions prédites et prouvées a été réalisé par l'équipe du D^r Anaïs Baudot et n'a montré aucun lien entre la dérégulation des miRNAs et celle des ARNm. Cette absence de lien pourrait

paraître surprenante, mais on sait que, chez les mammifères, le mécanisme de régulation largement majoritaire est une inhibition de la traduction protéique de l'ARNm cible par les microARNs, cet ARNm n'étant pas dégradé. En d'autres termes, les ARNm cibles des miRNAs dérégulés ont probablement une expression conservée par rapport aux témoins. L'étude de l'impact de ces dérégulations de pourra se faire qu'au niveau protéique.

La suite de ce projet va maintenant consister à étudier ces candidats *in vitro* et *in vivo* afin d'évaluer leurs rôles dans la physiopathologie de la Progeria et des syndromes apparentés, à l'aide de tests fonctionnels. Nous disposons au laboratoire de modèles cellulaires issus de témoins et de patients tels que des fibroblastes dermiques, des cellules iPS et dérivées (MSCs et VSMCs).

Pour le **miR-140-5p**, nous souhaitons en particulier étudier *in vitro*, dans le contexte des syndromes progéroïdes, son rôle sur le stress oxydant (mesure de la production de ROS par la détection de H₂O₂ ; détection de la peroxydation lipidique ; mesure de la quantité de glutathion réduit...) et sur la sénescence cellulaire (test de la β-galactosidase acide et dosage de la protéine p16). Le ou les modèles utilisés pourront être des fibroblastes de témoins transfectés avec un mimic miR-140-5p pour reproduire la surexpression observée chez les patients et/ou des cellules de patients transfectées avec un antimir, pour inhiber l'action de ce miR sur ces cibles. Nous étudierons également l'impact du miR-140-5p sur la différenciation du tissu osseux et adipocytaire à l'aide de cellules iPS générées sur la plateforme de notre unité (dosages de marqueurs et colorations spécifiques des cellules osseuses (ostéoblastes, chondroblastes) et/ou adipocytaires...).

L'étude *in vitro* du rôle des transcrits **MFGE8**, **DHCR24** et **ALDH1A1** dans la voie du stress oxydant sera également réalisée, après modulation de leur expression, avec ou sans traitements des cellules par des oxydants ou anti-oxydants, afin d'identifier un potentiel lien entre ces ARNm et le stress oxydant dans ces pathologies.

Afin de confirmer ces résultats *in vitro*, nous réaliserons des études *in vivo* sur le modèle murin *Lmna*^{G609G/G609G} développé dans notre unité, reproduisant fidèlement l'anomalie moléculaire avec production de progérine et le phénotype clinique. D'autres tests fonctionnels seront également réalisés, en fonction des mécanismes moléculaires ciblés par les autres transcrits identifiés comme dérégulés par l'analyse NGS.

Parallèlement à l'étude miRNome et transcriptome réalisée sur les fibroblastes de patients progéroïdes et de témoins, nous avons pour autre perspective d'analyser les données du NGS à partir des **cellules iPS** et des cellules dérivées d'iPS, les **MSCs**, dont les culots cellulaires ont été envoyés en même temps que ceux des fibroblastes dermiques. Nous

comparerons ainsi les données obtenues dans chaque type cellulaire, afin d'identifier ou non d'éventuels dérégulations communes. En cas de dérégulation de l'expression des microARNs et/ou des ARNm dans les iPS et MSCs issues de patients, il est possible que les résultats soient différents de ceux obtenus avec les fibroblastes étant donné que l'expression des miRs et des d'ARNm peut être dépendante du type cellulaire et du niveau de différenciation.

De plus, l'identification de **lncRNAs** à partir de ces 3 types de cellules reste à réaliser. Les lncRNAs sont de longs ARNs de plus de 200 nucléotides ne codant pas des protéines. À l'heure actuelle, quelques lncRNAs ont été décrits avec précision dans la littérature et représentent un nouveau champ d'étude. Il ressort que ces lncRNAs seraient des régulateurs de l'expression génique *via* divers mécanismes : organisation structurale de la chromatine, recrutement de facteurs de transcriptions, modulation de l'épissage alternatif, stabilisation des ARNm, interaction avec les miRNAs, modulation de la traduction...(Fernandes et al., 2019; Romero-Barrios et al., 2018). Fu *et al* décrivent dans des cellules hépatiques humaines, une compétition entre le **lncRNA-ATB** (*lncRNA-activated by TGF- β*) et le **miR-425-5p** vis-à-vis de transcrits comme par exemple SMAD2. La surexpression du lncRNA-ATB induit notamment une surexpression du transcrit SMAD2 (impliqué dans la régulation de la transcription) accompagnée d'une diminution du miR-425-5p et inversement. Ce lncRNA-ATB est fortement exprimé dans le foie et le plasma de patients atteints d'hépatite C et est corrélé avec le degré de fibrose hépatique (Fu et al., 2016). Dans des cellules humaines péritonéales, la surexpression du **lncRNA AV310809** induit une augmentation de la β -caténine. Cette protéine est un activateur transcriptionnel appartenant à la voie de signalisation Wnt2/ β -caténine qui intervient par exemple dans le phénomène d'EMT des cellules cancéreuses, la fibrose... (Wei et al., 2019). Dans des cellules progénitrices hépatiques murines, la surexpression du **lncRNA MALAT1** active la voie de signalisation Wnt : augmentation de l'expression de la β -caténine, de C-Myc et de la Cycline D1. Ce lncRNA conduit également à la surexpression de SRSF1 impliquée dans le phénomène d'épissage du gène *LMNA* (Malakar et al., 2017).

L'identification d'une dérégulation dans l'expression de lncARNs dans les cellules de patients atteints de Progeria et de syndromes apparentés serait particulièrement intéressante dans la mesure où ceux-ci n'ont jamais été étudiés dans ces pathologies et qu'ils pourraient apporter de nouvelles pistes d'étude dans la physiopathologie de la Progeria et des syndromes apparentés.

À plus long terme, les données issues du NGS et l'identification de miRs et de transcrits candidats pourront mener à l'évaluation de drogues ciblant ces transcrits *in vitro* et *in vivo* sur

les modèles cellulaires cités plus haut et sur le modèle murin de Progeria disponibles au laboratoire.

Ces travaux sont donc destinés à bénéficier à terme aux patients, en identifiant des voies de signalisation communes dérégulées dans ces syndromes progéroïdes apparentés, afin de proposer de nouvelles approches thérapeutiques dans ces maladies au pronostic sombre.

CHAPITRE III : Conclusion générale

À travers ce projet, nous avons mis en évidence des microARNs dérégulés dans la Progeria de Hutchinson-Gilford, dont les miRs-376a-3p, -376b-3p et -140-5p. Ces derniers sont surexprimés dans les fibroblastes de patients HGPS et pour les miRs-376a/b, leur surexpression induite *in vitro* dans des fibroblastes de témoin a montré qu'ils avaient un rôle de régulateur négatif sur le cycle cellulaire et la prolifération en induisant un état de sénescence. Leur inhibition pourrait conduire à une levée d'inhibition exercée par ces miRNAs sur ces voies impliquées dans le vieillissement. D'autres miRs sont dérégulés dans les fibroblastes de patients HGPS, notamment le miR-140-5p, surexprimé dans les fibroblastes de patients HGPS et HGPS-like, qui pourrait avoir un rôle dans la dérégulation du stress oxydant décrit dans ces cellules mais également dans la sénescence, l'autophagie et la différenciation adipocytaire et osseuse. D'autres molécules sont dérégulées à la fois dans les fibroblastes de patients HGPS et de patients atteints de syndromes progéroïdes en particulier des ARNm codant des facteurs impliqués dans la régulation du stress oxydant : MFGE8, DHCR24 et ALDH1A1.

L'ensemble de ces résultats ouvre de nombreuses perspectives à la fois pour une meilleure compréhension de ces maladies rares au pronostic très sombre et pour identifier de nouvelles cibles thérapeutiques (Figure 68). Ils offrent également une opportunité de mieux connaître le vieillissement au sens large permettant peut-être dans le futur de mieux contrôler ses effets délétères associés.

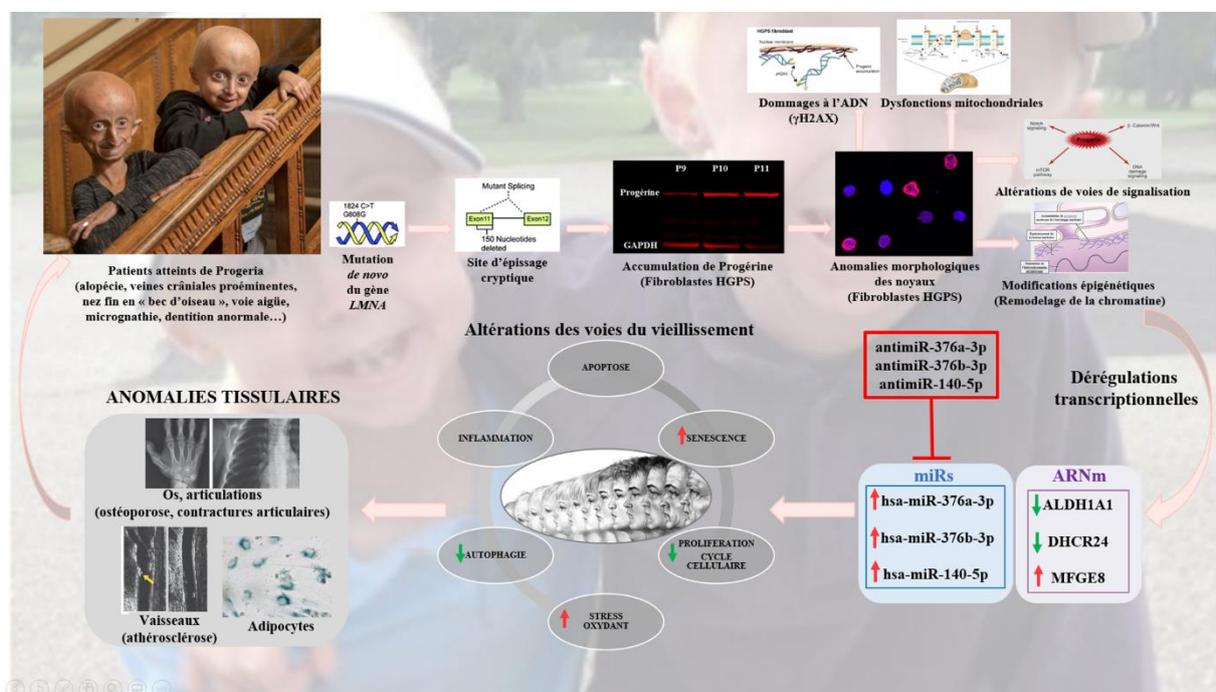


Figure 68 : Hypothèse physiopathologique dans la Progeria impliquant les miR-376a-3, -376b-3p et 140-5p et d'une potentielle thérapeutique basée sur l'administration d'antimiRs dirigés contre ces miRNAs

ANNEXE : Revue scientifique publiée

*« MicroRNAs in hereditary and sporadic premature aging syndromes
and other laminopathies ».*

Frankel D*, **Delecourt V***, Harhour K, De Sandre-Giovannoli A, Lévy N, Kaspri E, Roll P.
Aging Cell. 2018 Apr 25 :e12766.

*Frankel D and Delecourt V contributed equally to this work



MicroRNAs in hereditary and sporadic premature aging syndromes and other laminopathies

Diane Frankel^{1,2} | Valérie Delecourt¹ | Karim Harhour¹ | Annachiara De Sandre-Giovannoli^{1,3} | Nicolas Lévy^{1,3} | Elise Kaspi^{1,2} | Patrice Roll^{1,2}

¹Aix Marseille Univ, INSERM, MMG, Marseille, France

²APHM, Hôpital la Timone, Service de Biologie Cellulaire, Marseille, France

³APHM, Hôpital la Timone, Département de Génétique Médicale, Marseille, France

Correspondence

Patrice Roll, INSERM/AMU U1251, MMG, Aix Marseille University, Marseille, France.
Email: patrice.roll@univ-amu.fr

Summary

Hereditary and sporadic laminopathies are caused by mutations in genes encoding lamins, their partners, or the metalloprotease ZMPSTE24/FACE1. Depending on the clinical phenotype, they are classified as tissue-specific or systemic diseases. The latter mostly manifest with several accelerated aging features, as in Hutchinson–Gilford progeria syndrome (HGPS) and other progeroid syndromes. MicroRNAs are small noncoding RNAs described as powerful regulators of gene expression, mainly by degrading target mRNAs or by inhibiting their translation. In recent years, the role of these small RNAs has become an object of study in laminopathies using *in vitro* or *in vivo* murine models as well as cells/tissues of patients. To date, few miRNAs have been reported to exert protective effects in laminopathies, including miR-9, which prevents progerin accumulation in HGPS neurons. The recent literature has described the potential implication of several other miRNAs in the pathophysiology of laminopathies, mostly by exerting deleterious effects. This review provides an overview of the current knowledge of the functional relevance and molecular insights of miRNAs in laminopathies. Furthermore, we discuss how these discoveries could help to better understand these diseases at the molecular level and could pave the way toward identifying new potential therapeutic targets and strategies based on miRNA modulation.

KEYWORDS

aging, genetics, Hutchinson–Gilford progeria syndrome, laminopathies, lamins, microRNA

Abbreviations: 3'UTR, 3' untranslated transcript region; ADLD, adult-onset autosomal-dominant leukodystrophy; AGO, Argonaute protein; APLD, acquired partial lipodystrophy; ASCs, adipose stem cells; AWS, atypical Werner syndrome; ceRNA, competing endogenous RNA; CMD, congenital muscular dystrophy; CMT2B1, Charcot–Marie–Tooth disease type 2B1; DCM1A, dilated cardiomyopathy type 1A; EDMD, Emery–Dreifuss muscular dystrophy; FPLD2, Dunnigan-type familial partial lipodystrophy; HCV, hepatitis C virus; HGPS, Hutchinson–Gilford progeria syndrome; HGPS-like, Hutchinson–Gilford progeria-like syndromes; hMSCs, human mesenchymal stem cells; hsa, *Homo sapiens*; IGF-1, insulin-like growth factor-1; INM, inner nuclear membrane; iPSCs, induced pluripotent stem cells; LAD, lamin-associated domains; LGMD1B, limb-girdle muscular dystrophy type 1B; LIRLLC, lipodystrophy with diabetes, hepatic steatosis, hypertrophic cardiomyopathy, and leukomelanodermic papules; lncRNA, long-noncoding RNA; MAD, mandibuloacral dysplasia; MEFs, mouse embryonic fibroblasts; miRNAs, microRNAs; mmu, *mus musculus*; mRNAs, messenger RNAs; MSCs, mesenchymal stem cells; NETs, nuclear envelope transmembrane partner proteins; NLS, nuclear localization signal; NPC, nuclear pore complex; nt, nucleotides; ORF, open reading frame; RD, restrictive dermopathy; ROS, reactive oxygen species; VSMCs, vascular smooth muscle cells.

Diane Frankel and Valérie Delecourt contributed equally to this work.

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

© 2018 The Authors. *Aging Cell* published by the Anatomical Society and John Wiley & Sons Ltd.

1 | LAMINS AND LAMINOPATHIES

Lamins are type V intermediate filament proteins specifically expressed in the nucleus of eukaryotic cells. They are divided into A-type and B-type families. *LMNA* encodes A-type lamins produced by alternative splicing of its pre-mRNA. The two major isoforms of this A-type include lamin A and lamin C, but minor isoforms have also been described: lamin A Δ 10, lamin C2 (Furukawa, Inagaki & Hotta, 1994; Lin & Worman, 1993; Machiels et al., 1996), and more recently LMNA Δ 447 and LMNA Δ 297 (DeBoy et al., 2017). Lamins A and C are mainly expressed in the nucleus of differentiated somatic cells. Concerning B-type lamins, *LMNB1* encodes lamin B1, whereas *LMNB2* encodes lamins B2 and B3 by alternative splicing (Elkhatib et al., 2015; Furukawa et al., 1994; Feng Lin & Worman, 1995). Lamins B1 and B2 are expressed in nearly all somatic cells, while lamin B3 is a specific spermatid type.

B-type lamins and the lamin A are produced as precursors forms called "prelamins," which undergo several maturation steps before their importation into the nucleus. Firstly, the cysteine of the CAAX box in the C-terminal domain of these prelamins is farnesylated by a farnesyltransferase. This process leads to the prelamins anchoring into the endoplasmic reticulum membrane on its cytosolic leaflet. Secondly, the AAX sequence is cleaved by FACE1/ZMPSTE24 or by FACE2/Rce1. Thirdly, the cysteine residue on which the farnesyl group was previously fixed is carboxymethylated by a isoprenylcysteine carboxyl methyltransferase (Cau et al., 2014). After this step, B-type lamins are mature and remain farnesylated. As they carry a nuclear localization signal (NLS) in their tail domain, they are imported through the nuclear pore complex (NPC) and remain anchored in the inner nuclear membrane (INM) of the nuclear envelope. For this reason, mature lamins B (B1, B2 and B3) are only present in the nuclear *lamina*, a protein meshwork at the nuclear periphery, close to the INM. Prelamin A undergoes a fourth and last maturation step, corresponding to the cleavage of the 15 C-terminal amino acids by the metalloproteinase FACE1/ZMPSTE24. Lamin C, a splicing variant of lamin A missing the 98 carboxy terminal amino acids, is directly translated into a mature protein. As mature lamin A and lamin C are not farnesylated, they are not directly anchored in a membrane. They bear an NLS leading to their importation into the nucleoplasm. In the nucleus, lamins A and C are constituents of the nuclear matrix: (i) the *lamina* where they interact with B-type lamins, with several nuclear envelope transmembrane partner proteins (NETs) of the INM and with the NPC, and (ii) the internal nuclear meshwork forming a component of the nucleoskeleton (Cau et al., 2014; Gruenbaum & Foisner, 2015; Turgay et al., 2017). This lamin meshwork plays a major role in cell structure by conferring the architecture of the nucleoplasm and maintaining the nuclear shape (Ungriht & Kutay, 2017). Lamins are essential for chromatin organization via the lamin-associated domains (LAD), which are genomic regions that make contact with the nuclear *lamina* (van Steensel & Belmont, 2017). Lamins are also involved in many nuclear functions, such as gene expression, DNA replication, and repair (Gruenbaum & Foisner, 2015; Naetar, Ferraioli & Foisner, 2017). A-type lamins are

involved in mechanosignaling and mechanosensing and contribute to nuclear stiffness, whereas B-type lamins are involved in nucleus elasticity.

The importance of lamins in many physiological mechanisms explains the wide spectrum of diseases linked to these proteins. Hereditary laminopathies are therefore caused by mutations in genes encoding lamins (primary forms) or proteins implicated in their maturation, such as ZMPSTE24, and in genes encoding their partners (secondary forms; Schreiber & Kennedy, 2013; Worman, 2012; Worman & Bonne, 2007). Laminopathies can also be acquired. For example, they can have an iatrogenic origin, as in HIV patients treated with protease inhibitors. Most molecules of this class inhibit ZMPSTE24 function, resulting in the blockage of prelamin A maturation and its accumulation in nuclei, leading to clinical manifestations of lipodystrophy syndrome (Béréziat et al., 2011; Caron et al., 2007; Coffinier et al., 2008; Miranda et al., 2007).

The first hereditary laminopathy described was Emery–Dreifuss muscular dystrophy in 1999 (Bonne et al., 1999). Since then, the number of these diseases has increased. Mutations in *LMNA* or *ZMPSTE24* cause many different phenotypes, which can be classified in multisystem diseases or tissue-specific phenotypes (Worman, 2012; Worman & Bonne, 2007). Table 1 summarizes this classification: The multisystem diseases correspond mostly to accelerated aging disorders including progeria and other progeroid syndromes, whereas the tissue-specific diseases contain lipodystrophic syndromes, striated muscle diseases, and an axonal peripheral neuropathy. It is of note that overlapping phenotypes exist, such as mandibuloacral dysplasia, which is a combination of progeroid disorder and partial lipodystrophy (Agarwal, Kazachkova, Ten & Garg, 2008). Mutations in B-type lamins have also been described, enlarging the field of laminopathies. Thus, heterozygous mutations in *LMNB2* have been reported to predispose to the development of acquired partial lipodystrophy (APLD), also called "Barraquer-Simons syndrome" (Hegele et al., 2006), and duplication of *LMNB1* leads to adult-onset autosomal-dominant leukodystrophy (ADLD; Padiath et al., 2006).

2 | MICRORNAS

MicroRNAs (miRNAs) are small noncoding RNAs of 18–25 nucleotides (nt) in length. The first described was lin-4 in *C. elegans* in 1993 (Lee, Feinbaum & Ambros, 1993). To date, the specific database miRbase lists 2,588 mature miRNAs for *Homo sapiens* (hsa; Griffiths-Jones, Grocock, van Dongen, Bateman & Enright, 2006), and 66,160 articles are referenced in PubMed using the keyword "microRNA," with a spectacular increase for 10 years. miRNA genes are present in intergenic regions with an independent promoter (52%), in introns (40%), or less frequently in exons (8%). In these last two cases, the expression of the miRNA is linked to transcription of the host gene (Hsu et al., 2006; Rodriguez, Griffiths-Jones, Ashurst & Bradley, 2004). To become mature, miRNAs need to undergo several post-transcriptional modifications. Initially, the miRNA is transcribed

TABLE 1 Classification of primary and ZMPSTE24-related laminopathies

Diseases	Genes	Recurrent mutations	Transmission modes	Prenylated prelamin A	Clinical features	References
Progeria and Progeroid syndromes						
Hutchinson–Gilford progeria syndrome, typical form (HGPS)	LMNA	c.1824C>T; p.G608G	De novo; HET	Progerin (Prelamin AΔ50)	Early childhood: alopecia, narrow nasal bridge, receding mandible, loss of subcutaneous fat, progressive joint contractures, nail dystrophy, tightness skin, delayed tooth eruption, osteoarthritis, arteriosclerosis leading to myocardial infarction or stroke. Overlapping phenotypes with MAD, RD	De Sandre-Giovannoli et al. (2003) Eriksson et al. (2003)
Hutchinson–Gilford progeria-like syndromes (HGPS-like)	LMNA	c.1968G>A; p.Q656Q c.1968+1G>A c.1968+2T>C; c.1821G>A c.1968+5G>A, c.1868+1C>G	De novo; HET	Depending on mutation: Progerin ± Dermopathin (Prelamin AΔ90); Prelamin AΔ35	Depending on mutation: premature aged appearance in adulthood (c.1968G>A); Classical HGPS phenotype, neonatal forms (c.1968+1G>A and c.1821G>A); Short stature, progeroid appearance (c.1968 + 5G>A and c.1868+1C > G)	Barthélemy et al. (2015) Moulson et al. (2007) Harhour et al. (2016)
Atypical progeroid syndromes	LMNA	p.D136Y, p.E138K, p.D300N, p.T528M, p.T528M + p.M540T	HET, HOM or compound HET	–	Depending on mutation: premature aged appearance with cases of classical HGPS phenotype; musculoskeletal features; early arteriosclerosis and cardiovascular events	Verstraeten et al. (2006) Doubaj et al. (2012) <i>Unpublished data</i>
Restrictive dermopathy (RD)	LMNA ZMPSTE24		De novo; HET (LMNA) HOM (ZMPSTE24)	Dermopathin (Prelamin AΔ90) Full-length prelamin A	Intrauterine growth retardation, reduced fetal movements; thin, tightly adherent translucent skin, superficial vessels, facial dysmorphism, generalized joint ankylosis; death in the first week of life. Overlapping phenotypes described with HGPS	Navarro et al. (2004) Navarro et al. (2005)
Atypical Werner syndrome	LMNA		HET	–	Initial symptoms earlier than typical WS: cataract, dermatological pathology (scleroderma-like skin...), short stature, graying or thinning of hair, diabetes mellitus type 2, hypogonadism, osteoporosis, osteosclerosis of digits, atherosclerosis, voice change	Chen et al. (2003) Renard et al. (2009)

(Continues)

TABLE 1 (Continued)

Diseases	Genes	Recurrent mutations	Transmission modes	Prenylated prelamin A	Clinical features	References
Mandibuloacral dysplasia (MAD)	LMNA (MAD-A) ZMPSTE24 (MAD-B)	p.R527H c.1085_1086insT + p.N265S	HOM (LMNA) Compound HET (ZMPSTE24)	Full-length prelamin A in MAD-B	Growth retardation, craniofacial anomalies, mandibular hypoplasia, osteolysis (clavicle and distal phalanges), pigmentary skin changes, lipodystrophy (normal or increased fat tissue in neck and trunk, loss in tissue from extremities) insulin resistant diabetes mellitus. Overlapping phenotypes described with HGPS	Novelli et al. (2002) Agarwal, Fryns, Auchus and Garg (2003) Ben Yaou et al. (2011)
Lipodystrophy/atrophy syndromes						
Dunnigan-type familial partial lipodystrophy (FPLD2)	LMNA	Hotspot in 482 position: p.R482W/Q/L	HET	Full-length prelamin A	Abnormal subcutaneous adipose tissue distribution: loss of fat from the upper and lower limbs, the gluteal and truncal localization, muscular appearance, accumulation of fat in face and neck (double chin). Insulin-resistance, diabetes mellitus, <i>acanthosis nigricans</i> , hypertriglyceridemia.	Shackleton et al. (2000) Araujo-Vilar et al. (2009)
Acquired partial lipodystrophy (APLD) or Barraquer-Simons syndrome	LMNB2 (<i>predisposing mutations</i>)		HET	–	Lipodystrophy with several subcutaneous fat loss affected regions (neck, arms, chest, face, abdomen), type IV or V dyslipoproteinemia, hypertension, hepatomegaly, hirsutism	Hegele et al. (2006)
Generalized lipoatrophy, insulin-resistant diabetes, disseminated leukodermic papules, liver steatosis, and cardiomyopathy (LIRLLC)	LMNA	p.R133L	HET	–	Hepatic steatosis, hypertriglyceridemia, insulin-resistant diabetes, generalized atrophy of the subcutaneous fat, sunken cheeks, and muscular pseudohypertrophy of the four limbs, thin and atrophic skin on the back of the hands and feet, hyperelasticity, or joint mobility	Caux et al. (2003)
Striated muscle diseases						
Emery–Dreifuss muscular dystrophy type 2 and 3 (EDMD)	LMNA	At least 106 mutations published, the most frequent are p.R249Q, p.R453W	HET or HOM	–	Joint contractures starting in early childhood, slowly progressive muscle weakness (start in humero-peroneal then scapular and pelvic girdle muscles), cardiac manifestations (syncope, arrhythmias, dilated cardiomyopathy, congestive heart failure, etc.). Overlapping phenotypes with FPLD, CMT	Bonne et al. (1999) Raffaële Di Barletta et al. (2000)

(Continues)

TABLE 1 (Continued)

Diseases	Genes	Recurrent mutations	Transmission modes	Prenylated prelamin A	Clinical features	References
Limb-girdle muscular dystrophy type 1B (LGMD1B)	LMNA	At least 51 mutations published, mostly missense	HET	–	Limb-girdle distribution of muscular weakness (starting in the proximal lower limb muscles then upper limb muscles), cardiac manifestations (atrioventricular cardiac conduction disturbances, dilated cardiomyopathy), the absence of early contractures	Muchir et al. (2000)
Dilated cardiomyopathy type 1A (CDM1A)	LMNA	At least 126 mutations published, mostly missense	HET	–	Systolic dysfunction, early conduction defects, arrhythmias, left ventricular dilatation, congestive heart failure, sudden cardiac death. Overlapping phenotypes described with FPLD	Fatkin et al. (1999)
Congenital muscular dystrophy (CMD)	LMNA	At least 23 published mutations, the most frequent are p.R249W, p.E358K	HET	–	Early infancy: dropped head syndrome, muscle axial and cervicoaxial weakness, severe hypotonia, delayed motor development, respiratory insufficiency	Quijano-Roy et al. (2008)
Heart-hand syndrome, Slovenian type	LMNA	c.IVS9-12T>G (c.1609-12T>G)	HET	–	Progressive cardiac conduction defect, tachyarrhythmia, dilated cardiomyopathy, brachydactyly (hand less affected than feet), muscle weakness	Renou et al. (2008)
Peripheral neuropathy						
Charcot-Marie-Tooth disease type 2B1 (CMT2B1)	LMNA	p.R298C	HET	–	Axonal peripheral neuropathy, distal muscle weakness and atrophy, depressed tendon reflexes, mild sensory loss	De Sandre-Giovannoli et al. (2002)
Other diseases						
Adult-onset leukodystrophy (ADLD)	LMNB1	Gene duplication	HET	–	Chronic progressive neurologic disorders: cerebellar, pyramidal, and autonomic abnormalities, symmetrical decreases in white-matter density	Padiath et al. (2006)

Recurrent mutations, transmission modes, prelamin A production, and typical clinical features are described for each laminopathy together with the main references. HET, heterozygous; HOM, homozygous.

by RNA polymerase II as a large primary transcript (>1 kb) called “pri-miRNA.” The pri-miRNA is recognized by the microprocessor complex, which contains DGCR8 and the RNase III enzyme Drosha (Denli, Tops, Plasterk, Ketting & Hannon, 2004; Han et al., 2004). In the nucleus, Drosha cleaves the pri-miRNA into a 70 nt stem-loop precursor called “pre-miRNA” (Lee et al., 2003). The pre-miRNA is then exported to the cytoplasm using exportin 5 and the small Ran GTPase (Bohnsack, Czaplinski & Gorlich, 2004; Yi, Qin, Macara & Cullen, 2003). In the cytoplasm, the pre-miRNA is therefore cleaved by the endonuclease Dicer into a ≈ 25 nt duplex miRNA (Hutvagner et al., 2001). This duplex is bound by the Argonaute protein (AGO) in a complex called “RNA-induced silencing complex” (RISC), which eliminates one strand of the duplex to conserve the guide strand corresponding to the mature ≈ 25 nt miRNA (Kobayashi & Tomari, 2016). This mature miRNA, retained in RISC, recognizes the target transcripts by complementarity to the seed region of the miRNA. This 5' region of the miRNA, corresponding to 2 to 7 nt, is essential to target messenger RNAs (mRNAs), mostly in their 3' untranslated transcript region (3'UTR). More rarely, this targeting could also be localized in the 5'UTR or in the open reading frame (ORF) of mRNAs (Bartel, 2009; Helwak, Kudla, Dudnakova & Tollervey, 2013). The interaction between the miRNA and the target mRNA forms a Watson–Crick pair, resulting in the inhibition of protein synthesis, depending on the pairing of the miRNA and its target. If the pairing is perfect, AGO generates an endonucleolytic cleavage leading to mRNA degradation. If mismatches are present, the mRNA can be deadenylated and then degraded or undergoes translational repression (Jonas & Izaurralde, 2015; Pasquinelli, 2012). Even if miRNAs are mostly described to repress gene expression, miRNAs can also upregulate expression of target genes (Mortensen, Serra, Steitz & Vasudevan, 2011; Oldenburg et al., 2017; Vasudevan, Tong & Steitz, 2007). Moreover, miRNAs can regulate gene expression at the transcriptional level after their nuclear reimportation and hybridization in promoter regions of these genes (Place, Li, Pookot, Noonan & Dahiya, 2008). For these reasons, miRNAs are currently known as powerful regulators of gene expression. One miRNA has the ability to interact with many target mRNAs and to regulate their expression (Gennarino et al., 2012; Helwak et al., 2013; Hendrickson et al., 2009; Tsang, Ebert & van Oudenaarden, 2010). Currently, 64% of the human miRNAs belong to seed families, which correspond to microRNAs sharing the same or a highly similar seed region (Kozomara & Griffiths-Jones, 2011). As the seed region is essential to recognize mRNA, several microRNAs can target the same mRNA and therefore act together to modulate the expression of this mRNA (Guo, Ingolia, Weissman & Bartel, 2010; Hausser & Zavolan, 2014; Hendrickson et al., 2009). Since their discovery, miRNAs have been described in an impressive list of physiological and pathological pathways (Hammond, 2015). For example, miRNAs are central players during development (e.g., neural or cardiac; Abernathy & Yoo, 2015; Porrello, 2013; Reinhart et al., 2000) or immunity (Zhu, Pan & Qian, 2013). They play an important role in all cellular processes, such as cell proliferation (Johnson et al., 2007; Navarro & Lieberman, 2010), differentiation (Navarro & Lieberman, 2010), and apoptosis

(Ghodgaonkar et al., 2009). They have been largely studied in cancer, in which they are described to function as oncogenes or tumor suppressor genes and are grouped under the term “oncomiRs” (Bracken, Scott & Goodall, 2016; Hayes, Peruzzi & Lawler, 2014). Several miRNAs are considered organ/tissue-specific; for example, miR-122 is liver-specific (Lagos-Quintana et al., 2002), and miR-1, miR-206, and miR-133 families are called “myomiRs” (Mok, Lozano-Velasco & Münsterberg, 2017; van Rooij, Liu & Olson, 2008). Moreover, in some cases, miRNAs have been associated with genetic diseases: A mutation of the miR-24 target site in *Slitrk1* leads to Tourette syndrome, whereas a mutation in the seed region of miR-96 leads to autosomal-dominant nonsyndromic hearing loss (Bandiera, Hatem, Lyonnet & Henrion-Caude, 2010). As in all these fields, miRNAs have also been studied in laminopathies. In the next sections, we will present the current knowledge of the different miRNAs linked to laminopathies (Table 2).

3 | MIRNAS IN HEREDITARY LAMINOPATHIES

3.1 | miRNAs in accelerated aging disorders (Figure 1)

In its classical form, Hutchinson–Gilford progeria syndrome (OMIM: #176670) is caused in the vast majority of cases by the *LMNA* c.1824C>T (p.G608G) mutation localized in exon 11. This mutation leads to the activation of a cryptic splicing site in exon 11, leading to the loss of 150 nucleotides with the conservation of the reading frame. The resulting truncated protein, called “progerin,” lacks 50 amino acids compared to lamin A localized on its carboxyl-terminal domain and including the cleavage site of the FACE1/ZMPSTE24 endoprotease (De Sandre-Giovannoli et al., 2003; Eriksson et al., 2003). Consequently, progerin remains farnesylated on the cysteine at the C-terminal end and anchored to membrane bilayers. The protein is still imported into the nucleus as the NLS is not removed or inactivated by the mutation and finally stays anchored to the INM. Progerin accumulation in the *lamina* leads to nuclear shape deformations that are associated with nuclear dysfunctions. Clinically, patients suffer from accelerated aging symptoms, such as skeletal alterations, muscular dystrophy and atrophy, cutaneous changes, and cardiovascular complications, which generally lead to myocardial infarction or stroke (Ullrich & Gordon, 2015). The average lifespan of these patients is 14.6 years. Interestingly, patients with progeria who present a multisystemic disease do not have cognitive deterioration. Fong and colleagues studied the expression of lamins in the brains of various mouse models. They used mice producing only lamin A (*Lmna*^{LAO/LAO} knock-in mice), prelamin A (*Zmpste24*^{-/-} mice that produce prenylated prelamin A but no mature lamin A), and nonfarnesylated progerin (*Lmna*^{nHG/nHG} knock-in mice, which yield exclusively nonfarnesylated progerin from mutant prelamin A transcripts). They demonstrated that lamin A or prelamin A/progerin was dramatically reduced in the brain compared to lamin C (except of course for *Lmna*^{LAO/LAO} knock-in mouse model; Jung et al., 2012).

TABLE 2 Summary of miRNAs studied in *in vitro* or *in vivo* models of laminopathies and other lamin-related models

Laminopathies	microRNAs	Targets	Models	References
	miR-9	LMNA	HeLa cells MEF (<i>Lmna</i> ^{HG/+} , wild-type) <i>Lmna</i> ^{plao-5nt} knock-in mice <i>Lmna</i> ^{plao-utr} knock-in mice Human iPSC and derived cells	Jung et al. (2012) Jung et al. (2014) Nissan et al. (2012)
Progeria and progeroid syndromes	miR-29	<i>Ppm1d</i>	Mouse fibroblasts (<i>Zmpste24</i> ^{-/-} , wild-type)	Ugalde, Español et al. (2011) and Ugalde, Ramsay et al. (2011)
	miR-1	<i>IGF1</i>	Liver tissues from WT and progeroid mice Cultured fibroblasts derived from patients with HGPS	Mariño et al. (2010)
	miR-365	<i>Rasd1</i>	MEF (<i>Zmpste24</i> ^{-/-} , wild-type)	Xiong et al. (2015)
	miR-342-5p	<i>GAS2</i>	MEF (<i>Zmpste24</i> ^{-/-} , wild-type)	Zhang et al. (2017)
	miR-141-3p	ZMPSTE24	hMSC Wild-type mice	Yu et al. (2013)
Lipodystrophy/atrophy syndromes	miR-335	<i>FXR1</i>	FPLD2 fibroblasts Primary adipose stem cells (LMNA p.R482W)	Oldenburg et al. (2017)
	miR-141-3p	ZMPSTE24	Fibroblasts (LMNA p.R482W, p.D47Y, p.R133L) VSMC (LMNA p.R482W, p.D47Y, p.R133L)	Afonso et al. (2016)
	miR-140	NEAT1 (lncRNA)	Primary adipocyte-derived stem cells (miR-140 knock-out mice)	Gernapudi et al. (2016)
Striated muscle diseases	miR-100, miR-192, miR-335	PPP3CA, NFAT5 and <i>Sp1</i>	Muscular biopsies of patients (LMNA p.R60G, p.R294Q, p.R321X, p.R377C)	Sylvius et al. (2011)
	miR-1, miR-130a, miR-133a, miR-133b, miR-146b, miR-151-3p, miR-200a, miR-339-3p		<i>Lmna</i> ^{H222P} knock-in mice	Vignier et al. (2013)
Peripheral neuropathies	/	/	/	/
LMNB1-related diseases	miR-23a	LMNB1, PTEN 2700046G09Rik (lncRNA)	Wild-type mice Mice overexpressing mmu-miR-23 Senescent fibroblasts	Lin et al. (2013) Lin and Fu (2009) Lin et al. (2014) Dreesen et al. (2013)
	miR-31	<i>Cdkn2a</i>	<i>Lmnb1</i> ^{Δ/Δ} MEFs	Malhas et al. (2010)

hMSCs, human mesenchymal stem cells; MEFs, mouse embryonic fibroblasts; iPSCs, induced pluripotent stem cells; HGPS, Hutchinson–Gilford progeria syndrome; FPLD2, Dunnigan-type familial partial lipodystrophy, type 2; VSMCs, vascular smooth muscle cells; lncRNA, long-noncoding RNA.

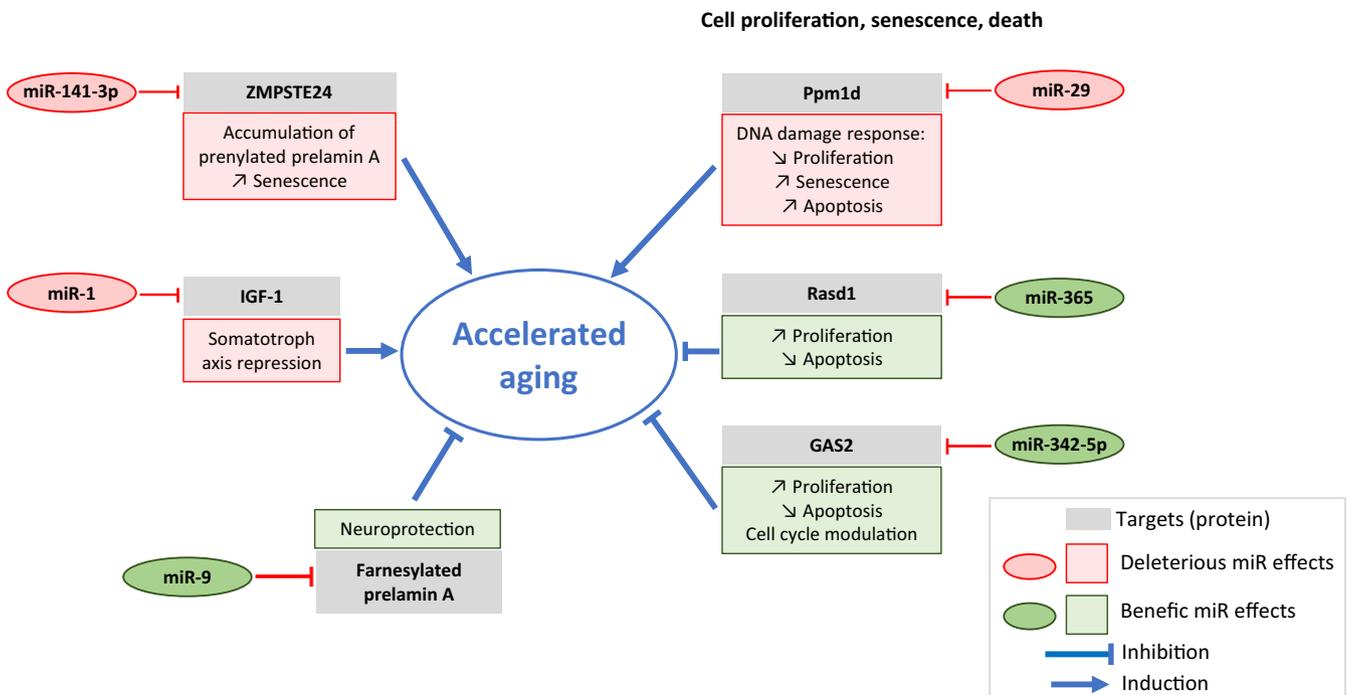


FIGURE 1 MicroRNAs potentially implicated in the pathophysiology of laminopathies associated with accelerated aging. This figure is proposed according to the results obtained on *in vitro* and *in vivo* models of accelerated aging syndromes (Jung et al., 2012, 2014; Mariño et al., 2010; Nissan et al., 2012; Ugalde, Español et al., 2011; Ugalde, Ramsay et al., 2011; Xiong et al., 2015; Yu et al., 2013; Zhang et al., 2017)

They showed that expression of lamin A or its derivatives (prelamin A and progerin) was restricted to vascular and meningeal cells. Indeed, even in *Lmna*^{LAO/LAO} mice, the level of lamin A was extremely low in the brain compared to other organs. They identified a brain-specific miRNA, miR-9, as the major regulator of lamin A expression in this organ. Using different *in vitro* models (HeLa cells, wild-type, and *Lmna*^{HG/+} mouse embryonic fibroblasts transfected with miR-9; Jung et al., 2012), and *in vivo* models, *Lmna*^{plao-5nt} knock-in mice (in which a 5 nt mutation was introduced into the predicted miR-9 binding site of prelamin A 3'UTR) and *Lmna*^{plao-utr} mice (in which prelamin A 3'UTR was replaced by lamin C 3'UTR; Jung et al., 2014), they demonstrated that miR-9 regulates lamin A or prelamin A expression in the central nervous system by directly targeting their common 3'UTR on mRNAs. These results were confirmed by Nissan et al. (2012) using *in vitro* models of neural precursors and neurons of patients with HGPS. They developed an induced pluripotent stem cell (iPSC) model generated from dermal fibroblasts, which they secondarily derived in neural stem cells, telencephalic neurons, and mesenchymal stem cells (MSC-iPSC) as positive controls. In the wild-type context, lamin A was not expressed in neurons. The transfection of pre-miR-9 in MSC-iPSC generated a 66% decrease in lamin A protein, whereas lamin C increased by 50%. In HGPS MSC-iPSC, lamin A and progerin decreased by 35% and 38%, respectively, whereas lamin C increased by 55% after pre-miR-9 transfection. Moreover, the abnormal blebs on nuclei decreased by 48% after transfection of pre-miR-9 in HGPS MSC-iPSC, suggesting a protective effect of miR-9 in neurons of patients with HGPS. They also

confirmed the direct targeting of miR-9 on lamin A 3'UTR using a luciferase reporter assay. Based on this interesting discovery, Fong and colleagues (Jung et al., 2012) hypothesized that an induced ectopic expression of progerin in neurons would lead to neuropathy *in vivo*. They generated the *Lmna*^{HG-C} mouse model, corresponding to the *Lmna*^{HG/+} mouse, for which the 3'UTR binding site of miR-9 in prelamin A transcript was removed. Interestingly, these mice, which produced progerin in the brain as expected, did not develop pathology in the central nervous system. Surprisingly, they developed achalasia, a gastrointestinal pathology characterized by a dilated esophagus and reduced amounts of muscle within the *muscularis externa*. The authors suspected that neurons of the central nervous system were less susceptible to the toxicity of progerin than the gastrointestinal tract (Yang et al., 2015). All these studies demonstrate that miR-9 is a brain-specific miRNA physiologically inhibiting lamin A expression in neurons, which could explain the absence of neuronal disorders in patients with HGPS by preventing progerin accumulation and its associated toxic effects.

Arancio et al. used a bioinformatics approach to perform a competing endogenous RNA analysis (ceRNAs; Arancio, 2012; Arancio, Giordano & Pizzolanti, 2013). This method predicts RNAs that could be concomitantly regulated because they share common miRNA target sequences in their 3'UTR; importantly, wild-type prelamin A and progerin share the same 3'UTR. Using miRWalk database, they identified eleven microRNAs in *Homo sapiens* predicted to target the 3'UTR of the prelamin A transcript: miR-9, miR-34a, miR-214, miR-298, miR-342-5p, miR-449a, miR-532-3p, miR-539, miR-608,

miR-637, and miR-671-5p. As expected, miR-9 belonged to this list. Second, they listed all the predicted RNAs potentially targeted by these 11 miRNAs. They considered RNAs as ceRNAs if they shared at least three target miRNAs with prelamin A mRNA. Seventeen gene transcripts were considered as potential ceRNAs as they are predicted to be co-regulated with prelamin A mRNA. Surprisingly, four belong to the miRNA processing machinery: *DICER1* encoding Dicer, *RNEASEN* encoding Drosha, and *EIF2C1* and *EIF2C2* encoding Argonaute proteins. However, the relationship between these proteins and lamin A needs to be clarified. Interestingly, the authors also described a putative co-regulation of mRNAs involved in the cell cycle (*TP53*, *CDKN1A*, *CDC25A*, and *CDK6*) or inflammation and angiogenesis (*NFKB1*, *IL1B*, and *VEGFA*). Finally, these predictions of ceRNAs must be experimentally confirmed, and their potential roles in HGPS, and more largely in laminopathies, need to be clarified.

Restrictive dermopathy (OMIM: #275210) is another laminopathy associated with accelerated aging features. It could be considered as the most severe laminopathy identified thus far, as it has a neonatal fatal issue, manifesting initially with severe intrauterine growth retardation among other symptoms. This pathology is caused either by dominant *de novo* *LMNA* mutations or more frequently by recessive null (homozygous or compound heterozygous) *ZMPSTE24* mutations. Depending on the implicated mutation, a farnesylated truncated or wild-type full prelamin A accumulates in nuclei (Navarro et al., 2004). The *Zmpste24*-deficient mouse model (*Zmpste24*^{-/-}) presents severe growth retardation and premature death associated with cardiomyopathy, muscular dystrophy, and lipodystrophy (Pendás et al., 2002). In these mice, farnesylated prelamin A accumulates, as expected, but the phenotype corresponds to human HGPS rather than restrictive dermopathy. For this reason, it has long been considered as a good mouse model to study HGPS and associated syndromes linked to prenylated prelamin A accumulation. Even though no miRNA has been formally described in human restrictive dermopathy, several studies have examined miRNAs in the *Zmpste24*^{-/-} mouse model or derived cells *in vitro*. López-Otín and colleagues performed a miRNA expression study on this mouse model and revealed the role of the miR-29 family (miR-29a, miR-29b, miR-29c) in the DNA damage response (Ugalde, Ramsay et al., 2011). These miRNAs were upregulated in the liver and muscle of *Zmpste24*^{-/-} mice and in tissue samples of aged wild-type mice. They demonstrated that miR-29 expression progressively increased *in vitro* during passages in *Zmpste24*^{-/-} mouse fibroblasts and in wild-type mouse fibroblasts, whereas no increase was observed in *p53*^{-/-} mouse fibroblasts. They observed that miR-29 overexpression led to reduced cell proliferation and induction of cell senescence. Using a luciferase reporter assay, they identified the mRNA encoding Ppmd1/Wip1 phosphatase, a key regulator of the DNA damage response that dephosphorylates p53, as a direct target of miR-29. They proposed a model in which increased miR-29 represses Ppmd1, converging in p53 signaling activation. The same team identified miR-1 as a second microRNA upregulated in the *Zmpste24*^{-/-} mouse liver and in cultured fibroblasts of patients with HGPS. They showed that miR-1 repressed insulin-like growth factor-

1 (IGF-1) and contributed to somatotroph axis repression by reducing IGF-1 synthesis (Mariño et al., 2010). Finally, López-Otín and colleagues introduced an elegant definition of “GeromiRs” as miRNAs involved in pathways linked to aging (Ugalde, Español & López-Otín, 2011). Xiong et al. (2015) generated small RNA libraries from wild-type and *Zmpste24*^{-/-} mouse embryonic fibroblasts (MEF). They identified 10 differentially expressed miRNAs, among which three were upregulated and eight downregulated. They focused their attention on two downregulated miRNAs, miR-342-5p and miR-365. Xiong and Zhang teams respectively found that these two miRNAs promoted cell proliferation and decreased cell senescence in *Zmpste24*^{-/-} MEFs transfected with mimics (Xiong et al., 2015; Zhang et al., 2017). Moreover, miR-342-5p overexpression increased G2 + M cell cycle phases. They identified *Rasd1*, a member of the Ras small GTPase superfamily, as the direct target of miR-365. Thus, the downregulation of miR-365 in *Zmpste24*^{-/-} MEFs could lead to the overexpression of *Rasd1*, which has been described as suppressing proliferation and promoting apoptosis (Xiong et al., 2015). Zhang et al. identified *GAS2* as a direct target of miR-342-5p. Interestingly, *GAS2* is a p53-stabilizing protein involved in p53-induced growth inhibition, which is a prerequisite for cellular senescence. The authors concluded that miR-342-5p promotes cell proliferation and the cell cycle by inhibiting *GAS2*. Thus, these studies using the *Zmpste24*^{-/-} mouse model suggest that the four miRNAs (miR-1, the miR-29 family, miR-342-5p, and miR-365) could play a significant role in the pathophysiology of aging diseases linked to an accumulation of prenylated prelamin A, which remains to be confirmed in human cell models.

Atypical Werner syndrome (AWS) is a laminopathy associated with accelerated aging, which differs from the typical Werner syndrome by the causal mutated gene and part of the clinical phenotype. Typical Werner syndrome (OMIM: #277700) is an autosomal-recessive progeroid disorder manifesting in adulthood that is caused by mutations in *WRN* encoding REQL2, a member of the RECQ family of DNA helicases. AWS is an autosomal-dominant disease caused by a heterozygous mutation in *LMNA* (Chen et al., 2003). The initial symptoms of premature aging in AWS begin classically 6 years earlier than in the typical form (e.g., loss of hair, bilateral cataract, and scleroderma-like skin changes). Although AWS shares many common symptoms with the typical form, other symptoms are specific to each form. To date, no miRNA has been formally described as deregulated in AWS. However, in the context of the typical Werner syndrome, Dallaire et al. (2012) reported the downregulation of miR-124 in the liver of a 3-month-old mouse carrying a deletion in the helicase domain of the murine *WRN* homologue (*Wrn*^{Dhel/Dhel}) and in the *C. elegans wrn-1* mutant (Dallaire et al., 2012). They also demonstrated that the loss of miR-124 generated by a deletion of the *miR-124* gene in *C. elegans* increased reactive oxygen species (ROS), reduced ATP production, accelerated the accumulation of lipofuscin (an aging marker), and ultimately reduced the lifespan. As it was also reduced in the liver of aged wild-type mice compared to young mice, they proposed miR-124 downregulation as a common signature in the liver of aging mice.

Conversely, Tang et al. (2016) reported differentially expressed miRNAs in fibroblasts of patients with Werner syndrome compared to controls. Using ingenuity pathway analysis, they identified 18 miRNAs that were linked to 218 target genes that may contribute to Werner syndrome pathophysiology (Tang et al., 2016). It could be interesting to study the role of the best candidates potentially linked to the aging features and evaluate these miRNAs in the context of atypical Werner syndrome.

Finally, several studies have focused on the role of miRNAs during physiological aging, which enter in the field of “geromiRs” as already discussed above. In this context, miRNAs can regulate prelamins A/lamin A expression to influence physiological aging (Yu et al., 2013). Yu et al. studied the role of miR-141-3p, which increases during replicative senescence in human mesenchymal stem cells (hMSCs). They demonstrated *in vitro* that this increase during passages led to a progressive decrease in its direct target FACE1/ZMPSTE24 mRNA, which in turn led to prelamins A accumulation in these cells. Moreover, miR-141-3p overexpression induced senescence in wild-type hMSCs derived from bone marrow and adipose tissue. They also confirmed *in vivo* the decrease in ZMPSTE24 in the liver of wild-type mice after intraperitoneal injection of miR-141-3p lentivirus. They proposed that the increase in miR-141-3p could be due to epigenetic modifications, inducing a decrease in histone deacetylase HDAC2 and HDAC1 expression. Interestingly, miR-141-3p has been implicated in the pathophysiology of Dunnigan-type familial partial lipodystrophy, a laminopathy described as being associated with a prelamins A accumulation (see below).

3.2 | miRNAs in lipodystrophic syndromes

Mutations in *LMNA* also cause adipose tissue pathologies. The autosomal-dominant Dunnigan-type familial partial lipodystrophy (FPLD2, OMIM: #151660) is characterized by an abnormal subcutaneous adipose tissue distribution, with a loss of subcutaneous adipose tissue from the trunk, buttocks, and limbs, and fat accumulation in the neck and face. Metabolic complications, such as diabetes mellitus, insulin resistance, hypertriglyceridemia, premature atherosclerosis, and cardiovascular events, are usually observed (Araújo-Vilar et al., 2009; Shackleton et al., 2000). Oldenburg et al. (2017) identified the promyogenic and antiadipogenic miRNA, miR-335, as upregulated in fibroblasts from FPLD2 patients and primary adipose stem cells (ASCs) carrying the *LMNA* hotspot mutation in this disease, p.R482W. They demonstrated that miR-335 upregulation was caused by epigenetic modifications. Indeed, under basal conditions, they observed a punctual lamin A/C binding to the *MIR335* locus in ASCs from controls. After adipogenic induction, the increase in H3K27 trimethylation coincided with lamin A/C binding to the *MIR335* locus, inducing a repression of miR-335, which allowed adipocyte differentiation. Conversely, in FPLD2 ASCs, lamin A/C mutation prevented binding to the *MIR335* locus under basal conditions and after adipogenic induction. In FPLD2 cells, the acetylation of enhancers favored an increase in miR-335 transcription, and the resulting overexpression of miR-335 prevented the differentiation of ASCs into mature adipocytes.

Therefore, this epigenetic modification could at least in part explain the lipodystrophic phenotype in patients.

As Yu et al. (2013) showed that miR-141-3p decreases ZMPSTE24 expression, resulting in an accumulation of prelamins A during physiological aging (see paragraph above; Yu et al., 2013), and Afonso et al. (2016) studied this phenomenon using lipodystrophic models. They previously demonstrated that the p.R842W *LMNA* mutation induced endothelial dysfunction *in vitro* and early atherosclerosis in FPLD2 patients (Bidault et al., 2013). They confirmed the decrease in ZMPSTE24 in parallel to the increase in prelamins A in two models: (i) fibroblasts of lipodystrophic/lipoatrophic patients carrying a mutation in *LMNA* (p.R482W, p.D47Y, or p.R133L) and (ii) in vascular smooth muscle cells (VSMCs) overexpressing these *LMNA* mutations. The p.R842W mutation is frequently identified in FPLD2 patients. The p.R133L mutation has been identified by Caux et al. (2003) in a “generalized lipoatrophy, associated with insulin-resistant diabetes, disseminated leukodermic papules, liver steatosis, and cardiomyopathy” (LIRLLC). The p.D47Y mutation has been identified in a progeroid syndrome associated with lipodystrophy, dyslipidemia, insulin resistance, and liver steatosis. For these three mutations, the authors found increased ROS production, NF- κ B activation, increased mRNA of several pro-inflammatory cytokines, and decreased anti-inflammatory cytokine IL-13 using VSMC models expressing each mutant. Interestingly, premature senescence has also been demonstrated using a β -galactosidase activity test and p16^{INK4}. miR-141-3p was increased by more than 1.5-fold in VSMCs with p.R482W and p.D47Y *LMNA* mutations, whereas no difference was observed with p.R133L compared to the control. However, even if the ZMPSTE24 protein expression decreased, the mRNA level did not. As Yu et al. (2013) confirmed that ZMPSTE24 mRNA was a direct target of miR-141-3p using a luciferase reporter assay, the results obtained by Afonso et al. (2016) demonstrated that miR-141-3p prevents the translation of ZMPSTE24 mRNA rather than its degradation. Combined, these results indicate that miR-141-3p could be a key factor implicated in FPLD2, explaining at least some of the clinical features of aging in this syndrome, particularly vascular premature senescence and its clinical expression associated with complications.

miRNAs, such as miR-140, can also regulate physiological adipogenesis. Primary adipocyte-derived stem cells from miR-140 knock-out mice lost their adipogenic ability. Furthermore, miR-140 positively regulates the expression of NEAT1, one of the most overexpressed long-noncoding RNAs during adipogenesis, by enhancing its stability in the nucleus. The re-expression of NEAT1 in adipocyte-derived stem cells rescued the adipogenic phenotype (Gernapudi et al., 2016).

3.3 | miRNAs in striated muscle diseases

Several laminopathies affect striated muscles, which include skeletal muscle and/or cardiac muscle. Among them, Emery–Dreifuss muscular dystrophy (EDMD) and limb-girdle muscular dystrophy 1B (LGMD1B) are two dystrophic muscle pathologies presenting with

muscle weakness and wasting and clinically differ in the localization of the affected muscles. They are both associated with dilated cardiomyopathy (Bonne et al., 1999; Muchir et al., 2000; Raffaele Di Barletta et al., 2000). Several types of EDMD laminopathies have been described: an autosomal-dominant form linked to *LMNA* (EDMD2, OMIM #181350), an autosomal-recessive form linked to *LMNA* (EDMD3, OMIM #616516), and an X-linked form due to the *EMD* mutation (EDMD1, OMIM #616516) encoding the nuclear envelope protein emerin, which is a direct partner of lamins. Additionally, three other forms (EDMD 4, 5, and 7) implicate other nuclear envelope proteins (SYNE1, SYNE2, and TMEM43). Another laminopathy called congenital muscular dystrophy (autosomal dominant, OMIM #613205) causes muscle weakness from the first year of life, which could be associated with a “dropped head” syndrome phenotype (Quijano-Roy et al., 2008). Two other laminopathies have a cardiac phenotype. The autosomal-dominant dilated cardiomyopathy 1A linked to *LMNA* (OMIM #115200) is characterized by an isolated cardiac impairment, while the dilated cardiomyopathy is accompanied by a brachydactyly in hands and feet in the autosomal-dominant Slovenian type “Heart-hand” syndrome (OMIM #610140; Fatkin et al., 1999; Renou et al., 2008). Several microRNAs have been described as muscle-specific and to regulate muscle function, such as proliferation, differentiation, or contractility (Agarwal et al., 2008; van Rooij et al., 2008). In skeletal and cardiac muscles, miR-1 and miR-133 regulate cell proliferation and differentiation among other effects. miR-206 promotes skeletal muscle differentiation, and miR-208 plays a role in the regulation of the myosin heavy chain.

Sylvius et al. (2011) performed miRNA expression profiling of muscle biopsies of five patients suffering from skeletal muscle dystrophy and/or cardiac disorders (dilated cardiomyopathy, LGMD1B and EDMD) and carrying an *LMNA* mutation (p.R60G, p.R294Q, p.R321X, or p.R377C) as compared to four healthy controls. Among the 667 miRNAs analyzed, 205 were considered as expressed. The unsupervised hierarchical clustering of these miRNAs allowed the separation between normal and *LMNA* mutated biopsies and identified a miRNA signature. Sixteen miRNAs were upregulated in patients, including eight already described in other studies as upregulated in other muscle or cardiac disorders (Eisenberg et al., 2007; e.g., Duchenne muscular dystrophy and limb-girdle muscular dystrophy types 2A and 2B). The authors focused their attention on miR-100, miR-192, and miR-335, which were also found to be highly expressed in fetal skeletal muscle. In skeletal muscle cells, proliferation and differentiation are mutually exclusive. Using transfection of mimics in C2C12 mouse myoblasts, they demonstrated that the upregulation of miR-100 could be implicated during myoblast differentiation, whereas miR-192 and miR-335 seemed to repress differentiation and induced myoblast proliferation. Therefore, these miRNAs should be considered as integral components of the regulation of muscle development, and their deregulation could thus be implicated in skeletal muscle dystrophy and/or cardiac disorders.

Vignier et al. (2013) searched for miRNA deregulation in the serum of five mouse models of striated muscle pathologies: EDMD, LGMD types 2C and 2D, Duchenne muscular dystrophy, and

hypertrophic cardiomyopathy. Among them, only EDMD was classified as laminopathy (mutations implicated in LGMD2C and 2D concerned gamma-sarcoglycan gene and alpha-sarcoglycan gene, respectively). The EDMD mouse model was a knock-in carrying the p.H222P *LMNA* mutation. The authors performed a first miRNome by screening 517 miRNAs and a second by validating 87 of the miRNAs selected in this first miRNome, including miRNAs known to be expressed in normal and pathological muscle. In the EDMD mouse model, two miRNAs, miR-200a and miR-146b, were upregulated, and six were downregulated (miR-1, miR-130a, miR-133a, miR-133b, miR-151-3p, and miR-339-3p). Concerning miR-200a, deregulation of this miRNA was not specific to the EDMD mouse model, as it was also upregulated in the hypertrophic cardiomyopathy model, whereas it was downregulated in the three other models of muscular dystrophy. Among the six downregulated miRNAs in the EDMD mouse model, miR-1, miR-133a, and miR-133b (three muscle-specific miRNAs; Agarwal et al., 2008; van Rooij et al., 2008) were upregulated in the three muscular dystrophy models linked to the dystrophin-associated protein complex and characterized by massive muscle fiber destruction (Duchenne muscular dystrophy, LGMD2C and 2D). Finally, only miR-130a and miR-339-3p were specifically downregulated in the EDMD mouse model and could therefore be specific biomarkers for this pathology. However, a limitation of this study is that miRNomes were performed using a pool of sera from several mice. Thus, the downregulation of miR-130a and miR-339-3p needs to be confirmed independently in several mice. Moreover, the deregulated miRNAs identified in the sera of EDMD mouse models were different from those identified as deregulated in muscle biopsies from patients with EDMD (Sylvius et al., 2011) and could be linked to other processes not directly related to the muscle pathology.

Koch and Holaska (2012) studied miRNA expression in X-linked Emery–Dreifuss muscular dystrophy, which is caused by mutations in emerin (*EMD*). They performed miRNA expression profiling on emerin-null mouse myogenic progenitor cells compared to wild-type controls. Interestingly, they found an upregulation of miR-100, which was already described by Sylvius et al. (2011), in muscle biopsies of patients suffering from skeletal muscle dystrophy and/or cardiac disorders linked to *LMNA* mutations. Contrarily, miR-192, which was upregulated in Sylvius et al. (2011), was found to be downregulated in this study. Using mRNA profiling, this study on myogenic progenitors derived from emerin-null mice also identified disruptions in the Notch, Wnt, TGF- β , and IGF pathways, but the authors did not link these defects to miRNA deregulation. Thus, it would be interesting to integrate the data (miRNome and transcriptome) in a systems biology approach in the future.

Finally, DICER deletion in the heart leads to dilated cardiomyopathy followed by death in the first days of life (Chen et al., 2008). These data suggest that miRNAs are fundamental for normal cardiac development. miRNA expression has been studied in several congenital heart diseases (e.g., hypoplastic heart syndrome, tetralogy of Fallot, ventricular septal defects, and Holt–Oram syndrome; Hoelscher et al., 2017). However, no study has focused on dilated cardiomyopathy type 1A and “Heart-Hand” syndrome linked to lamins.

3.4 | miRNAs in peripheral neuropathy

Charcot–Marie–Tooth (CMT) disease is an inherited neuromuscular disorder presenting clinical and genetic heterogeneity. The disease is characterized by sensory and motor neuropathies (e.g., muscle weakness, foot deformities, and electrophysiological changes). The autosomal-recessive form of axonal CMT linked to *LMNA* is classified as type 2B1 (OMIM #605588; De Sandre-Giovannoli et al., 2002). No miRNA profiling has been performed in this subtype, which is classified as laminopathy.

Another form of CMT type 2 (CMT2F, OMIM #606595) is due to mutations in *HSPB1*, encoding HspB1, also called Hsp27, which is a small heat shock protein (Houlden et al., 2008). In this form, overexpression of miR-20a and miR-128 has been associated with decreased PDZ-RhoGEF regulating RhoA activity, which could lead to the deregulation of neurite growth (Sun, Zhou, Fink & Mata, 2013).

3.5 | miRNAs in laminopathy affecting LMNB1

Lamins B1 and B2 have been described to play an important role during brain development, especially in neurons (Young, Jung, Coffinier & Fong, 2012). The autosomal-dominant leukodystrophy (ADLD, OMIM #169500) is the only laminopathy currently linked to the gene *LMNB1*, mainly caused by its duplication (Padiath et al., 2006). Clinically, this disease is a progressive degenerative neurological disorder with cerebellar, autonomic, and pyramidal abnormalities. White matter degeneration with severe myelin loss is observed in the brain with the preservation of oligodendroglia. Lamin B1 plays a key role in neuronal migration, as has been shown in different mouse models. It has been evidenced that a lack of lamin B1 expression causes defects in the division of neural progenitor cells, accelerates cell cycle exit, and enhances apoptosis in the cerebral cortex (Lin, Heng, Ptáček & Fu, 2014). Conversely, the overexpression of lamin B1 leads to demyelination and perturbation of the inner nuclear membrane proteins, nuclear pore transport, and chromatin organization in neural cell lines. Therefore, the overexpression of lamin B1 in the mouse brain reproduces the symptoms observed in patients with ADLD.

Lin et al. (2013) provided new mechanisms of lamin B1 regulation, implicating miR-23a (Lin & Fu, 2009; Lin et al., 2013). They first demonstrated that lamin B1 expression was developmentally regulated as the protein decreased in the mouse brain from birth to 300 days of age, while miR-23a levels progressively increased in parallel. They demonstrated that miR-23a directly targets the 3'UTR of lamin B1 and abrogates the adverse effects of lamin B1 on oligodendrocytes. Using a transgenic mouse model overexpressing murine miR-23a (mmu-miR-23a) specifically in oligodendrocytes, they confirmed that miR-23a enhances myelin synthesis. Furthermore, using an RNA-Seq approach on these mice, they demonstrated that in addition to lamin B1, miR-23a also targets *PTEN* and a long-noncoding RNA (lncRNA) called "2700046G09Rik." They proposed a model whereby miR-23a is a central player in the regulation of myelination. Lamin B1 overexpression decreased myelin gene transcription, generated a myelin mislocalization and decreased its production. miR-23a increases

myelination by repressing lamin B1 expression. Furthermore, miR-23a enhances 2700046G09Rik and represses *PTEN* in oligodendroglia, leading to AKT activation, which promotes myelination (Lin et al., 2014). This interesting work conducted by Lin and colleagues raised several issues. As miR-23a seems to play a key role in myelination regulation, it would be interesting to compare the expression of this miRNA in patients with ADLD and healthy subjects. Moreover, this study provides a new potential therapeutic approach for ADLD.

Dreesen et al. (2013) confirmed *in vitro* the role of miR-23a on lamin B1 expression using fibroblasts. They demonstrated that lamin B1 transcripts decreased by ≈ 20 -fold in senescent fibroblasts compared to proliferating fibroblasts, whereas lamin A/C transcripts remained stable. Concomitantly, they found that miR-23a was increased by ≈ 2.5 -fold in the same senescent cells. Finally, the overexpression of miR-23a in fibroblasts did not significantly reduce lamin B1 mRNA levels but decreased the protein expression by $\approx 30\%$, suggesting that miR-23a acts by blocking translation. On the other hand, they developed an interesting theory concerning central nervous system injury in patients with ADLD. They demonstrated that cells presenting decreased lamin A and/or C expression (detected using an antibody against a common epitope) are more susceptible to variations of lamin B1 expression, as an increase in lamin B1 in cells with reduced lamins A and/or C expression led to a proliferative defect, telomeric DNA damage, and increased senescence. Therefore, the brain is more susceptible to B-type fluctuations due to the low expression of lamin A in neurons. This hypothesis could explain why, in ADLD, neurons overexpressing lamin B1 but poorly expressing lamin A due to miR-9 expression (Jung et al., 2012) are more affected than other cell types.

mir-351 has also been described to modulate lamin B1 expression using an F28-7 cell model not related to laminopathy (a clone of mouse mammary carcinoma FM3A). Sato et al. (2016) investigated the molecular mechanisms regulating apoptosis and necrosis. They demonstrated that miR-351 decreased lamin B1 after mimic transfection. However, as lamin B1 is not a validated target of miR-351, an indirect downregulation could not be excluded.

To understand the involvement of the nuclear envelope and *lamina* and more specifically B-type lamins in miRNA regulation, Malhas, Saunders and Vaux (2010) performed microRNA expression profiling in MEFs lacking the C-terminus of lamin B1 (*Lmnb1* ^{Δ/Δ} cells). They found four downregulated and 18 upregulated miRNAs (including miR-351) compared to wild-type MEFs. miR-31 was the most upregulated miRNA. According to previously published data, they concluded that lamin B1 could sequester the Oct-1 transcription factor in wild-type MEFs, leading to a low expression of miR-31. In contrast, the truncation of lamin B1 in *Lmnb1* ^{Δ/Δ} MEFs could lead to an increase in Oct-1, resulting in an increase in miR-31 expression. They identified *Cdkn2a* as a direct target of miR-31. This gene encodes two proteins, p16^{Ink4a} and p19^{Arf}, which are involved in the cell cycle negative regulation. The decrease in these proteins in *Lmnb1* ^{Δ/Δ} MEFs led to rapid progress from G1 to S-phase. Therefore, the truncation at the C-terminus of lamin B1 leads to positive regulation of the cell cycle via the downregulation of p16^{Ink4a} and p19^{Arf} secondary to miR-31

overexpression. Taken together, these studies demonstrate that miRNAs can modulate lamin B1 expression; inversely, the modification of this protein can also impact the expression of miRNAs. These mechanisms could play a significant role in physiological pathways but also in the pathological context of laminopathies.

4 | MIRNAS AND FUTURE PERSPECTIVES IN LAMINOPATHIES

The recent enhanced knowledge of the role of miRNAs in laminopathies has led to a better understanding of their pathophysiology and more largely of the physiological roles of lamins. The best examples are the inhibition of lamin A expression by miR-9 and lamin B1 by miR-23a. Better understanding the roles of miRNAs in laminopathies paves the way to new therapeutic approaches in these rare but also sometimes dramatic diseases (van Rooij & Kauppinen, 2014). The recent example of miR-122, which is the first miRNA targeting approach evaluated with success in a clinical trial (NCT01200420), indicated the possible use of this approach. This liver-specific miRNA recognizes the 5'UTR of the Hepatitis C virus (HCV) genome, which stabilizes the HCV RNA, favoring virus replication. The antagomiR miravirsen[®] is a locked nucleic acid-modified phosphorothioate oligonucleotide targeting miR-122, which has been shown to induce a decrease in HCV RNA levels. To our knowledge, the clinical trial is still in phase 2 (Janssen et al., 2013; van der Ree et al., 2016). Several other therapeutics targeting miRNAs are currently being evaluated, many in the field of cancer, opening new, encouraging therapeutic perspectives, even if limiting factors for the use of these approaches exist.

In HGPS, should we imagine treating patients with miR-9 to repress progerin expression in affected tissues and organs (Harhoury et al., in press)? Several limitations of the use of this potential therapeutic approach shall be taken into consideration. The most important limitation is the low specificity of these small RNA molecules on targets, as one microRNA could inhibit several mRNAs, leading to a high theoretical risk of off-target effects. For example, miR-9 is predicted to target 1377, 545, and 683 mRNAs using TargetScan7.1 (Agarwal, Bell, Nam & Bartel, 2015), miRDB (Wong & Wang, 2015) and PicTar (Krek et al., 2005), respectively; to date, up to 360 validated targets are listed in miRTarBase (Chou et al., 2016). Therefore, it will be imperative to evaluate the off-target effects of this miRNA approach or others, *in silico*, *in vitro* in cell models and *in vivo* in animals before progressing to humans.

5 | CONCLUSION

MicroRNAs have been shown to play crucial roles in physiology and pathologies related to lamins. This class of small noncoding RNAs influences many pathways dysregulated in laminopathies. To date, few studies have focused on miRNAs in these diseases, although the role of these small molecules could be central to their

pathophysiology. Future works on miRNAs in laminopathies could provide new insights into these pathologies and perhaps lead to new therapeutic approaches with the ultimate goal of treating patients.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Aix-Marseille University, A*Midex Foundation (VinTAGE Program) and the Association Française contre les Myopathies (AFM grant TRIM-RD 2016-2020 to NL). This study is part of the FHU A*MIDEX project MARCHE n.ANR-11-IDEX-001-02 funded by the "Investissement d'avenir" French governmental program, managed by the French National Research Agency (ANR).

CONFLICT OF INTEREST

None declared.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

All authors wrote at least a significant part of the review, approved the version to be published, and agreed to be accountable for all aspects of the work.

ORCID

Diane Frankel  <http://orcid.org/0000-0003-3321-6951>

Karim Harhoury  <https://orcid.org/0000-0003-2904-5221>

Annachiara De Sandre-Giovannoli  <https://orcid.org/0000-0002-2324-2462>

Nicolas Lévy  <https://orcid.org/0000-0001-5171-6365>

Elise Kaspi  <https://orcid.org/0000-0003-0458-5109>

Patrice Roll  <https://orcid.org/0000-0002-0045-5641>

REFERENCES

- Abernathy, D. G., & Yoo, A. S. (2015). MicroRNA-dependent genetic networks during neural development. *Cell and Tissue Research*, 359(1), 179–185. <https://doi.org/10.1007/s00441-014-1899-4>.
- Afonso, P., Auclair, M., Boccara, F., Vantghem, M.-C., Katlama, C., Capeau, J., ... Caron-Debarle, M. (2016). LMNA mutations resulting in lipodystrophy and HIV protease inhibitors trigger vascular smooth muscle cell senescence and calcification: Role of ZMPSTE24 down-regulation. *Atherosclerosis*, 245, 200–211. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2015.12.012>.
- Agarwal, V., Bell, G. W., Nam, J.-W., & Bartel, D. P. (2015). Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs. *ELife*, 4, e05005. <https://doi.org/10.7554/eLife.05005>.
- Agarwal, A. K., Fryns, J.-P., Auchus, R. J., & Garg, A. (2003). Zinc metallo-proteinase, ZMPSTE24, is mutated in mandibuloacral dysplasia. *Human Molecular Genetics*, 12(16), 1995–2001.
- Agarwal, A. K., Kazachkova, I., Ten, S., & Garg, A. (2008). Severe mandibuloacral dysplasia-associated lipodystrophy and progeria in a young girl with a novel homozygous Arg527Cys LMNA mutation. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 93(12), 4617–4623. <https://doi.org/10.1210/jc.2008-0123>.

- Arancio, W. (2012). A bioinformatics analysis of Lamin-A regulatory network: A perspective on epigenetic involvement in Hutchinson–Gilford progeria syndrome. *Rejuvenation Research*, 15(2), 123–127. <https://doi.org/10.1089/rej.2011.1250>.
- Arancio, W., Giordano, C., & Pizzolanti, G. (2013). A ceRNA analysis on LMNA gene focusing on the Hutchinson–Gilford progeria syndrome. *Journal of Clinical Bioinformatics*, 3(1), 2. <https://doi.org/10.1186/2043-9113-3-2>.
- Araújo-Vilar, D., Lattanzi, G., González-Méndez, B., Costa-Freitas, A. T., Prieto, D., Columbaro, M., ... Lado-Abeal, J. (2009). Site-dependent differences in both prelamin A and adipogenic genes in subcutaneous adipose tissue of patients with type 2 familial partial lipodystrophy. *Journal of Medical Genetics*, 46(1), 40–48. <https://doi.org/10.1136/jmg.2008.059485>.
- Bandiera, S., Hatem, E., Lyonnet, S., & Henrion-Caude, A. (2010). microRNAs in diseases: From candidate to modifier genes. *Clinical Genetics*, 77(4), 306–313. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.2010.01370.x>.
- Bartel, D. P. (2009). MicroRNA target recognition and regulatory functions. *Cell*, 136(2), 215–233. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.002>.
- Barthélémy, F., Navarro, C., Fayek, R., Da Silva, N., Roll, P., Sigaudy, S., & De Sandre-Giovannoli, A. (2015). Truncated prelamin A expression in HGPS-like patients: A transcriptional study. *European Journal of Human Genetics*: EJHG, 23(8), 1051–1061. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2014.239>.
- Ben Yaou, R., Navarro, C., Quijano-Roy, S., Bertrand, A. T., Massart, C., De Sandre-Giovannoli, A., & Bonne, G. (2011). Type B mandibuloacral dysplasia with congenital myopathy due to homozygous ZMPSTE24 missense mutation. *European Journal of Human Genetics*, 19(6), 647–654. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2010.256>.
- Béréziat, V., Cervera, P., Le Dour, C., Verpont, M.-C., Dumont, S., Vantghem, M.-C., ... Lipodystrophy Study Group (2011) LMNA mutations induce a non-inflammatory fibrosis and a brown fat-like dystrophy of enlarged cervical adipose tissue. *The American Journal of Pathology*, 179(5), 2443–2453. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2011.07.049>
- Bidault, G., Garcia, M., Vantghem, M.-C., Ducluzeau, P.-H., Morichon, R., Thiagarajah, K., ... Béréziat, V. (2013) Lipodystrophy-Linked LMNA p.R482W Mutation Induces Clinical Early Atherosclerosis and *In Vitro* Endothelial Dysfunction Significance. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 33(9), 2162–2171. <https://doi.org/10.1161/atvbaha.113.301933>
- Bohnsack, M. T., Czaplinski, K., Gorlich, D. (2004) Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *RNA (New York, NY)*, 10(2), 185–191.
- Bonne, G., Di Barletta, M. R., Varnous, S., Bécane, H. M., Hammouda, E. H., Merlini, L., ... Schwartz, K. (1999). Mutations in the gene encoding lamin A/C cause autosomal dominant Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Nature Genetics*, 21(3), 285–288. <https://doi.org/10.1038/6799>.
- Bracken, C. P., Scott, H. S., & Goodall, G. J. (2016). A network-biology perspective of microRNA function and dysfunction in cancer. *Nature Reviews Genetics*, 17(12), 719–732. <https://doi.org/10.1038/nrg.2016.134>.
- Caron, M., Auclair, M., Donadille, B., Béréziat, V., Guerci, B., Laville, M., ... Vigouroux, C. (2007). Human lipodystrophies linked to mutations in A-type lamins and to HIV protease inhibitor therapy are both associated with prelamin A accumulation, oxidative stress and premature cellular senescence. *Cell Death and Differentiation*, 14(10), 1759–1767. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4402197>.
- Cau P., Navarro C., Harhour K., Roll P., Sigaudy S., Kaspi E., ... Lévy N. (2014) Nuclear matrix, nuclear envelope and premature aging syndromes in a translational research perspective. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 29(Suppl C), 125–147. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2014.03.021>
- Caux, F., Dubosclard, E., Lascols, O., Buendia, B., Chazouillères, O., Cohen, A., ... Christin-Maitre, S. (2003). A new clinical condition linked to a novel mutation in lamins A and C with generalized lipodystrophy, insulin-resistant diabetes, disseminated leukodermic papules, liver steatosis, and cardiomyopathy. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 88(3), 1006–1013. <https://doi.org/10.1210/jc.2002-021506>.
- Chen, L., Lee, L., Kudlow B. A., Dos Santos, H. G., Sletvold, O., Shafeghati, Y., ... Oshima, J. (2003) LMNA mutations in atypical Werner's syndrome. *Lancet (London, England)*, 362(9382), 440–445. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(03\)14069-x](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(03)14069-x)
- Chen, J.-F., Murchison, E. P., Tang, R., Callis, T. E., Tatsuguchi, M., Deng, Z., ... Wang, D.-Z. (2008). Targeted deletion of Dicer in the heart leads to dilated cardiomyopathy and heart failure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(6), 2111–2116. <https://doi.org/10.1073/pnas.0710228105>.
- Chou, C.-H., Chang, N.-W., Shrestha, S., Hsu, S.-D., Lin, Y.-L., Lee, W.-H., ... Huang, H.-D. (2016). miRTarBase 2016: Updates to the experimentally validated miRNA-target interactions database. *Nucleic Acids Research*, 44(D1), D239–D247. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1258>.
- Coffinier, C., Hudon, S. E., Lee, R., Farber, E. A., Nobumori, C., Miner, J. H., ... Young, S. G. (2008). A potent HIV protease inhibitor, darunavir, does not inhibit ZMPSTE24 or lead to an accumulation of farnesyl-prelamin A in cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(15), 9797–9804. <https://doi.org/10.1074/jbc.M709629200>.
- Dallaire, A., Garand, C., Paquel, E. R., Mitchell, S. J., de Cabo, R., Simard, M. J., & Lebel M. (2012) Down regulation of miR-124 in both Werner syndrome DNA helicase mutant mice and mutant *Caenorhabditis elegans wrn-1* reveals the importance of this microRNA in accelerated aging. *Aging*, 4(9), 636–647. <https://doi.org/10.18632/aging.100489>
- De Sandre-Giovannoli, A., Bernard, R., Cau, P., Navarro, C., Amiel, J., Boccaccio, I., ... Lévy, N. (2003) Lamin a truncation in Hutchinson–Gilford progeria. *Science (New York, NY)*, 300(5628), 2055. <https://doi.org/10.1126/science.1084125>
- De Sandre-Giovannoli, A., Chaouch, M., Kozlov, S., Vallat, J.-M., Tazir, M., Kassouri, N., ... Lévy, N. (2002). Homozygous defects in LMNA, encoding lamin A/C nuclear-envelope proteins, cause autosomal recessive axonal neuropathy in human (Charcot-Marie-Tooth disorder type 2) and mouse. *American Journal of Human Genetics*, 70(3), 726–736. <https://doi.org/10.1086/339274>.
- DeBoy, E., Puttaraju, M., Jailwala, P., Kasoji, M., Cam, M., & Misteli, T. (2017). Identification of novel RNA isoforms of LMNA. *Nucleus*, 8(5), 1–10. <https://doi.org/10.1080/19491034.2017.1348449>.
- Denli, A. M., Tops, B. B. J., Plasterk, R. H. A., Ketting, R. F., & Hannon, G. J. (2004). Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature*, 432(7014), 231–235. <https://doi.org/10.1038/nature03049>.
- Doubaj, Y., De Sandre-Giovannoli, A., Vera, E.-V., Navarro, C. L., Elalaoui, S. C., Tajir, M., ... Sefiani, A. (2012). An inherited LMNA gene mutation in atypical Progeria syndrome. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 158A(11), 2881–2887. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.35557>.
- Dreesen, O., Chojnowski, A., Ong, P. F., Zhao, T. Y., Common, J. E., Lunny, D., ... Colman, A. (2013). Lamin B1 fluctuations have differential effects on cellular proliferation and senescence. *The Journal of Cell Biology*, 200(5), 605–617. <https://doi.org/10.1083/jcb.201206121>.
- Eisenberg, I., Eran, A., Nishino, I., Moggio, M., Lamperti, C., Amato, A. A., ... Kunkel, L. M. (2007). Distinctive patterns of microRNA expression in primary muscular disorders. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(43), 17016–17021. <https://doi.org/10.1073/pnas.0708115104>.
- Elkhatib, R., Longepied, G., Paci, M., Achard, V., Grillo, J.-M., Levy, N., ... Metzler-Guillemain, C. (2015) Nuclear envelope remodelling during human spermiogenesis involves somatic B-type lamins and a

- spermatid-specific B3 lamin isoform. *MHR: Basic Science of Reproductive Medicine*, 21(3), 225–236. <https://doi.org/10.1093/molehr/gau111>
- Eriksson, M., Brown, W. T., Gordon, L. B., Glynn, M. W., Singer, J., Scott, L., ... Collins, F. S. (2003). Recurrent *de novo* point mutations in lamin A cause Hutchinson–Gilford progeria syndrome. *Nature*, 423(6937), 293–298. <https://doi.org/10.1038/nature01629>
- Fatkin, D., MacRae, C., Sasaki, T., Wolff, M. R., Porcu, M., Frenneaux, M., ... McDonough, B. (1999). Missense mutations in the rod domain of the lamin A/C gene as causes of dilated cardiomyopathy and conduction-system disease. *The New England Journal of Medicine*, 341(23), 1715–1724. <https://doi.org/10.1056/NEJM199912023412302>
- Furukawa, K., Inagaki, H., & Hotta, Y. (1994). Identification and cloning of an mRNA coding for a germ cell-specific A-type lamin in mice. *Experimental Cell Research*, 212(2), 426–430. <https://doi.org/10.1006/excr.1994.1164>
- Gennarino, V. A., D'Angelo, G., Dharmalingam, G., Fernandez, S., Russolillo, G., Sanges, R., ... Banfi, S. (2012). Identification of microRNA-regulated gene networks by expression analysis of target genes. *Genome Research*, 22(6), 1163–1172. <https://doi.org/10.1101/gr.130435.111>
- Gernapudi, R., Wolfson, B., Zhang, Y., Yao, Y., Yang, P., Asahara, H., & Zhou, Q. (2016). MicroRNA 140 Promotes Expression of Long Non-coding RNA NEAT1 in Adipogenesis. *Molecular and Cellular Biology*, 36(1), 30–38. <https://doi.org/10.1128/MCB.00702-15>
- Ghodgaonkar, M. M., Shah, R. G., Kandan-Kulangara, F., Affar, E.-B., Qi, H. H., Wiemer, E., & Shah, G. M. (2009). Abrogation of DNA vector-based RNAi during apoptosis in mammalian cells due to caspase-mediated cleavage and inactivation of Dicer-1. *Cell Death and Differentiation*, 16(6), 858–868. <https://doi.org/10.1038/cdd.2009.15>
- Griffiths-Jones, S., Grocock, R. J., van Dongen, S., Bateman, A., & Enright, A. J. (2006). miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic Acids Research*, 34, D140–D144. <https://doi.org/10.1093/nar/gkj112>
- Gruenbaum, Y., & Foisner, R. (2015). Lamins: Nuclear intermediate filament proteins with fundamental functions in nuclear mechanics and genome regulation. *Annual Review of Biochemistry*, 84, 131–164. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060614-034115>
- Guo, H., Ingolia, N. T., Weissman, J. S., & Bartel, D. P. (2010). Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature*, 466(7308), 835–840. <https://doi.org/10.1038/nature09267>
- Hammond, S. M. (2015). An overview of microRNAs. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 87, 3–14. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.05.001>
- Han, J., Lee, Y., Yeom, K.-H., Kim, Y.-K., Jin, H., & Kim, V. N. (2004). The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes & Development*, 18(24), 3016–3027. <https://doi.org/10.1101/gad.1262504>
- Harhour, K., Navarro, C., Baquerre, C., Da Silva, N., Bartoli, C., Casey, F., ... De Sandre-Giovannoli, A. (2016). Antisense-based progerin down-regulation in HGPS-like patients' cells. *Cells*, 5(3), 31. <https://doi.org/10.3390/cells5030031>
- Harhour, K., Frankel, D., Bartoli, C., Roll, P., De Sandre-Giovannoli, A., & Lévy, N. (2018). An overview of treatment strategies for Hutchinson–Gilford Progeria Syndrome. *Nucleus* (in press). <https://doi.org/10.1080/19491034.2018.1460045>
- Hausser, J., & Zavolan, M. (2014). Identification and consequences of miRNA-target interactions—beyond repression of gene expression. *Nature Reviews Genetics*, 15(9), 599–612. <https://doi.org/10.1038/nrg3765>
- Hayes, J., Peruzzi, P. P., & Lawler, S. (2014). MicroRNAs in cancer: Biomarkers, functions and therapy. *Trends in Molecular Medicine*, 20(8), 460–469. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2014.06.005>
- Hegele, R. A., Cao, H., Liu, D. M., Costain, G. A., Charlton-Menys, V., Rodger, N. W., & Durrington, P. N. (2006). Sequencing of the reannotated LMNB2 gene reveals novel mutations in patients with acquired partial lipodystrophy. *American Journal of Human Genetics*, 79(2), 383–389. <https://doi.org/10.1086/505885>
- Helwak, A., Kudla, G., Dudnakova, T., & Tollervey, D. (2013). Mapping the human miRNA interactome by CLASH reveals frequent non-canonical binding. *Cell*, 153(3), 654–665. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.03.043>
- Hendrickson, D. G., Hogan, D. J., McCullough, H. L., Myers, J. W., Herschlag, D., Ferrell, J. E., & Brown, P. O. (2009). Concordant regulation of translation and mRNA abundance for hundreds of targets of a human microRNA. *PLoS Biology*, 7(11), e1000238. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000238>
- Hoelscher, S. C., Doppler, S. A., Dreßen, M., Lahm, H., Lange, R., Krane, M. (2017) MicroRNAs: Pleiotropic players in congenital heart disease and regeneration. *Journal of Thoracic Disease*, 9(Suppl 1), S64–S81. <https://doi.org/10.21037/jtd.2017.03.149>
- Houlden, H., Laura, M., Wavrant-De Vrièze, F., Blake, J., Wood, N., & Reilly, M. M. (2008). Mutations in the HSP27 (HSPB1) gene cause dominant, recessive, and sporadic distal HMN/CMT type 2. *Neurology*, 71(21), 1660–1668. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000319696.14225.67>
- Hsu, P. W. C., Huang, H.-D., Hsu, S.-D., Lin, L.-Z., Tsou, A.-P., Tseng, C.-P., ... Hofacker, I. L. (2006). miRNAMap: Genomic maps of microRNA genes and their target genes in mammalian genomes. *Nucleic Acids Research*, 34, D135–D139. <https://doi.org/10.1093/nar/gkj135>
- Hutvagner, G., McLachlan, J., Pasquinelli, A. E., Bálint, E., Tuschl, T., & Zamore, P. D. (2001). A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science*, 293(5531), 834–838. <https://doi.org/10.1126/science.1062961>
- Janssen, H. L. A., Reesink, H. W., Lawitz, E. J., Zeuzem, S., Rodriguez-Torres, M., Patel, K., ... Hodges, M. R. (2013). Treatment of HCV infection by targeting microRNA. *The New England Journal of Medicine*, 368(18), 1685–1694. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1209026>
- Johnson, C. D., Esquela-Kerscher, A., Stefani, G., Byrom, M., Kelnar, K., Ovcharenko, D., ... Slack, F. J. (2007). The let-7 microRNA represses cell proliferation pathways in human cells. *Cancer Research*, 67(16), 7713–7722. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-1083>
- Jonas, S., & Izaurralde, E. (2015). Towards a molecular understanding of microRNA-mediated gene silencing. *Nature Reviews Genetics*, 16(7), 421–433. <https://doi.org/10.1038/nrg3965>
- Jung, H.-J., Coffinier, C., Choe, Y., Beigneux, A. P., Davies, B. S. J., Yang, S. H., & Fong, L. G. (2012). Regulation of prelamins A but not lamin C by miR-9, a brain-specific microRNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(7), E423–E431. <https://doi.org/10.1073/pnas.1111780109>
- Jung, H.-J., Tu, Y., Yang, S. H., Tatar, A., Nobumori, C., Wu, D., ... Fong, L. G. (2014). New Lmna knock-in mice provide a molecular mechanism for the "segmental aging" in Hutchinson–Gilford progeria syndrome. *Human Molecular Genetics*, 23(6), 1506–1515. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddt537>
- Kobayashi, H., & Tomari, Y. (2016) RISC assembly: Coordination between small RNAs and Argonaute proteins. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*, 1859(1), 71–81. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2015.08.007>
- Koch, A. J., & Holaska, J. M. (2012). Loss of emerin alters myogenic signaling and miRNA expression in mouse myogenic progenitors. *PLoS One*, 7(5), e37262. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037262>
- Kozomara, A., Griffiths-Jones, S. (2011) miRBase: Integrating microRNA annotation and deep-sequencing data. *Nucleic Acids Research*, 39, D152–D157. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq1027>
- Krek, A., Grün, D., Epstein, E. J., da Piedade, I., Gunsalus, K. C., Rosenberg, L., ... Wolf, R. (2005). Combinatorial microRNA target predictions. *Nature Genetics*, 37(5), 495. <https://doi.org/10.1038/ng1536>
- Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Yalcin, A., Meyer, J., Lendeckel, W., & Tuschl, T. (2002). Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Current Biology*, 12(9), 735–739.

- Lee, Y., Ahn, C., Han, J., Choi, H., Kim, J., Yim, J., ... Kim, V. N. (2003). The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*, 425(6956), 415–419. <https://doi.org/10.1038/nature01957>.
- Lee, R. C., Feinbaum, R. L., & Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 75(5), 843–854.
- Lin, S.-T., & Fu, Y.-H. (2009). miR-23 regulation of lamin B1 is crucial for oligodendrocyte development and myelination. *Disease Models & Mechanisms*, 2(3–4), 178–188. <https://doi.org/10.1242/dmm.001065>.
- Lin, S.-T., Heng, M. Y., Ptáček, L. J., & Fu, Y.-H. (2014). Regulation of myelination in the central nervous system by nuclear lamin B1 and non-coding RNAs. *Translational Neurodegeneration*, 3(1), 4. <https://doi.org/10.1186/2047-9158-3-4>.
- Lin, S.-T., Huang, Y., Zhang, L., Heng, M. Y., Ptáček, L. J., & Fu, Y.-H. (2013). MicroRNA-23a promotes myelination in the central nervous system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(43), 17468–17473. <https://doi.org/10.1073/pnas.1317182110>.
- Lin, F., & Worman, H. J. (1993). Structural organization of the human gene encoding nuclear lamin A and nuclear lamin C. *The Journal of Biological Chemistry*, 268(22), 16321–16326.
- Lin, F., & Worman, H. J. (1995). Structural organization of the human gene (LMNB1) encoding nuclear lamin B1. *Genomics*, 27(2), 230–236. <https://doi.org/10.1006/geno.1995.1036>.
- Machiels, B. M., Zorenc, A. H., Endert, J. M., Kuijpers, H. J., van Eys, G. J., Ramaekers, F. C., & Broers, J. L. (1996). An alternative splicing product of the lamin A/C gene lacks exon 10. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(16), 9249–9253.
- Malhas A., Saunders N. J., Vaux D. J. (2010) The nuclear envelope can control gene expression and cell cycle progression via miRNA regulation. *Cell Cycle*, 9(3), 531–539. <https://doi.org/10.4161/cc.9.3.10511>
- Mariño, G., Ugalde, A. P., Fernández, A. F., Osorio, F. G., Fueyo, A., Freije, J. M. P., & López-Otin, C. (2010). Insulin-like growth factor 1 treatment extends longevity in a mouse model of human premature aging by restoring somatotroph axis function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(37), 16268–16273. <https://doi.org/10.1073/pnas.1002696107>.
- Miranda, M., Chacón, M. R., Vidal, F., Megia, A., Richart, C., Veloso, S., ... Vendrell, J. (2007). LMNA messenger RNA expression in highly active antiretroviral therapy-treated HIV-positive patients. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*, 46(4), 384–389.
- Mok, G. F., Lozano-Velasco, E., & Münsterberg, A. (2017). microRNAs in skeletal muscle development. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 72, 67–76. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2017.10.032>
- Mortensen, R. D., Serra, M., Steitz, J. A., & Vasudevan, S. (2011). Post-transcriptional activation of gene expression in *Xenopus laevis* oocytes by microRNA-protein complexes (microRNPs). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(20), 8281–8286. <https://doi.org/10.1073/pnas.1105401108>.
- Moulson, C. L., Fong, L. G., Gardner, J. M., Farber, E. A., Go, G., Pasariello, A., ... Miner, J. H. (2007). Increased progerin expression associated with unusual LMNA mutations causes severe progeroid syndromes. *Human Mutation*, 28(9), 882–889. <https://doi.org/10.1002/humu.20536>.
- Muchir, A., Bonne, G., van der Kooij, A. J., van Meegen, M., Baas, F., Bolhuis, P. A., ... Schwartz, K. (2000). Identification of mutations in the gene encoding lamins A/C in autosomal dominant limb girdle muscular dystrophy with atrioventricular conduction disturbances (LGMD1B). *Human Molecular Genetics*, 9(9), 1453–1459.
- Naetar, N., Ferraioli, S., & Foisner, R. (2017). Lamins in the nuclear interior - life outside the lamina. *Journal of Cell Science*, 130(13), 2087–2096. <https://doi.org/10.1242/jcs.203430>.
- Navarro, C. L., Cadiñanos, J., De Sandre-Giovannoli, A., Bernard, R., Courrier, S., Boccaccio, I., ... Lévy, N. (2005). Loss of ZMPSTE24 (FACE-1) causes autosomal recessive restrictive dermopathy and accumulation of Lamin A precursors. *Human Molecular Genetics*, 14(11), 1503–1513. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddi159>.
- Navarro, C. L., De Sandre-Giovannoli, A., Bernard, R., Boccaccio, I., Boyer, A., Geneviève, D., ... Lévy, N. (2004). Lamin A and ZMPSTE24 (FACE-1) defects cause nuclear disorganization and identify restrictive dermopathy as a lethal neonatal laminopathy. *Human Molecular Genetics*, 13(20), 2493–2503. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddh265>.
- Navarro, F., & Lieberman, J. (2010). Small RNAs guide hematopoietic cell differentiation and function. *The Journal of Immunology*, 184(11), 5939–5947. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0902567>.
- Nissan, X., Blondel, S., Navarro, C., Maury, Y., Denis, C., Girard, M., ... Peschanski, M. (2012). Unique preservation of neural cells in Hutchinson-Gilford progeria syndrome is due to the expression of the neural-specific miR-9 MicroRNA. *Cell Reports*, 2(1), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2012.05.015>.
- Novelli, G., Muchir, A., Sangiulio, F., Helbling-Leclerc, A., D'Apice, M. R., Massart, C., ... Bonne, G. (2002). Mandibuloacral dysplasia is caused by a mutation in LMNA-encoding lamin A/C. *American Journal of Human Genetics*, 71(2), 426–431. <https://doi.org/10.1086/341908>.
- Oldenburg, A., Briand, N., Sørensen, A. L., Cahyani, I., Shah, A., Moskaug, J. Ø., & Collas, P. (2017). A lipodystrophy-causing lamin A mutant alters conformation and epigenetic regulation of the anti-adipogenic MIR335 locus. *The Journal of Cell Biology*, 216(9), 2731–2743. <https://doi.org/10.1083/jcb.201701043>.
- Padiath, Q. S., Saigoh, K., Schiffmann, R., Asahara, H., Yamada, T., Koepfen, A., ... Fu, Y.-H. (2006). Lamin B1 duplications cause autosomal dominant leukodystrophy. *Nature Genetics*, 38(10), 1114–1123. <https://doi.org/10.1038/ng1872>.
- Pasquinelli, A. E. (2012). MicroRNAs and their targets: Recognition, regulation and an emerging reciprocal relationship. *Nature Reviews Genetics*, 13(4), 271–282. <https://doi.org/10.1038/nrg3162>.
- Pendás, A. M., Zhou, Z., Cadiñanos, J., Freije, J. M. P., Wang, J., Hultenby, K., ... López-Otin, C. (2002). Defective prelamin A processing and muscular and adipocyte alterations in Zmpste24 metalloproteinase-deficient mice. *Nature Genetics*, 31(1), 94–99. <https://doi.org/10.1038/ng871>.
- Place, R. F., Li, L.-C., Pookot, D., Noonan, E. J., & Dahiya, R. (2008). MicroRNA-373 induces expression of genes with complementary promoter sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(5), 1608–1613. <https://doi.org/10.1073/pnas.0707594105>.
- Porrello, E. R. (2013) microRNAs in cardiac development and regeneration. *Clinical Science (London, England: 1979)*, 125(4), 151–166. <https://doi.org/10.1042/cs20130011>
- Quijano-Roy, S., Mbieleu, B., Bönnemann, C. G., Jeannot, P.-Y., Colomer, J., Clarke, N. F., ... Estournet, B. (2008). De novo LMNA mutations cause a new form of congenital muscular dystrophy. *Annals of Neurology*, 64(2), 177–186. <https://doi.org/10.1002/ana.21417>.
- Raffaello Di Barletta, M., Ricci, E., Galluzzi, G., Tonali, P., Mora, M., Morandi, L., ... Toniolo, D. (2000). Different mutations in the LMNA gene cause autosomal dominant and autosomal recessive Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *American Journal of Human Genetics*, 66(4), 1407–1412. <https://doi.org/10.1086/302869>.
- Reinhart, B. J., Slack, F. J., Basson, M., Pasquinelli, A. E., Bettinger, J. C., Rougvie, A. E., ... Ruvkun, G. (2000). The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 403(6772), 901–906. <https://doi.org/10.1038/35002607>.
- Renard, D., Fourcade, G., Milhaud, D., Bessis, D., Esteves-Vieira, V., Boyer, A., ... De Sandre-Giovannoli, A. (2009). Novel LMNA mutation in atypical Werner syndrome presenting with ischemic disease. *Stroke*, 40(2), e11–e14. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.108.531780>.
- Renou, L., Stora, S., Yaou, R. B., Volk, M., Sinkovec, M., Demay, L., ... Bonne, G. (2008). Heart-hand syndrome of Slovenian type: A new

- kind of laminopathy. *Journal of Medical Genetics*, 45(10), 666–671. <https://doi.org/10.1136/jmg.2008.060020>.
- Rodriguez, A., Griffiths-Jones, S., Ashurst, J. L., & Bradley, A. (2004). Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Research*, 14(10A), 1902–1910. <https://doi.org/10.1101/gr.2722704>.
- Sato, A., Omi, T., Yamamoto, A., Satake, A., Hiramoto, A., Masutani, M., & Kim, H.-S. (2016). MicroRNA-351 regulates two-types of cell death, necrosis and apoptosis, induced by 5-fluoro-2'-deoxyuridine. *PLoS One*, 11(4), e0153130. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0153130>.
- Schreiber, K. H., & Kennedy, B. K. (2013). When lamins go bad: Nuclear structure and disease. *Cell*, 152(6), 1365–1375. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.02.015>.
- Shackleton, S., Lloyd, D. J., Jackson, S. N., Evans, R., Niermeijer, M. F., Singh, B. M., & Trembath, R. C. (2000). LMNA, encoding lamin A/C, is mutated in partial lipodystrophy. *Nature Genetics*, 24(2), 153–156. <https://doi.org/10.1038/72807>.
- Sun, X., Zhou, Z., Fink, D. J., & Mata, M. (2013). HspB1 silences translation of PDZ-RhoGEF by enhancing miR-20a and miR-128 expression to promote neurite extension. *Molecular and Cellular Neurosciences*, 57, 111–119. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2013.10.006>.
- Sylvius, N., Bonne, G., Straatman, K., Reddy, T., Gant, T. W., & Shackleton, S. (2011). MicroRNA expression profiling in patients with lamin A/C-associated muscular dystrophy. *FASEB Journal*, 25(11), 3966–3978. <https://doi.org/10.1096/fj.11-182915>.
- Tang, W., Robles, A. I., Beyer, R. P., Gray, L. T., Nguyen, G. H., Oshima, J., ... Monnat, R. J. (2016). The Werner syndrome RECQ helicase targets G4 DNA in human cells to modulate transcription. *Human Molecular Genetics*, 25(10), 2060–2069. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddw079>.
- Tsang, J. S., Ebert, M. S., & van Oudenaarden, A. (2010). Genome-wide dissection of microRNA functions and cotargeting networks using gene set signatures. *Molecular Cell*, 38(1), 140–153. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.03.007>.
- Turgay, Y., Eibauer, M., Goldman, A. E., Shimi, T., Khayat, M., Ben-Harush, K., ... Medalia, O. (2017). The molecular architecture of lamins in somatic cells. *Nature*, 543(7644), 261–264. <https://doi.org/10.1038/nature21382>.
- Ugalde, A. P., Español, Y., López-Otín, C. (2011) Micromanaging aging with miRNAs: New messages from the nuclear envelope. *Nucleus*, 2(6), 549–555. <https://doi.org/10.4161/nucl.2.6.17986>
- Ugalde, A. P., Ramsay, A. J., de la Rosa, J., Varela, I., Mariño, G., Cadiñanos, J., ... López-Otín, C. (2011). Aging and chronic DNA damage response activate a regulatory pathway involving miR-29 and p53. *The EMBO Journal*, 30(11), 2219–2232. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.124>.
- Ullrich, N. J., & Gordon, L. B. (2015). Hutchinson–Gilford progeria syndrome. *Handbook of Clinical Neurology*, 132, 249–264. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-62702-5.00018-4>.
- Unglicht, R., & Kutay, U. (2017). Mechanisms and functions of nuclear envelope remodelling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 18(4), 229–245. <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.153>.
- van der Ree, M. H., van der Meer, A. J., van Nuenen, A. C., de Bruijne, J., Ottosen, S., Janssen, H. L., & Reesink, H. W. (2016). Miravirsin dosing in chronic hepatitis C patients results in decreased microRNA-122 levels without affecting other microRNAs in plasma. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 43(1), 102–113. <https://doi.org/10.1111/apt.13432>.
- van Rooij, E., & Kauppinen, S. (2014) Development of microRNA therapeutics is coming of age. *EMBO Molecular Medicine*, 6(7), 851–864. <https://doi.org/10.15252/emmm.201100899>
- van Rooij, E., Liu, N., & Olson, E. N. (2008). MicroRNAs flex their muscles. *Trends in Genetics*, 24(4), 159–166. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2008.01.007>.
- van Steensel, B., & Belmont, A. S. (2017). Lamina-associated domains: Links with chromosome architecture, heterochromatin, and gene repression. *Cell*, 169(5), 780–791. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.04.022>.
- Vasudevan, S., Tong, Y., & Steitz, J. A. (2007). Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science*, 318(5858), 1931–1934. <https://doi.org/10.1126/science.1149460>.
- Verstraeten, V. L. R. M., Broers, J. L. V., van Steensel, M. A. M., Zinn-Justin, S., Ramaekers, F. C. S., Steijlen, P. M., ... van den Wijngaard, A. (2006). Compound heterozygosity for mutations in LMNA causes a progeria syndrome without prelamin A accumulation. *Human Molecular Genetics*, 15(16), 2509–2522. <https://doi.org/10.1093/hmg/dd1172>.
- Vignier, N., Amor, F., Fogel, P., Duvallet, A., Poupiot, J., Charrier, S., ... Israeli, D. (2013). Distinctive serum miRNA profile in mouse models of striated muscular pathologies. *PLoS One*, 8(2), e55281. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0055281>.
- Wong, N., & Wang, X. (2015). miRDB: An online resource for microRNA target prediction and functional annotations. *Nucleic Acids Research*, 43(D1), D146–D152. <https://doi.org/10.1093/nar/gku1104>.
- Worman, H. J. (2012). Nuclear lamins and laminopathies. *The Journal of Pathology*, 226(2), 316–325. <https://doi.org/10.1002/path.2999>.
- Worman, H. J., & Bonne, G. (2007). “Laminopathies”: A wide spectrum of human diseases. *Experimental Cell Research*, 313(10), 2121–2133. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2007.03.028>.
- Xiong, X., Jung, H. J., Gombar, S., Park, J. Y., Zhang, C., Zheng, H., ... Suh, Y. (2015). MicroRNA transcriptome analysis identifies miR-365 as a novel negative regulator of cell proliferation in Zmpste24-deficient mouse embryonic fibroblasts. *Mutation Research*, 777, 69–78. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2015.04.010>.
- Yang, S. H., Procaccia, S., Jung, H.-J., Nobumori, C., Tatar, A., Tu, Y., ... Young, S. G. (2015). Mice that express farnesylated versions of prelamin A in neurons develop achalasia. *Human Molecular Genetics*, 24(10), 2826–2840. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddv043>.
- Yi, R., Qin, Y., Macara, I. G., & Cullen, B. R. (2003). Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes & Development*, 17(24), 3011–3016. <https://doi.org/10.1101/gad.1158803>.
- Young, S. G., Jung, H.-J., Coffinier, C., & Fong, L. G. (2012). Understanding the roles of nuclear A- and B-type lamins in brain development. *Journal of Biological Chemistry*, 287(20), 16103–16110. <https://doi.org/10.1074/jbc.R112.354407>.
- Yu, K.-R., Lee, S., Jung, J.-W., Hong, I.-S., Kim, H.-S., Seo, Y., ... Kang, K.-S. (2013). MicroRNA-141-3p plays a role in human mesenchymal stem cell aging by directly targeting ZMPSTE24. *Journal of Cell Science*, 126(Pt 23), 5422–5431. <https://doi.org/10.1242/jcs.133314>.
- Zhang, C.-L., Liu, X., He, Q.-J., Zheng, H., Xu, S., Xiong, X.-D., ... Deng, S. (2017). miR-342-5p promotes Zmpste24-deficient mouse embryonic fibroblasts proliferation by suppressing GAS2. *Molecular Medicine Reports*, 16, 8944–8952.
- Zhu S., Pan W., & Qian Y. (2013) MicroRNA in immunity and autoimmunity. *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)*, 91(9), 1039–1050. <https://doi.org/10.1007/s00109-013-1043-z>

How to cite this article: Frankel D, Delecourt V, Harhoury K, et al. MicroRNAs in hereditary and sporadic premature aging syndromes and other laminopathies. *Aging Cell*. 2018;17:e12766. <https://doi.org/10.1111/acer.12766>

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abdelfattah, A.M., Park, C., and Choi, M.Y. (2014). Update on non-canonical microRNAs. *Biomolecular Concepts* 5.
- Abel, Y., Clerget, G., Bourguignon-Igel, V., Salone, V., and Rederstorff, M. (2014). Les petits ARN nucléolaires nous surprennent encore ! *Med Sci (Paris)* 30, 297–302.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Walter, P. (2002). *Molecular biology of the cell* (New York, NY: Garland Science, Taylor & Francis Group).
- Aliper, A.M., Csoka, A.B., Buzdin, A., Jetka, T., Roumiantsev, S., Moskalev, A., and Zhavoronkov, A. (2015). Signaling pathway activation drift during aging: Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome fibroblasts are comparable to normal middle-age and old-age cells. *Aging (Albany NY)* 7, 26–37.
- Annunziata, M., Granata, R., and Ghigo, E. (2011). The IGF system. *Acta Diabetologica* 48, 1–9.
- Arancio, W., Pizzolanti, G., Genovese, S.I., Pitrone, M., and Giordano, C. (2014). Epigenetic Involvement in Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome: A Mini-Review. *Gerontology* 60, 197–203.
- Au Yeung, C.L., Co, N.-N., Tsuruga, T., Yeung, T.-L., Kwan, S.-Y., Leung, C.S., Li, Y., Lu, E.S., Kwan, K., Wong, K.-K., et al. (2016). Exosomal transfer of stroma-derived miR21 confers paclitaxel resistance in ovarian cancer cells through targeting APAF1. *Nat Commun* 7, 11150.
- Bank, E.M., Ben-Harush, K., Feinstein, N., Medalia, O., and Gruenbaum, Y. (2012). Structural and physiological phenotypes of disease-linked lamin mutations in *C. elegans*. *Journal of Structural Biology* 177, 106–112.
- Bardin, P., Sonnevile, F., Corvol, H., and Tabary, O. (2018). Emerging microRNA Therapeutic Approaches for Cystic Fibrosis. *Front Pharmacol* 9, 1113.
- Bartel, D.P. (2018). Metazoan MicroRNAs. *Cell* 173, 20–51.
- Barthélémy, F., Navarro, C., Fayek, R., Da Silva, N., Roll, P., Sigaudy, S., Oshima, J., Bonne, G., Papadopoulou-Legbelou, K., Evangelidou, A.E., et al. (2015). Truncated prelamin A expression in HGPS-like patients: a transcriptional study. *Eur J Hum Genet* 23, 1051–1061.
- Baulande, S., Criqui, A., and Duthieuw, M. (2014). Les microARN circulants, une nouvelle classe de biomarqueurs pour la médecine. *Médecine/Sciences* 30, 289–296.
- Bell, E.S., and Lammerding, J. (2016). Causes and consequences of nuclear envelope alterations in tumour progression. *Eur. J. Cell Biol.* 95, 449–464.
- Ben-Porath, I., and Weinberg, R.A. (2005). The signals and pathways activating cellular senescence. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 37, 961–976.
- Bergo, M.O., Gavino, B., Ross, J., Schmidt, W.K., Hong, C., Kendall, L.V., Mohr, A., Meta, M., Genant, H., Jiang, Y., et al. (2002). Zmpste24 deficiency in mice causes spontaneous bone fractures, muscle weakness, and a prelamin A processing defect. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99, 13049–13054.
- Beyret, E., Liao, H.-K., Yamamoto, M., Hernandez-Benitez, R., Fu, Y., Erikson, G., Reddy, P., and Izpisua Belmonte, J.C. (2019). Single-dose CRISPR–Cas9 therapy extends lifespan of mice with Hutchinson–Gilford progeria syndrome. *Nature Medicine*.

- Biamonti, G., Giacca, M., Perini, G., Contreas, G., Zentilin, L., Weighardt, F., Guerra, M., Della Valle, G., Saccone, S., and Riva, S. (1992). The gene for a novel human lamin maps at a highly transcribed locus of chromosome 19 which replicates at the onset of S-phase. *Mol. Cell. Biol.* *12*, 3499–3506.
- Birch, J., Barnes, P.J., and Passos, J.F. (2018). Mitochondria, telomeres and cell senescence: Implications for lung ageing and disease. *Pharmacology & Therapeutics* *183*, 34–49.
- Bird, T.D. (1993). Charcot-Marie-Tooth Neuropathy Type 2. In *GeneReviews*[®], M.P. Adam, H.H. Ardinger, R.A. Pagon, S.E. Wallace, L.J. Bean, K. Stephens, and A. Amemiya, eds. (Seattle (WA): University of Washington, Seattle), p.
- Bischof, O., Dejean, A., and Pineau, P. (2009). Une re-vue de la sénescence cellulaire: Ami ou ennemi de la promotion tumorale ? *Médecine/Sciences* *25*, 153–160.
- Blondel, S., Egesipe, A.-L., Picardi, P., Jaskowiak, A.-L., Notarnicola, M., Ragot, J., Tournois, J., Le Corf, A., Brinon, B., Poydenot, P., et al. (2016). Drug screening on Hutchinson Gilford progeria pluripotent stem cells reveals aminopyrimidines as new modulators of farnesylation. *Cell Death Dis* *7*, e2105.
- Bogerd, H.P., Karnowski, H.W., Cai, X., Shin, J., Pohlers, M., and Cullen, B.R. (2010). A Mammalian Herpesvirus Uses Noncanonical Expression and Processing Mechanisms to Generate Viral MicroRNAs. *Molecular Cell* *37*, 135–142.
- Bonne, G., Leturcq, F., and Ben Yaou, R. (1993). Emery-Dreifuss Muscular Dystrophy. In *GeneReviews*[®], M.P. Adam, H.H. Ardinger, R.A. Pagon, S.E. Wallace, L.J. Bean, K. Stephens, and A. Amemiya, eds. (Seattle (WA): University of Washington, Seattle), p.
- Bratc, A., and Larsson, N.-G. (2013). The role of mitochondria in aging. *Journal of Clinical Investigation* *123*, 951–957.
- Bret, C., and Schved, J.F. (2009). Le contrôle de l'expression des gènes par les microARN. *Correspondances En Onco-Hématologie IV*, 15–19.
- Broers, J.L.V., Peeters, E.A.G., Kuijpers, H.J.H., Endert, J., Bouten, C.V.C., Oomens, C.W.J., Baaijens, F.P.T., and Ramaekers, F.C.S. (2004). Decreased mechanical stiffness in LMNA-/- cells is caused by defective nucleo-cytoskeletal integrity: implications for the development of laminopathies. *Human Molecular Genetics* *13*, 2567–2580.
- Broers, J.L.V., Ramaekers, F.C.S., Bonne, G., Yaou, R.B., and Hutchison, C.J. (2006). Nuclear Lamins: Laminopathies and Their Role in Premature Ageing. *Physiological Reviews* *86*, 967–1008.
- Brondello, J.-M., Prieur, A., Philipot, D., Lemaitre, J.-M., Lenaers, G., Piette, J., and Dulić, V. (2012). La sénescence cellulaire: Un nouveau mythe de Janus ? *Médecine/Sciences* *28*, 288–296.
- Bu, H., Baraldo, G., Lepperdinger, G., and Jansen-Dürr, P. (2016). mir-24 activity propagates stress-induced senescence by down regulating DNA topoisomerase 1. *Experimental Gerontology* *75*, 48–52.
- Bu, H., Wedel, S., Cavinato, M., and Jansen-Dürr, P. (2017). MicroRNA Regulation of Oxidative Stress-Induced Cellular Senescence. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* *2017*, 1–12.
- Burke, B., and Stewart, C.L. (2013). The nuclear lamins: flexibility in function. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* *14*, 13–24.

- Burton, D.G.A., Sheerin, A.N., Ostler, E.L., Smith, K., Giles, P.J., Lowe, J., Rhys-Williams, W., Kipling, D.G., and Faragher, R.G.A. (2007). Cyclin D1 Overexpression Permits the Reproducible Detection of Senescent Human Vascular Smooth Muscle Cells. *Annals of the New York Academy of Sciences* *1119*, 20–31.
- Busch, A., Kiel, T., Heupel, W.-M., Wehnert, M., and Hübner, S. (2009). Nuclear protein import is reduced in cells expressing nuclear envelopathy-causing lamin A mutants. *Experimental Cell Research* *315*, 2373–2385.
- Campisi, J. (2013). Aging, Cellular Senescence, and Cancer. *Annual Review of Physiology* *75*, 685–705.
- Cao, K., Blair, C.D., Faddah, D.A., Kieckhafer, J.E., Olive, M., Erdos, M.R., Nabel, E.G., and Collins, F.S. (2011a). Progerin and telomere dysfunction collaborate to trigger cellular senescence in normal human fibroblasts. *Journal of Clinical Investigation* *121*, 2833–2844.
- Cao, K., Graziotto, J.J., Blair, C.D., Mazzulli, J.R., Erdos, M.R., Krainc, D., and Collins, F.S. (2011b). Rapamycin Reverses Cellular Phenotypes and Enhances Mutant Protein Clearance in Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome Cells. *Science Translational Medicine* *3*, 89ra58-89ra58.
- Capell, B.C., Tloutan, B.E., and Orlow, S.J. (2009). From the Rarest to the Most Common: Insights from Progeroid Syndromes into Skin Cancer and Aging. *Journal of Investigative Dermatology* *129*, 2340–2350.
- Captur, G., Arbustini, E., Bonne, G., Syrris, P., Mills, K., Wahbi, K., Mohiddin, S.A., McKenna, W.J., Pettit, S., Ho, C.Y., et al. (2018). Lamin and the heart. *Heart* *104*, 468–479.
- Carassou, P., Meijer, L., Moulec, S.L., Aoun, J., and Bengrine-Lefèvre, L. (2012). Cell cycle and molecular targets: CDK inhibition. *Bulletin du Cancer* 163–171.
- Caravia, X.M., and López-Otín, C. (2015). Regulatory Roles of miRNAs in Aging. In *MicroRNA: Basic Science*, G. Santulli, ed. (Cham: Springer International Publishing), pp. 213–230.
- Caravia, X.M., Roiz-Valle, D., Morán-Álvarez, A., and López-Otín, C. (2017). Functional relevance of miRNAs in premature ageing. *Mechanisms of Ageing and Development* *168*, 10–19.
- Carrero, D., Soria-Valles, C., and López-Otín, C. (2016). Hallmarks of progeroid syndromes: lessons from mice and reprogrammed cells. *Disease Models & Mechanisms* *9*, 719–735.
- Cartier, F., Indersie, E., Lesjean, S., Charpentier, J., Hooks, K.B., Ghousein, A., Desplat, A., Dugot-Senant, N., Trézéguet, V., Sagliocco, F., et al. (2017). New tumor suppressor microRNAs target glypican-3 in human liver cancer. *Oncotarget* *8*.
- Cau, P., and Seïte, R. (2012). *Cours de Biologie Cellulaire UE 2 (Ellipses)*.
- Chang, L.-L., Hsu, W.-H., Kao, M.-C., Chou, C.-C., Lin, C.-C., Liu, C.-J., Weng, B.-C., Kuo, F.-C., Kuo, C.-H., Lin, M.-H., et al. (2018). Stromal C-type lectin receptor COLEC12 integrates H. pylori, PGE2-EP2/4 axis and innate immunity in gastric diseases. *Sci Rep* *8*, 3821.
- Château, M.-T., Araiz, C., Descamps, S., and Galas, S. (2010). Klotho interferes with a novel FGF-signalling pathway and insulin/Igf-like signalling to improve longevity and stress resistance in *Caenorhabditis elegans*. *Aging* *2*, 567–581.

- Chen, J. (2016). The Cell-Cycle Arrest and Apoptotic Functions of p53 in Tumor Initiation and Progression. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 6, a026104.
- Chen, L., Liu, J., Tao, X., Wang, G., Wang, Q., and Liu, X. (2015). The role of Pin1 protein in aging of human tendon stem/progenitor cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 464, 487–492.
- Choi, J.Y., Lai, J.K., Xiong, Z.-M., Ren, M., Moorer, M.C., Stains, J.P., and Cao, K. (2018). Diminished Canonical β -Catenin Signaling During Osteoblast Differentiation Contributes to Osteopenia in Progeria: CANONICAL WNT/ β -CATENIN DEFECTS CONTRIBUTE TO OSTEOGENESIS IN HGPS. *J Bone Miner Res* 33, 2059–2070.
- Clevers, H. (2006). Wnt/ β -Catenin Signaling in Development and Disease. *Cell* 127, 469–480.
- Cooper, G.M. (2000). *The cell: a molecular approach* (Washington, DC: ASM Press [u.a.]).
- Coppé, J.-P., Desprez, P.-Y., Krtolica, A., and Campisi, J. (2010). The Senescence-Associated Secretory Phenotype: The Dark Side of Tumor Suppression. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* 5, 99–118.
- Corne, T.D.J., Sieprath, T., Vandenbussche, J., Mohammed, D., Te Lindert, M., Gevaert, K., Gabriele, S., Wolf, K., and De Vos, W.H. (2017). Deregulation of focal adhesion formation and cytoskeletal tension due to loss of A-type lamins. *Cell Adh Migr* 11, 447–463.
- Correia-Melo, C., and Passos, J.F. (2015). Mitochondria: Are they causal players in cellular senescence? *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1847, 1373–1379.
- Creemers, E.E., Tijssen, A.J., and Pinto, Y.M. (2012). Circulating MicroRNAs: Novel Biomarkers and Extracellular Communicators in Cardiovascular Disease? *Circulation Research* 110, 483–495.
- Dambal, S., Shah, M., Mihelich, B., and Nonn, L. (2015). The microRNA-183 cluster: the family that plays together stays together. *Nucleic Acids Research* 43, 7173–7188.
- Das-Bradoo, S., and Bielinsky, A. (2010). DNA Replication and Checkpoint Control in S Phase. *Nature Education* 3, 50.
- DeBusk, F.L. (1972). The Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *The Journal of PEDIATRICS* 80, 697–724.
- Dechat, T., Pflieger, K., Sengupta, K., Shimi, T., Shumaker, D.K., Solimando, L., and Goldman, R.D. (2008). Nuclear lamins: major factors in the structural organization and function of the nucleus and chromatin. *Genes & Development* 22, 832–853.
- Dechat, T., Adam, S.A., Taimen, P., Shimi, T., and Goldman, R.D. (2010). Nuclear Lamins. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2, a000547–a000547.
- Denzel, M.S., Lapierre, L.R., and Mack, H.I.D. (2019). Emerging topics in *C. elegans* aging research: Transcriptional regulation, stress response and epigenetics. *Mechanisms of Ageing and Development* 177, 4–21.
- Dittmer, T.A., and Misteli, T. (2011). The lamin protein family. *Genome Biology* 12, 222.

- Donehower, L.A., Harvey, M., Slagle, B.L., McArthur, M.J., Montgomery, C.A., Butel, J.S., and Bradley, A. (1992). Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature* *356*, 215–221.
- Dong, W., Guan, F., Zhang, X., Gao, S., Liu, N., Chen, W., Zhang, L., and Lu, D. (2018). Dhcr24 activates the PI3K/Akt/HKII pathway and protects against dilated cardiomyopathy in mice. *Anim Models Exp Med* *1*, 40–52.
- Dworak, N., Makosa, D., Chatterjee, M., Jividen, K., Yang, C.-S., Snow, C., Simke, W.C., Johnson, I.G., Kelley, J.B., and Paschal, B.M. (2019). A nuclear lamina-chromatin-Ran GTPase axis modulates nuclear import and DNA damage signaling. *Aging Cell* *18*, e12851.
- Egesipe, A.-L., Blondel, S., Cicero, A.L., Jaskowiak, A.-L., Navarro, C., Sandre-Giovannoli, A.D., Levy, N., Peschanski, M., and Nissan, X. (2016). Metformin decreases progerin expression and alleviates pathological defects of Hutchinson–Gilford progeria syndrome cells. *Npj Aging Mech Dis* *2*, 16026.
- Elkhatib, R., Longepied, G., Paci, M., Achard, V., Grillo, J.-M., Levy, N., Mitchell, M.J., and Metzler-Guillemain, C. (2015). Nuclear envelope remodelling during human spermiogenesis involves somatic B-type lamins and a spermatid-specific B3 lamin isoform. *MHR: Basic Science of Reproductive Medicine* *21*, 225–236.
- EL-MURR, N. (2014). Etude de l'Impact des MicroARNs sur la Carcinogénèse des Cancers Colorectaux Instables sur les Séquences Répétées Microsatellites du Génome. Thèse de doctorat de Génétique et Epigénétique des Cancers. Université Pierre et Marie Curie.
- Erbes, T., Hirschfeld, M., Rücker, G., Jaeger, M., Boas, J., Iborra, S., Mayer, S., Gitsch, G., and Stickeler, E. (2015). Feasibility of urinary microRNA detection in breast cancer patients and its potential as an innovative non-invasive biomarker. *BMC Cancer* *15*, 193.
- Espada, J., Varela, I., Flores, I., Ugalde, A.P., Cadiñanos, J., Pendás, A.M., Stewart, C.L., Tryggvason, K., Blasco, M.A., Freije, J.M.P., et al. (2008). Nuclear envelope defects cause stem cell dysfunction in premature-aging mice. *The Journal of Cell Biology* *181*, 27–35.
- Fenn, A.M., Smith, K.M., Lovett-Racke, A.E., Guerau-de-Arellano, M., Whitacre, C.C., and Godbout, J.P. (2013). Increased micro-RNA 29b in the aged brain correlates with the reduction of insulin-like growth factor-1 and fractalkine ligand. *Neurobiology of Aging* *34*, 2748–2758.
- Fernandes, J., Acuña, S., Aoki, J., Floeter-Winter, L., and Muxel, S. (2019). Long Non-Coding RNAs in the Regulation of Gene Expression: Physiology and Disease. *Ncrna* *5*, 17.
- Frankel, D., Delecourt, V., Harhour, K., De Sandre-Giovannoli, A., Lévy, N., Kaspi, E., and Roll, P. (2018). MicroRNAs in hereditary and sporadic premature aging syndromes and other laminopathies. *Aging Cell* e12766.
- Freedman, D.A., and Folkman, J. (2005). CDK2 translational down-regulation during endothelial senescence. *Experimental Cell Research* *307*, 118–130.
- Fu, N., Niu, X., Wang, Y., Du, H., Wang, B., Du, J., Li, Y., Wang, R., Zhang, Y., Zhao, S., et al. (2016). Role of LncRNA-activated by transforming growth factor beta in the progression of hepatitis C virus-related liver fibrosis. *Discov Med* *22*, 29–42.
- Furukawa, K., and Hotta, Y. (1993). cDNA cloning of a germ cell specific lamin B3 from mouse spermatocytes and analysis of its function by ectopic expression in somatic cells. *EMBO J.* *12*, 97–106.

García-Cao, I., García-Cao, M., Martín-Caballero, J., Criado, L.M., Klatt, P., Flores, J.M., Weill, J.-C., Blasco, M.A., and Serrano, M. (2002). “Super p53” mice exhibit enhanced DNA damage response, are tumor resistant and age normally. *EMBO J.* *21*, 6225–6235.

Garg, A., Subramanyam, L., Agarwal, A.K., Simha, V., Levine, B., D’Apice, M.R., Novelli, G., and Crow, Y. (2009). Atypical Progeroid Syndrome due to Heterozygous Missense *LMNA* Mutations. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* *94*, 4971–4983.

Gebert, L.F.R., and MacRae, I.J. (2019). Regulation of microRNA function in animals. *Nat Rev Mol Cell Biol* *20*, 21–37.

Gerland, L.-M., Peyrol, S., Lallemand, C., Branche, R., Magaud, J.-P., and Ffrench, M. (2003). Association of increased autophagic inclusions labeled for β -galactosidase with fibroblastic aging. *Experimental Gerontology* *38*, 887–895.

Gire, V. (2005). La sénescence: Une barrière télomérique à l’immortalité ou une réponse cellulaire aux stress physiologiques? *Médecine/Sciences* *21*, 491–497.

Goldman, R.D., Shumaker, D.K., Erdos, M.R., Eriksson, M., Goldman, A.E., Gordon, L.B., Gruenbaum, Y., Khuon, S., Mendez, M., Varga, R., et al. (2004). Accumulation of mutant lamin A causes progressive changes in nuclear architecture in Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *101*, 8963–8968.

Gong, J.-N., Yu, J., Lin, H.-S., Zhang, X.-H., Yin, X.-L., Xiao, Z., Wang, F., Wang, X.-S., Su, R., Shen, C., et al. (2014). The role, mechanism and potentially therapeutic application of microRNA-29 family in acute myeloid leukemia. *Cell Death & Differentiation* *21*, 100–112.

Gonzalo, S., and Kreienkamp, R. (2015). DNA repair defects and genome instability in Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome. *Current Opinion in Cell Biology* *34*, 75–83.

Gonzalo, S., Kreienkamp, R., and Askjaer, P. (2017). Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome: A premature aging disease caused by LMNA gene mutations. *Ageing Research Reviews* *33*, 18–29.

Gordon, L.B., Kleinman, M.E., Miller, D.T., Neubergh, D.S., Giobbie-Hurder, A., Gerhard-Herman, M., Smoot, L.B., Gordon, C.M., Cleveland, R., Snyder, B.D., et al. (2012). Clinical trial of a farnesyltransferase inhibitor in children with Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *109*, 16666–16671.

Gordon, L.B., Rothman, F.G., López-Otín, C., and Misteli, T. (2014). Progeria: A Paradigm for Translational Medicine. *Cell* *156*, 400–407.

Gordon, L.B., Kleinman, M.E., Massaro, J., D’Agostino, R.B., Shappell, H., Gerhard-Herman, M., Smoot, L.B., Gordon, C.M., Cleveland, R.H., Nazarian, A., et al. (2016). Clinical Trial of the Protein Farnesylation Inhibitors Lonafarnib, Pravastatin, and Zoledronic Acid in Children With Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome. *Circulation* *134*, 114–125.

Gruenbaum, Y., Goldman, R.D., Meyuhas, R., Mills, E., Margalit, A., Fridkin, A., Dayani, Y., Prokocimer, M., and Enosh, A. (2003). The Nuclear Lamina and Its Functions in the Nucleus. In *International Review of Cytology*, (Elsevier), pp. 1–62.

Guo, Y., Kim, Y., Shimi, T., Goldman, R.D., and Zheng, Y. (2014). Concentration-dependent lamin assembly and its roles in the localization of other nuclear proteins. *MBoC* *25*, 1287–1297.

- Habiballa, L., Salmonowicz, H., and Passos, J.F. (2019). Mitochondria and cellular senescence: Implications for musculoskeletal ageing. *Free Radical Biology and Medicine* *132*, 3–10.
- Han, E.K., Ng, S.C., Arber, N., Begemann, M., and Weinstein, I.B. (1999). Roles of cyclin D1 and related genes in growth inhibition, senescence and apoptosis. *Apoptosis* *4*, 213–219.
- Hao, S., Chen, C., and Cheng, T. (2016). Cell cycle regulation of hematopoietic stem or progenitor cells. *International Journal of Hematology* *103*, 487–497.
- Harhour, K., Navarro, C., Baquerre, C., Da Silva, N., Bartoli, C., Casey, F., Mawuse, G., Doubaj, Y., Lévy, N., and De Sandre-Giovannoli, A. (2016a). Antisense-Based Progerin Downregulation in HGPS-Like Patients' Cells. *Cells* *5*, 31.
- Harhour, K., Navarro, C., Baquerre, C., Da Silva, N., Bartoli, C., Casey, F., Mawuse, G.K., Doubaj, Y., Lévy, N., and De Sandre-Giovannoli, A. (2016b). Antisense-Based Progerin Downregulation in HGPS-Like Patients' Cells. *Cells* *5*.
- Harhour, K., Navarro, C., Depetris, D., Mattei, M., Nissan, X., Cau, P., De Sandre-Giovannoli, A., and Lévy, N. (2017). MG132-induced progerin clearance is mediated by autophagy activation and splicing regulation. *EMBO Molecular Medicine* *9*, 1294–1313.
- Harhour, K., Frankel, D., Bartoli, C., Roll, P., De Sandre-Giovannoli, A., and Lévy, N. (2018). An overview of treatment strategies for Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome. *Nucleus* *1*–27.
- Harkema, L., Youssef, S.A., and de Bruin, A. (2016). Pathology of Mouse Models of Accelerated Aging. *Veterinary Pathology* *53*, 366–389.
- Hennekam, R.C.M. (2006). Hutchinson–Gilford progeria syndrome: Review of the phenotype. *American Journal of Medical Genetics Part A* *140A*, 2603–2624.
- Herr, I., Sähr, H., Zhao, Z., Yin, L., Omlor, G., Lehner, B., and Fellenberg, J. (2017). MiR-127 and miR-376a act as tumor suppressors by in vivo targeting of COA1 and PDIA6 in giant cell tumor of bone. *Cancer Letters* *409*, 49–55.
- Herranz, D., Muñoz-Martin, M., Cañamero, M., Mulero, F., Martinez-Pastor, B., Fernandez-Capetillo, O., and Serrano, M. (2010). Sirt1 improves healthy ageing and protects from metabolic syndrome-associated cancer. *Nat Commun* *1*, 3.
- Hershberger, R.E., and Morales, A. (1993). LMNA -Related Dilated Cardiomyopathy. In *GeneReviews®*, M.P. Adam, H.H. Ardinger, R.A. Pagon, S.E. Wallace, L.J. Bean, K. Stephens, and A. Amemiya, eds. (Seattle (WA): University of Washington, Seattle), p.
- Hochegger, H., Takeda, S., and Hunt, T. (2008). Cyclin-dependent kinases and cell-cycle transitions: does one fit all? *Nature Reviews Molecular Cell Biology* *9*, 910–916.
- Höger, T.H., Zatloukal, K., Waizenegger, I., and Krohne, G. (1990). Characterization of a second highly conserved B-type lamin present in cells previously thought to contain only a single B-type lamin. *Chromosoma* *99*, 379–390.
- Holzenberger, M., Dupont, J., Ducos, B., Leneuve, P., Géloën, A., Even, P.C., Cervera, P., and Le Bouc, Y. (2003). IGF-1 receptor regulates lifespan and resistance to oxidative stress in mice. *Nature* *421*, 182–187.

- Hu, Z., Klein, J.D., Mitch, W.E., Zhang, L., Martinez, I., and Wang, X.H. (2014). MicroRNA-29 induces cellular senescence in aging muscle through multiple signaling pathways. *Aging* 6, 160–175.
- Huguet, F., Flynn, S., and Vagnarelli, P. (2019). The Role of Phosphatases in Nuclear Envelope Disassembly and Reassembly and Their Relevance to Pathologies. *Cells* 8, 687.
- Hwang, S., Park, S.-K., Lee, H.Y., Kim, S.W., Lee, J.S., Choi, E.K., You, D., Kim, C.-S., and Suh, N. (2014). miR-140-5p suppresses BMP2-mediated osteogenesis in undifferentiated human mesenchymal stem cells. *FEBS Letters* 588, 2957–2963.
- Hydbring, P., Malumbres, M., and Sicinski, P. (2016). Non-canonical functions of cell cycle cyclins and cyclin-dependent kinases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 17, 280–292.
- Ibrahim, M.X., Sayin, V.I., Akula, M.K., Liu, M., Fong, L.G., Young, S.G., and Bergo, M.O. (2013). Targeting Isoprenylcysteine Methylation Ameliorates Disease in a Mouse Model of Progeria. *Science* 340, 1330–1333.
- Iso, T., Chung, G., Hamamori, Y., and Keddes, L. (2002). *HERP1* Is a Cell Type-specific Primary Target of Notch. *J. Biol. Chem.* 277, 6598–6607.
- Janssen, H.L.A., Reesink, H.W., Lawitz, E.J., Zeuzem, S., Rodriguez-Torres, M., Patel, K., van der Meer, A.J., Patick, A.K., Chen, A., Zhou, Y., et al. (2013). Treatment of HCV Infection by Targeting MicroRNA. *New England Journal of Medicine* 368, 1685–1694.
- Jung, H.-J., Coffinier, C., Choe, Y., Beigneux, A.P., Davies, B.S.J., Yang, S.H., Barnes, R.H., Hong, J., Sun, T., Pleasure, S.J., et al. (2012). Regulation of prelamin A but not lamin C by miR-9, a brain-specific microRNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109, E423–E431.
- Jung, H.J., Lee, K.-P., Kwon, K.-S., and Suh, Y. (2018). MicroRNAs in Skeletal Muscle Aging: Current Issues and Perspectives. *The Journals of Gerontology: Series A*.
- Jurk, D., Wilson, C., Passos, J.F., Oakley, F., Correia-Melo, C., Greaves, L., Saretzki, G., Fox, C., Lawless, C., Anderson, R., et al. (2014). Chronic inflammation induces telomere dysfunction and accelerates ageing in mice. *Nat Commun* 5, 4172.
- Kang, H.T., Lee, K.B., Kim, S.Y., Choi, H.R., and Park, S.C. (2011). Autophagy impairment induces premature senescence in primary human fibroblasts. *PLoS ONE* 6, e23367.
- Kang, J., Park, H., Kim, H., Mun, D., Park, H., Yun, N., and Joung, B. (2019). Human peripheral blood-derived exosomes for microRNA delivery. *Int J Mol Med*.
- Kapahi, P., Kaeberlein, M., and Hansen, M. (2017). Dietary restriction and lifespan: Lessons from invertebrate models. *Ageing Research Reviews* 39, 3–14.
- Kastelowitz, N., and Yin, H. (2014). Exosomes and Microvesicles: Identification and Targeting By Particle Size and Lipid Chemical Probes. *ChemBioChem* 15, 923–928.
- Kelley, J.B., Datta, S., Snow, C.J., Chatterjee, M., Ni, L., Spencer, A., Yang, C.-S., Cubenas-Potts, C., Matunis, M.J., and Paschal, B.M. (2011). The Defective Nuclear Lamina in Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome Disrupts the Nucleocytoplasmic Ran Gradient and Inhibits Nuclear Localization of Ubc9. *Molecular and Cellular Biology* 31, 3378–3395.

- Kim, D., Choi, B., Ryoo, I., and Kwak, M.-K. (2018). High NRF2 level mediates cancer stem cell-like properties of aldehyde dehydrogenase (ALDH)-high ovarian cancer cells: inhibitory role of all-trans retinoic acid in ALDH/NRF2 signaling. *Cell Death Dis* 9, 896.
- Köks, S., Dogan, S., Tuna, B.G., González-Navarro, H., Potter, P., and Vandenbroucke, R.E. (2016). Mouse models of ageing and their relevance to disease. *Mechanisms of Ageing and Development* 160, 41–53.
- Korkmaz, G., le Sage, C., Tekirdag, K.A., Agami, R., and Gozuacik, D. (2012). miR-376b controls starvation and mTOR inhibition-related autophagy by targeting ATG4C and BECN1. *Autophagy* 8, 165–176.
- Korkmaz, G., Tekirdag, K.A., Ozturk, D.G., Kosar, A., Sezerman, O.U., and Gozuacik, D. (2013). MIR376A Is a Regulator of Starvation-Induced Autophagy. *PLoS ONE* 8, e82556.
- Kreienkamp, R., Croke, M., Neumann, M.A., Bedia-Diaz, G., Graziano, S., Dusso, A., Dorsett, D., Carlberg, C., and Gonzalo, S. (2016). Vitamin D receptor signaling improves Hutchinson-Gilford progeria syndrome cellular phenotypes. *Oncotarget* 7, 30018–30031.
- Kreth, S., Hübner, M., and Hinske, L.C. (2018). MicroRNAs as Clinical Biomarkers and Therapeutic Tools in Perioperative Medicine: Anesthesia & Analgesia 126, 670–681.
- Kubben, N., Zhang, W., Wang, L., Voss, T.C., Yang, J., Qu, J., Liu, G.-H., and Misteli, T. (2016). Repression of the Antioxidant NRF2 Pathway in Premature Aging. *Cell* 165, 1361–1374.
- Kuehnle, K., Cramer, A., Kalin, R.E., Luciani, P., Benvenuti, S., Peri, A., Ratti, F., Rodolfo, M., Kulic, L., Heppner, F.L., et al. (2008). Prosurvival Effect of DHCR24/Seladin-1 in Acute and Chronic Responses to Oxidative Stress. *Molecular and Cellular Biology* 28, 539–550.
- Kuilman, T., Michaloglou, C., Mooi, W.J., and Peeper, D.S. (2010). The essence of senescence. *Genes & Development* 24, 2463–2479.
- Kuro-o, M., Matsumura, Y., Aizawa, H., Kawaguchi, H., Suga, T., Utsugi, T., Ohshima, Y., Kurabayashi, M., Kaname, T., Kume, E., et al. (1997). Mutation of the mouse *klotho* gene leads to a syndrome resembling ageing. *Nature* 390, 45–51.
- Kurosu, H. (2005). Suppression of Aging in Mice by the Hormone Klotho. *Science* 309, 1829–1833.
- Lammerding, J., Fong, L.G., Ji, J.Y., Reue, K., Stewart, C.L., Young, S.G., and Lee, R.T. (2006). Lamins A and C but Not Lamin B1 Regulate Nuclear Mechanics. *Journal of Biological Chemistry* 281, 25768–25780.
- Laoukili, J., Kooistra, M.R.H., Brás, A., Kauw, J., Kerkhoven, R.M., Morrison, A., Clevers, H., and Medema, R.H. (2005). FoxM1 is required for execution of the mitotic programme and chromosome stability. *Nature Cell Biology* 7, 126–136.
- Laoukili, J., Alvarez, M., Meijer, L.A.T., Stahl, M., Mohammed, S., Kleij, L., Heck, A.J.R., and Medema, R.H. (2008). Activation of FoxM1 during G2 Requires Cyclin A/Cdk-Dependent Relief of Autorepression by the FoxM1 N-Terminal Domain. *Molecular and Cellular Biology* 28, 3076–3087.
- Larrieu, D., Britton, S., Demir, M., Rodriguez, R., and Jackson, S.P. (2014). Chemical Inhibition of NAT10 Corrects Defects of Laminopathic Cells. *Science* 344, 527–532.

- Lee, R.C., Rhonda L., F., and Victor, A. (1993). The *C. elegans* Heterochronic Gene *lin-4* Encodes Small RNAs with Antisense Complementarity to *lin-14*. *Cell* 75, 843–854.
- Levy, A., Albiges-Sauvin, L., Massard, C., Soria, J.-C., and Deutsch, É. (2011). Cell cycle, mitosis and therapeutic applications. *Bulletin du Cancer* 1037–1045.
- Li, G.-J., Yang, Y., Yang, G.-K., Wan, J., Cui, D.-L., Ma, Z.-H., Du, L.-J., and Zhang, G.-M. (2017). *Slit2* suppresses endothelial cell proliferation and migration by inhibiting the VEGF-Notch signaling pathway. *Molecular Medicine Reports* 15, 1981–1988.
- Li, J., Xu, X., Cai, X., Weng, Y., Wang, Y., Shen, Q., and Shi, X. (2019). Milk Fat Globule-Epidermal Growth Factor-Factor 8 Reverses Lipopolysaccharide-Induced Microglial Oxidative Stress. *Oxid Med Cell Longev* 2019, 2601394.
- Li, T., Yan, X., Jiang, M., and Xiang, L. (2016). The comparison of microRNA profile of the dermis between the young and elderly. *Journal of Dermatological Science* 82, 75–83.
- Lièvre, A., and Laurent-Puig, P. (2010). La voie de signalisation RAS/MAPK. *Cancéro Digest II*.
- Lim, S., and Kaldis, P. (2013). Cdks, cyclins and CKIs: roles beyond cell cycle regulation. *Development* 140, 3079–3093.
- Lin, F., and Worman, H.J. (1993). Structural organization of the human gene encoding nuclear lamin A and nuclear lamin C. *J. Biol. Chem.* 268, 16321–16326.
- Lin, F., and Worman, H.J. (1995). Structural Organization of the Human Gene (*LMNB1*) Encoding Nuclear Lamin B1. *Genomics* 27, 230–236.
- Lin, A.B., McNeely, S.C., and Beckmann, R.P. (2017). Achieving Precision Death with Cell-Cycle Inhibitors that Target DNA Replication and Repair. *Clinical Cancer Research* 23, 3232–3240.
- Litke, R., Boulanger, É., and Fradin, C. (2018). *Caenorhabditis elegans*, un modèle d'étude du vieillissement. *Med Sci (Paris)* 34, 571–579.
- Liu, B., Wang, J., Chan, K.M., Tjia, W.M., Deng, W., Guan, X., Huang, J., Li, K.M., Chau, P.Y., Chen, D.J., et al. (2005). Genomic instability in laminopathy-based premature aging. *Nat Med* 11, 780–785.
- Liu, B., Ghosh, S., Yang, X., Zheng, H., Liu, X., Wang, Z., Jin, G., Zheng, B., Kennedy, B.K., Suh, Y., et al. (2012). Resveratrol Rescues SIRT1-Dependent Adult Stem Cell Decline and Alleviates Progeroid Features in Laminopathy-Based Progeria. *Cell Metabolism* 16, 738–750.
- Liu, L.-L., Li, D., He, Y.-L., Zhou, Y.-Z., Gong, S.-H., Wu, L.-Y., Zhao, Y.-Q., Huang, X., Zhao, T., Xu, L., et al. (2017). miR-210 Protects Renal Cell Against Hypoxia-induced Apoptosis by Targeting HIF-1 Alpha. *Mol Med* 23, 258–271.
- Liu, Q., Ren, K., Liu, S., Li, W., Huang, C., and Yang, X. (2018). MicroRNA-140-5p aggravates hypertension and oxidative stress of atherosclerosis via targeting Nrf2 and Sirt2. *Int J Mol Med*.
- Llobet-Navas, D., Rodriguez-Barrueco, R., de la Iglesia-Vicente, J., Oliván, M., Castro, V., Saucedo-Cuevas, L., Marshall, N., Putcha, P., Castillo-Martin, M., Bardot, E., et al. (2014). The MicroRNA 424/503 Cluster Reduces CDC25A Expression during Cell Cycle Arrest Imposed by Transforming Growth Factor in Mammary Epithelial Cells. *Molecular and Cellular Biology* 34, 4216–4231.

- Lopez-Mejia, I.C., Vautrot, V., De Toledo, M., Behm-Ansmant, I., Bourgeois, C.F., Navarro, C.L., Osorio, F.G., Freije, J.M.P., Stévenin, J., De Sandre-Giovannoli, A., et al. (2011). A conserved splicing mechanism of the LMNA gene controls premature aging. *Human Molecular Genetics* 20, 4540–4555.
- Lu, D., Yang, C., Zhang, Z., Cong, Y., and Xiao, M. (2018). Knockdown of Linc00515 Inhibits Multiple Myeloma Autophagy and Chemoresistance by Upregulating miR-140-5p and Downregulating ATG14. *Cell Physiol Biochem* 48, 2517–2527.
- de Lucia, C., Komici, K., Borghetti, G., Femminella, G.D., Bencivenga, L., Cannavo, A., Corbi, G., Ferrara, N., Houser, S.R., Koch, W.J., et al. (2017). microRNA in Cardiovascular Aging and Age-Related Cardiovascular Diseases. *Frontiers in Medicine* 4.
- Lucibello, F.C., Sewing, A., Brüsselbach, S., Bürger, C., and Müller, R. (1993). Deregulation of cyclins D1 and E and suppression of cdk2 and cdk4 in senescent human fibroblasts. *J. Cell. Sci.* 105 (Pt 1), 123–133.
- Ludlow, A.T., Robin, J.D., Sayed, M., Litterst, C.M., Shelton, D.N., Shay, J.W., and Wright, W.E. (2014). Quantitative telomerase enzyme activity determination using droplet digital PCR with single cell resolution. *Nucleic Acids Res.* 42, e104.
- Luo, W., Liu, L., Yang, L., Dong, Y., Liu, T., Wei, X., Liu, D., Gu, H., Kong, J., Yuan, Z., et al. (2018). The vitamin D receptor regulates miR-140-5p and targets the MAPK pathway in bone development. *Metabolism* 85, 139–150.
- Machiels, B.M., Zorenc, A.H.G., Endert, J.M., Kuijpers, H.J.H., van Eys, G.J.J.M., Ramaekers, F.C.S., and Broers, J.L.V. (1996). An Alternative Splicing Product of the Lamin A/C Gene Lacks Exon 10. *Journal of Biological Chemistry* 271, 9249–9253.
- Mack, H.I.D., Heimbucher, T., and Murphy, C.T. (2018). The nematode *Caenorhabditis elegans* as a model for aging research. *Drug Discovery Today: Disease Models* 27, 3–13.
- Maeshima, K., Yahata, K., Sasaki, Y., Nakatomi, R., Tachibana, T., Hashikawa, T., Imamoto, F., and Imamoto, N. (2006). Cell-cycle-dependent dynamics of nuclear pores: pore-free islands and lamins. *Journal of Cell Science* 119, 4442–4451.
- Mahmoud, A.I., Kocabas, F., Muralidhar, S.A., Kimura, W., Koura, A.S., Thet, S., Porrello, E.R., and Sadek, H.A. (2013). Meis1 regulates postnatal cardiomyocyte cell cycle arrest. *Nature* 497, 249–253.
- Malakar, P., Shilo, A., Mogilevsky, A., Stein, I., Pikarsky, E., Nevo, Y., Benyamini, H., Elgavish, S., Zong, X., Prasanth, K.V., et al. (2017). Long Noncoding RNA MALAT1 Promotes Hepatocellular Carcinoma Development by SRSF1 Upregulation and mTOR Activation. *Cancer Res* 77, 1155–1167.
- Malumbres, M. (2014). Cyclin-dependent kinases. *Genome Biology* 15, 122.
- Mariño, G., Ugalde, A.P., Fernández, A.F., Osorio, F.G., Fueyo, A., Freije, J.M.P., and López-Otín, C. (2010). Insulin-like growth factor 1 treatment extends longevity in a mouse model of human premature aging by restoring somatotroph axis function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 16268–16273.
- Marino, G., Ugalde, A.P., Fernandez, A.F., Osorio, F.G., Fueyo, A., Freije, J.M.P., and Lopez-Otin, C. (2010). Insulin-like growth factor 1 treatment extends longevity in a mouse model of human premature aging by restoring somatotroph axis function. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107, 16268–16273.

- Masse, I., Molin, L., Billaud, M., and Solari, F. (2005). Lifespan and dauer regulation by tissue-specific activities of *Caenorhabditis elegans* DAF-18. *Dev. Biol.* *286*, 91–101.
- McCord, R.P., Nazario-Toole, A., Zhang, H., Chines, P.S., Zhan, Y., Erdos, M.R., Collins, F.S., Dekker, J., and Cao, K. (2013). Correlated alterations in genome organization, histone methylation, and DNA-lamin A/C interactions in Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Genome Res.* *23*, 260–269.
- McHugh, D., and Gil, J. (2018). Senescence and aging: Causes, consequences, and therapeutic avenues. *The Journal of Cell Biology* *217*, 65–77.
- Meijer, L. (2003). Le cycle de division cellulaire et sa régulation. *Oncologie* *5*, 311–326.
- Meng, L., Liu, C., Lü, J., Zhao, Q., Deng, S., Wang, G., Qiao, J., Zhang, C., Zhen, L., Lu, Y., et al. (2017). Small RNA zippers lock miRNA molecules and block miRNA function in mammalian cells. *Nat Commun* *8*, 13964.
- Menicacci, B., Cipriani, C., Margheri, F., Mocali, A., and Giovannelli, L. (2017). Modulation of the Senescence-Associated Inflammatory Phenotype in Human Fibroblasts by Olive Phenols. *International Journal of Molecular Sciences* *18*, 2275.
- Mergoud dit Lamarche, A., Molin, L., Pierson, L., Mariol, M.-C., Bessereau, J.-L., Gieseler, K., and Solari, F. (2018). UNC-120/SRF independently controls muscle aging and lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *Aging Cell* *17*, e12713.
- Mestdagh, P., Van Vlierberghe, P., De Weer, A., Muth, D., Westermann, F., Speleman, F., and Vandesompele, J. (2009). A novel and universal method for microRNA RT-qPCR data normalization. *Genome Biol.* *10*, R64.
- Mikamori, M., Yamada, D., Eguchi, H., Hasegawa, S., Kishimoto, T., Tomimaru, Y., Asaoka, T., Noda, T., Wada, H., Kawamoto, K., et al. (2017). MicroRNA-155 Controls Exosome Synthesis and Promotes Gemcitabine Resistance in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Sci Rep* *7*, 42339.
- Mittler, R. (2017). ROS Are Good. *Trends in Plant Science* *22*, 11–19.
- Moir, R.D., Spann, T.P., Herrmann, H., and Goldman, R.D. (2000). Disruption of nuclear lamin organization blocks the elongation phase of DNA replication. *J. Cell Biol.* *149*, 1179–1192.
- von Muhlinen, N., Horikawa, I., Alam, F., Isogaya, K., Lissa, D., Vojtesek, B., Lane, D.P., and Harris, C.C. (2018). p53 isoforms regulate premature aging in human cells. *Oncogene* *37*, 2379–2393.
- Musich, P.R., and Zou, Y. (2009). Genomic instability and DNA damage responses in progeria arising from defective maturation of prelamin A. *Aging* *1*, 28–37.
- Muther, C., Jobeili, L., Garion, M., Heraud, S., Thepot, A., Damour, O., and Lamartine, J. (2017). An expression screen for aged-dependent microRNAs identifies miR-30a as a key regulator of aging features in human epidermis. *Aging (Albany NY)* *9*, 2376–2396.
- Naetar, N., Ferraioli, S., and Foisner, R. (2017). Lamins in the nuclear interior – life outside the lamina. *Journal of Cell Science* *130*, 2087–2096.
- Navarro, C.L., Poitelon, Y., and Lévy, N. (2008). Lamines A et syndromes progéroïdes: Une farnésylation persistante aux conséquences dramatiques. *Médecine/Sciences* *24*, 833–840.

Oakley, F., Mann, J., Nailard, S., Smart, D.E., Mungalsingh, N., Constandinou, C., Ali, S., Wilson, S.J., Millward-Sadler, H., Iredale, J.P., et al. (2005). Nuclear factor-kappaB1 (p50) limits the inflammatory and fibrogenic responses to chronic injury. *Am. J. Pathol.* 166, 695–708.

O'Brien, J., Hayder, H., Zayed, Y., and Peng, C. (2018). Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. *Front. Endocrinol.* 9, 402.

Oh, S.-H., Kim, J.-W., Kim, Y., Lee, M.N., Kook, M.-S., Choi, E.Y., Im, S.-Y., and Koh, J.-T. (2017). The extracellular matrix protein Edil3 stimulates osteoblast differentiation through the integrin $\alpha 5\beta 1$ /ERK/Runx2 pathway. *PLoS ONE* 12, e0188749.

de Oliveira, R.M. (2006). Klotho RNAi induces premature senescence of human cells via a p53/p21 dependent pathway. *FEBS Letters* 580, 5753–5758.

Osorio, F.G., Navarro, C.L., Cadinanos, J., Lopez-Mejia, I.C., Quiros, P.M., Bartoli, C., Rivera, J., Tazi, J., Guzman, G., Varela, I., et al. (2011a). Splicing-Directed Therapy in a New Mouse Model of Human Accelerated Aging. *Science Translational Medicine* 3, 106ra107-106ra107.

Osorio, F.G., Navarro, C.L., Cadiñanos, J., López-Mejía, I.C., Quirós, P.M., Bartoli, C., Rivera, J., Tazi, J., Guzmán, G., Varela, I., et al. (2011b). Splicing-directed therapy in a new mouse model of human accelerated aging. *Sci Transl Med* 3, 106ra107.

Osorio, F.G., Barcena, C., Soria-Valles, C., Ramsay, A.J., de Carlos, F., Cobo, J., Fueyo, A., Freije, J.M.P., and Lopez-Otin, C. (2012). Nuclear lamina defects cause ATM-dependent NF- B activation and link accelerated aging to a systemic inflammatory response. *Genes & Development* 26, 2311–2324.

Pal, S., and Tyler, J.K. (2016). Epigenetics and aging. *Science Advances* 2, e1600584–e1600584.

Pegoraro, E., and Hoffman, E.P. (1993). Limb-Girdle Muscular Dystrophy Overview. In *GeneReviews*®, M.P. Adam, H.H. Ardinger, R.A. Pagon, S.E. Wallace, L.J. Bean, K. Stephens, and A. Amemiya, eds. (Seattle (WA): University of Washington, Seattle), p.

Pendás, A.M., Zhou, Z., Cadiñanos, J., Freije, J.M.P., Wang, J., Hultenby, K., Astudillo, A., Wernerson, A., Rodríguez, F., Tryggvason, K., et al. (2002). Defective prelamin A processing and muscular and adipocyte alterations in Zmpste24 metalloproteinase-deficient mice. *Nature Genetics* 31, 94–99.

Peter, M., Nakagawa, J., Dorée, M., Labbé, J.C., and Nigg, E.A. (1990). In vitro disassembly of the nuclear lamina and M phase-specific phosphorylation of lamins by cdc2 kinase. *Cell* 61, 591–602.

Piekarowicz, K., Machowska, M., Dzianisava, V., and Rzepecki, R. (2019). Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome—Current Status and Prospects for Gene Therapy Treatment. *Cells* 8, 88.

Pietenpol, J.A., and Stewart, Z.A. (2002). Cell cycle checkpoint signaling: cell cycle arrest versus apoptosis. *Toxicology* 181–182, 475–481.

Poillet-Perez, L., Despouy, G., Delage-Mourroux, R., and Boyer-Guittaut, M. (2015). Interplay between ROS and autophagy in cancer cells, from tumor initiation to cancer therapy. *Redox Biology* 4, 184–192.

Pommier, Y., and Kohn, K.W. (2003). Cycle cellulaire et points de contrôle en oncologie: nouvelles cibles thérapeutiques. *Médecine/Sciences* 19, 131–252.

Prokocimer, M., Davidovich, M., Nissim-Rafinia, M., Wiesel-Motiuk, N., Bar, D.Z., Barkan, R., Meshorer, E., and Gruenbaum, Y. (2009). Nuclear lamins: key regulators of nuclear structure and activities. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 13, 1059–1085.

Prokocimer, M., Barkan, R., and Gruenbaum, Y. (2013). Hutchinson-Gilford progeria syndrome through the lens of transcription. *Aging Cell* 12, 533–543.

Qie, S., and Diehl, J.A. (2016). Cyclin D1, cancer progression, and opportunities in cancer treatment. *Journal of Molecular Medicine* 94, 1313–1326.

Quijano-Roy, S., Mbieleu, B., Bönnemann, C.G., Jeannet, P.-Y., Colomer, J., Clarke, N.F., Cuisset, J.-M., Roper, H., De Meirleir, L., D'Amico, A., et al. (2008). De novo *LMNA* mutations cause a new form of congenital muscular dystrophy. *Annals of Neurology* 64, 177–186.

Rayess, H., Wang, M.B., and Srivatsan, E.S. (2012). Cellular senescence and tumor suppressor gene p16. *International Journal of Cancer* 130, 1715–1725.

Reinhart, B.J., Slack, F.J., Basson, M., Pasquinelli, A.E., Bettinger, J.C., Rougvie, A.E., Horvitz, H.R., and Ruvkun, G. (2000). The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 403, 901–906.

Ren, D., Yang, Q., Dai, Y., Guo, W., Du, H., Song, L., and Peng, X. (2017). Oncogenic miR-210-3p promotes prostate cancer cell EMT and bone metastasis via NF-κB signaling pathway. *Mol Cancer* 16, 117.

Revêchon, G., Viceconte, N., McKenna, T., Sola Carvajal, A., Vrtačnik, P., Stenvinkel, P., Lundgren, T., Hultenby, K., Franco, I., and Eriksson, M. (2017). Rare progerin-expressing preadipocytes and adipocytes contribute to tissue depletion over time. *Sci Rep* 7, 4405.

Richards, S.A., Muter, J., Ritchie, P., Lattanzi, G., and Hutchison, C.J. (2011). The accumulation of un-repairable DNA damage in laminopathy progeria fibroblasts is caused by ROS generation and is prevented by treatment with N-acetyl cysteine. *Human Molecular Genetics* 20, 3997–4004.

Rivera-Torres, J., Acín-Perez, R., Cabezas-Sánchez, P., Osorio, F.G., Gonzalez-Gómez, C., Megias, D., Cámara, C., López-Otín, C., Enríquez, J.A., Luque-García, J.L., et al. (2013). Identification of mitochondrial dysfunction in Hutchinson–Gilford progeria syndrome through use of stable isotope labeling with amino acids in cell culture. *Journal of Proteomics* 91, 466–477.

Robin, J.D., and Magdinier, F. (2016). Physiological and Pathological Aging Affects Chromatin Dynamics, Structure and Function at the Nuclear Edge. *Frontiers in Genetics* 7.

Robin, J.D., Ludlow, A.T., Batten, K., Magdinier, F., Stadler, G., Wagner, K.R., Shay, J.W., and Wright, W.E. (2014). Telomere position effect: regulation of gene expression with progressive telomere shortening over long distances. *Genes Dev.* 28, 2464–2476.

Romagosa, C., Simonetti, S., López-Vicente, L., Mazo, A., Lleonart, M.E., Castellvi, J., and Ramon y Cajal, S. (2011). p16^{Ink4a} overexpression in cancer: a tumor suppressor gene associated with senescence and high-grade tumors. *Oncogene* 30, 2087–2097.

Romero-Barrios, N., Legascue, M.F., Benhamed, M., Ariel, F., and Crespi, M. (2018). Splicing regulation by long noncoding RNAs. *Nucleic Acids Res.* 46, 2169–2184.

- van Rooij, E., Purcell, A.L., and Levin, A.A. (2012). Developing MicroRNA Therapeutics. *Circ Res* *110*, 496–507.
- Rose, G., Santoro, A., and Salvioli, S. (2017). Mitochondria and mitochondria-induced signalling molecules as longevity determinants. *Mechanisms of Ageing and Development* *165*, 115–128.
- Rupaimoole, R., and Slack, F.J. (2017). MicroRNA therapeutics: towards a new era for the management of cancer and other diseases. *Nat Rev Drug Discov* *16*, 203–222.
- Rzepecki, R., and Gruenbaum, Y. (2018). Invertebrate models of lamin diseases. *Nucleus* *9*, 227–234.
- Sagelius, H., Rosengardten, Y., Hanif, M., Erdos, M.R., Rozell, B., Collins, F.S., and Eriksson, M. (2008). Targeted transgenic expression of the mutation causing Hutchinson-Gilford progeria syndrome leads to proliferative and degenerative epidermal disease. *Journal of Cell Science* *121*, 969–978.
- Saha, S., Kim, K., Yang, G.-M., Choi, H., and Cho, S.-G. (2018). Cytokeratin 19 (KRT19) has a Role in the Reprogramming of Cancer Stem Cell-Like Cells to Less Aggressive and More Drug-Sensitive Cells. *IJMS* *19*, 1423.
- Saha, S.K., Choi, H.Y., Kim, B.W., Dayem, A.A., Yang, G.-M., Kim, K.S., Yin, Y.F., and Cho, S.-G. (2017). KRT19 directly interacts with β -catenin/RAC1 complex to regulate NUMB-dependent NOTCH signaling pathway and breast cancer properties. *Oncogene* *36*, 332–349.
- Saintigny, Y., and Monnat Jr, R.J. (2002). Hélicase RecQ, syndrome de Werner, et réparation de l'ADN par recombinaison homologue. *Médecine/Sciences* *18*, 79–85.
- Salminen, A., Kaarniranta, K., and Kauppinen, A. (2012). Inflammaging: disturbed interplay between autophagy and inflammasomes. *Aging* *4*, 166–175.
- Salminen, A., Kaarniranta, K., and Kauppinen, A. (2013). Crosstalk between Oxidative Stress and SIRT1: Impact on the Aging Process. *International Journal of Molecular Sciences* *14*, 3834–3859.
- Sanger Mouse Genetics Project, Balmus, G., Larrieu, D., Barros, A.C., Collins, C., Abrudan, M., Demir, M., Geisler, N.J., Lelliott, C.J., White, J.K., et al. (2018). Targeting of NAT10 enhances healthspan in a mouse model of human accelerated aging syndrome. *Nat Commun* *9*, 1700.
- Santiago-Fernández, O., Osorio, F.G., Quesada, V., Rodríguez, F., Basso, S., Maeso, D., Rolas, L., Barkaway, A., Nourshargh, S., Folgueras, A.R., et al. (2019). Development of a CRISPR/Cas9-based therapy for Hutchinson–Gilford progeria syndrome. *Nature Medicine*.
- Satoh, A., Brace, C.S., Rensing, N., Cliften, P., Wozniak, D.F., Herzog, E.D., Yamada, K.A., and Imai, S. (2013). Sirt1 Extends Life Span and Delays Aging in Mice through the Regulation of Nk2 Homeobox 1 in the DMH and LH. *Cell Metabolism* *18*, 416–430.
- Scaffidi, P. (2006). Lamin A-Dependent Nuclear Defects in Human Aging. *Science* *312*, 1059–1063.
- Scharner, J., Brown, C.A., Bower, M., Iannaccone, S.T., Khatri, I.A., Escolar, D., Gordon, E., Felice, K., Crowe, C.A., Grosman, C., et al. (2011). Novel LMNA mutations in patients with Emery-Dreifuss muscular dystrophy and functional characterization of four LMNA mutations. *Human Mutation* *32*, 152–167.
- Schmidt, M.F. (2014). Drug target miRNAs: chances and challenges. *Trends in Biotechnology* *32*, 578–585.

- Shapiro, P. (2002). Ras-MAP Kinase Signaling Pathways and Control of Cell Proliferation: Relevance to Cancer Therapy. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* 39, 285–330.
- Shen, W., Zhu, S., Qin, H., Zhong, M., Wu, J., Zhang, R., and Song, H. (2017). EDIL3 knockdown inhibits retinal angiogenesis through the induction of cell cycle arrest in vitro. *Molecular Medicine Reports* 16, 4054–4060.
- Sherr, C.J., and Roberts, J.M. (1995). Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes Dev.* 9, 1149–1163.
- Sherr, C.J., and Roberts, J.M. (1999). CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev.* 13, 1501–1512.
- Shi, N., Guo, X., and Chen, S.-Y. (2014a). Olfactomedin 2, a novel regulator for transforming growth factor- β -induced smooth muscle differentiation of human embryonic stem cell-derived mesenchymal cells. *Mol. Biol. Cell* 25, 4106–4114.
- Shi, R., Yang, Z., Liu, W., Liu, B., Xu, Z., and Zhang, Z. (2014b). Knockdown of Slit2 promotes growth and motility in gastric cancer cells via activation of AKT/ β -catenin. *Oncology Reports* 31, 812–818.
- Shi, R., Guberman, M., and Kirshenbaum, L.A. (2018). Mitochondrial quality control: The role of mitophagy in aging. *Trends in Cardiovascular Medicine* 28, 246–260.
- Smith-Vikos, T., and Slack, F.J. (2012). MicroRNAs and their roles in aging. *Journal of Cell Science* 125, 7–17.
- Sohel, M.H. (2016). Extracellular/Circulating MicroRNAs: Release Mechanisms, Functions and Challenges. *Achievements in the Life Sciences* 10, 175–186.
- Solari, F. (2010). CeKlotho opens a new road for investigation in worm aging. *Aging* 2, 539–540.
- Son, H.G., Altintas, O., Kim, E.J.E., Kwon, S., and Lee, S.-J.V. (2019). Age-dependent changes and biomarkers of aging in *Caenorhabditis elegans*. *Aging Cell* 18, e12853.
- Soussi, T. (2000). Cycle cellulaire et apoptose: le gène suppresseur de tumeur p53. *Médecine/Sciences* 16, 469–472.
- Sparks, S.E., Quijano-Roy, S., Harper, A., Rutkowski, A., Gordon, E., Hoffman, E.P., and Pegoraro, E. (1993). Congenital Muscular Dystrophy Overview. In *GeneReviews*[®], M.P. Adam, H.H. Ardinger, R.A. Pagon, S.E. Wallace, L.J. Bean, K. Stephens, and A. Amemiya, eds. (Seattle (WA): University of Washington, Seattle), p.
- Srivastava, S. (2017). The Mitochondrial Basis of Aging and Age-Related Disorders. *Genes (Basel)* 8.
- van Steensel, B., and Belmont, A.S. (2017). Lamina-Associated Domains: Links with Chromosome Architecture, Heterochromatin, and Gene Repression. *Cell* 169, 780–791.
- Strandgren, C., Revêchon, G., Carvajal, A.S., and Eriksson, M. (2017). Emerging candidate treatment strategies for Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Biochemical Society Transactions* 45, 1279–1293.
- Stuurman, N., Heins, S., and Aebi, U. (1998). Nuclear Lamins: Their Structure, Assembly, and Interactions. *Journal of Structural Biology* 122, 42–66.

- Suh, N. (2018). MicroRNA controls of cellular senescence. *BMB Reports* 51, 493–499.
- Sultana, Z., Maiti, K., Dedman, L., and Smith, R. (2018). Is there a role for placental senescence in the genesis of obstetric complications and fetal growth restriction? *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 218, S762–S773.
- Sun, W., Julie Li, Y.-S., Huang, H.-D., Shyy, J.Y.-J., and Chien, S. (2010). microRNA: A Master Regulator of Cellular Processes for Bioengineering Systems. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 12, 1–27.
- Sun, Y., Li, L., Xing, S., Pan, Y., Shi, Y., Zhang, L., and Shen, Q. (2017). miR-503-3p induces apoptosis of lung cancer cells by regulating p21 and CDK4 expression. *CBM* 20, 597–608.
- Thorin-Trescases, N., Voghel, G., Farhat, N., Drouin, A., Gendron, M.-È., and Thorin, É. (2010). Âge et stress oxydant: Vers un déséquilibre irréversible de l'homéostasie endothéliale. *Médecine/Sciences* 26, 875–880.
- Thum, T., Gross, C., Fiedler, J., Fischer, T., Kissler, S., Bussen, M., Galuppo, P., Just, S., Rottbauer, W., Frantz, S., et al. (2008). MicroRNA-21 contributes to myocardial disease by stimulating MAP kinase signalling in fibroblasts. *Nature* 456, 980–984.
- Tian, Y., Liu, Y., Wang, T., Zhou, N., Kong, J., Chen, L., Snitow, M., Morley, M., Li, D., Petrenko, N., et al. (2015). A microRNA-Hippo pathway that promotes cardiomyocyte proliferation and cardiac regeneration in mice. *Sci. Transl. Med.* 7, 279ra38-279ra38.
- Tran, D., Bergholz, J., Zhang, H., He, H., Wang, Y., Zhang, Y., Li, Q., Kirkland, J.L., and Xiao, Z.-X. (2014). Insulin-like growth factor-1 regulates the SIRT1-p53 pathway in cellular senescence. *Aging Cell* 13, 669–678.
- Tremblay, J.P. (2015). CRISPR, un système qui permet de corriger ou de modifier l'expression de gènes responsables de maladies héréditaires. *Médecine/Sciences* 31, 1014–1022.
- Turgay, Y., Eibauer, M., Goldman, A.E., Shimi, T., Khayat, M., Ben-Harush, K., Dubrovsky-Gaupp, A., Sapra, K.T., Goldman, R.D., and Medalia, O. (2017). The molecular architecture of lamins in somatic cells. *Nature* 543, 261–264.
- Tyner, S.D., Venkatachalam, S., Choi, J., Jones, S., Ghebranious, N., Igelmann, H., Lu, X., Soron, G., Cooper, B., Brayton, C., et al. (2002). p53 mutant mice that display early ageing-associated phenotypes. *Nature* 415, 45–53.
- Ugalde, A.P., Español, Y., and López-Otín, C. (2011). Micromanaging aging with miRNAs: New messages from the nuclear envelope. *Nucleus* 2, 549–555.
- Ullrich, N.J., and Gordon, L.B. (2015). Hutchinson–Gilford progeria syndrome. In *Handbook of Clinical Neurology*, (Elsevier), pp. 249–264.
- Varela, I., Cadiñanos, J., Pendás, A.M., Gutiérrez-Fernández, A., Folgueras, A.R., Sánchez, L.M., Zhou, Z., Rodríguez, F.J., Stewart, C.L., Vega, J.A., et al. (2005). Accelerated ageing in mice deficient in Zmpste24 protease is linked to p53 signalling activation. *Nature* 437, 564–568.
- Varela, I., Pereira, S., Ugalde, A.P., Navarro, C.L., Suárez, M.F., Cau, P., Cadiñanos, J., Osorio, F.G., Foray, N., Cobo, J., et al. (2008). Combined treatment with statins and aminobisphosphonates extends longevity in a mouse model of human premature aging. *Nature Medicine* 14, 767–772.

- Viallard, J.F., Lacombe, F., Belloc, F., Pellegrin, J.L., and Reiffers, J. (2001). Mécanismes moléculaires contrôlant le cycle cellulaire : aspects fondamentaux et implications en cancérologie. *Cancer/Radiothérapie* 5, 109–129.
- Vidak, S., Kubben, N., Dechat, T., and Foisner, R. (2015). Proliferation of progeria cells is enhanced by lamina-associated polypeptide 2 α (LAP2 α) through expression of extracellular matrix proteins. *Genes Dev.* 29, 2022–2036.
- Vigouroux, C., Donadille, B., Magré, J., Béréziat, V., Lascols, O., and Capeau, J. (2004). Des lipodystrophies aux syndromes de vieillissement accéléré: les laminopathies. *Sang Thrombose Vaisseaux* 16, 419–428.
- Viteri, G., Chung, Y.W., and Stadtman, E.R. (2010). Effect of progerin on the accumulation of oxidized proteins in fibroblasts from Hutchinson Gilford progeria patients. *Mechanisms of Ageing and Development* 131, 2–8.
- Wahid, F., Shehzad, A., Khan, T., and Kim, Y.Y. (2010). MicroRNAs: Synthesis, mechanism, function, and recent clinical trials. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1803, 1231–1243.
- Waldenstrom, A., and Ronquist, G. (2014). Role of Exosomes in Myocardial Remodeling. *Circulation Research* 114, 315–324.
- Wang, F., Yu, J., Yang, G.-H., Wang, X.-S., and Zhang, J.-W. (2011). Regulation of erythroid differentiation by miR-376a and its targets. *Cell Research* 21, 1196–1209.
- Wang, H., Hu, Z., Shi, F., Dong, J., Dang, L., Wang, Y., Sun, Z., Zhou, H., Zhang, S., Cao, X., et al. (2018). Osteoblast-targeted delivery of miR-33-5p attenuates osteopenia development induced by mechanical unloading in mice. *Cell Death Dis* 9, 170.
- Wang, W.-J., Cai, G.-Y., and Chen, X.-M. (2017). Cellular senescence, senescence-associated secretory phenotype, and chronic kidney disease. *Oncotarget* 8.
- Wang, Y., Panteleyev, A.A., Owens, D.M., Djabali, K., Stewart, C.L., and Worman, H.J. (2008). Epidermal expression of the truncated prelamin A causing Hutchinson-Gilford progeria syndrome: effects on keratinocytes, hair and skin. *Human Molecular Genetics* 17, 2357–2369.
- Wei, X., Huang, H., Bao, Y., Zhan, X., Zhang, L., Guo, R., Hu, N., Chen, Q., and Zhou, J. (2019). Novel long non-coding RNA AV310809 promotes TGF- β 1 induced epithelial-mesenchymal transition of human peritoneal mesothelial cells via activation of the Wnt2/ β -catenin signaling pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 513, 119–126.
- Weinberg, R.A. (1995). The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* 81, 323–330.
- Wheaton, K., Campuzano, D., Ma, W., Sheinis, M., Ho, B., Brown, G.W., and Benchimol, S. (2017). Progerin-Induced Replication Stress Facilitates Premature Senescence in Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome. *Molecular and Cellular Biology* 37.
- Williams, B.O., and Warman, M.L. (2017). CRISPR/CAS9 Technologies: CRISPR/CAS9 Technologies. *Journal of Bone and Mineral Research* 32, 883–888.
- Williams, J., Smith, F., Kumar, S., Vijayan, M., and Reddy, P.H. (2017). Are microRNAs true sensors of ageing and cellular senescence? *Ageing Research Reviews* 35, 350–363.

- Willmer, T., Hare, S., Peres, J., and Prince, S. (2016). The T-box transcription factor TBX3 drives proliferation by direct repression of the p21WAF1 cyclin-dependent kinase inhibitor. *Cell Division* *11*.
- Wong, L., Wang, J., Liew, O., Richards, A., and Chen, Y.-T. (2016). MicroRNA and Heart Failure. *IJMS* *17*, 502.
- Wu, J., Gao, F., Xu, T., Deng, X., Wang, C., Yang, X., Hu, Z., Long, Y., He, X., Liang, G., et al. (2018). miR-503 suppresses the proliferation and metastasis of esophageal squamous cell carcinoma by triggering autophagy via PKA/mTOR signaling. *Int J Oncol*.
- Wu, Y.-Y., Peck, K., Chang, Y.-L., Pan, S.-H., Cheng, Y.-F., Lin, J.-C., Yang, R.-B., Hong, T.-M., and Yang, P.-C. (2011). SCUBE3 is an endogenous TGF- β receptor ligand and regulates the epithelial-mesenchymal transition in lung cancer. *Oncogene* *30*, 3682–3693.
- Xie, M., and Steitz, J.A. (2014). Versatile microRNA biogenesis in animals and their viruses. *RNA Biol* *11*, 673–681.
- Xin, H., Liu, D., and Songyang, Z. (2008). The telosome/shelterin complex and its functions. *Genome Biology* *9*, 232.
- Xiong, X., Jung, H.J., Gombar, S., Park, J.Y., Zhang, C., Zheng, H., Ruan, J., Li, J., Kaeberlein, M., Kennedy, B.K., et al. (2015). MicroRNA transcriptome analysis identifies miR-365 as a novel negative regulator of cell proliferation in Zmpste24-deficient mouse embryonic fibroblasts. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* *777*, 69–78.
- Xiong, Z.-M., Choi, J.Y., Wang, K., Zhang, H., Tariq, Z., Wu, D., Ko, E., LaDana, C., Sesaki, H., and Cao, K. (2016). Methylene blue alleviates nuclear and mitochondrial abnormalities in progeria. *Aging Cell* *15*, 279–290.
- Yam, C.H., Fung, T.K., and Poon, R.Y.C. (2002). Cyclin A in cell cycle control and cancer. *Cell. Mol. Life Sci.* *59*, 1317–1326.
- Yang, S.H. (2006). A farnesyltransferase inhibitor improves disease phenotypes in mice with a Hutchinson-Gilford progeria syndrome mutation. *Journal of Clinical Investigation* *116*, 2115–2121.
- Yang, B., Oo, T.N., and Rizzo, V. (2006). Lipid rafts mediate H₂O₂ pro-survival effects in cultured endothelial cells. *FASEB J.* *20*, 1501–1503.
- Yang, J., Chen, D., He, Y., Meléndez, A., Feng, Z., Hong, Q., Bai, X., Li, Q., Cai, G., Wang, J., et al. (2013). MiR-34 modulates *Caenorhabditis elegans* lifespan via repressing the autophagy gene atg9. *AGE* *35*, 11–22.
- Yang, S.H., Qiao, X., Farber, E., Chang, S.Y., Fong, L.G., and Young, S.G. (2008). Eliminating the Synthesis of Mature Lamin A Reduces Disease Phenotypes in Mice Carrying a Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome Allele. *Journal of Biological Chemistry* *283*, 7094–7099.
- Zarse, K., Schmeisser, S., Groth, M., Priebe, S., Beuster, G., Kuhlow, D., Guthke, R., Platzer, M., Kahn, C.R., and Ristow, M. (2012). Impaired Insulin/IGF1 Signaling Extends Life Span by Promoting Mitochondrial L-Proline Catabolism to Induce a Transient ROS Signal. *Cell Metabolism* *15*, 451–465.
- Zeng, W., Ball, A.R., and Yokomori, K. (2010). HP1: heterochromatin binding proteins working the genome. *Epigenetics* *5*, 287–292.

- Zhang, R., and Adams, P.D. (2007). Heterochromatin and its Relationship to Cell Senescence and Cancer Therapy. *Cell Cycle* 6, 784–789.
- Zhang, C.-L., Liu, X., He, Q.-J., Zheng, H., Xu, S., Xiong, X.-D., Yuan, Y., Ruan, J., Li, J.-B., Xing, Y., et al. (2017a). miR-342-5p promotes Zmpste24-deficient mouse embryonic fibroblasts proliferation by suppressing GAS2. *Molecular Medicine Reports* 16, 8944–8952.
- Zhang, D., Lee, H., Zhu, Z., Minhas, J.K., and Jin, Y. (2017b). Enrichment of selective miRNAs in exosomes and delivery of exosomal miRNAs in vitro and in vivo. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 312, L110–L121.
- Zhang, H., Puleston, D.J., and Simon, A.K. (2016). Autophagy and Immune Senescence. *Trends in Molecular Medicine* 22, 671–686.
- Zhang, J., Li, S., Li, L., Li, M., Guo, C., Yao, J., and Mi, S. (2015a). Exosome and Exosomal MicroRNA: Trafficking, Sorting, and Function. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics* 13, 17–24.
- Zhang, R., Chen, W., and Adams, P.D. (2007). Molecular Dissection of Formation of Senescence-Associated Heterochromatin Foci. *Molecular and Cellular Biology* 27, 2343–2358.
- Zhang, X., Azhar, G., and Wei, J.Y. (2012). The Expression of microRNA and microRNA Clusters in the Aging Heart. *PLoS ONE* 7, e34688.
- Zhang, X., Chang, A., Li, Y., Gao, Y., Wang, H., Ma, Z., Li, X., and Wang, B. (2015b). miR-140-5p regulates adipocyte differentiation by targeting transforming growth factor- β signaling. *Sci Rep* 5, 18118.
- Zheng, Y., Yin, L., Chen, H., Yang, S., Pan, C., Lu, S., Miao, M., and Jiao, B. (2012). miR-376a suppresses proliferation and induces apoptosis in hepatocellular carcinoma. *FEBS Letters* 586, 2396–2403.
- Zhu, Z.-R., He, Q., Wu, W.-B., Chang, G.-Q., Yao, C., Zhao, Y., Wang, M., and Wang, S.-M. (2018). MiR-140-3p is Involved in In-Stent Restenosis by Targeting C-Myb and BCL-2 in Peripheral Artery Disease. *J Atheroscler Thromb* 25, 1168–1181.

Résumé

La Progeria de Hutchinson-Gilford (HGPS) est une maladie génétique rare caractérisée par un vieillissement précoce et accéléré aboutissant au décès des patients vers l'âge de 14 ans. Elle est due, dans la majorité des cas, à une mutation *de novo* autosomique dominante dans l'exon 11 du gène *LMNA* (p.G608G), responsable de la synthèse d'une protéine lamine A délétée et toxique : la progérine. Au cours du vieillissement des patients, la progérine s'accumule *in vivo* dans le noyau des cellules qui l'expriment, et génère de manière dose-dépendante des anomalies nucléaires à la fois morphologiques et fonctionnelles. Ces altérations conduisent à une sénescence cellulaire prématurée, en lien avec le vieillissement précoce de ces patients. Notre équipe s'intéresse aux rôles des microARNs (miRs) dans cette maladie. Les miRs sont de petits ARNs non-codants d'une vingtaine de nucléotides régulant l'expression de gènes cibles. Une étude miRNome, menée par une approche en RT-qPCR sur des fibroblastes dermiques de témoins et de patients, nous a permis d'identifier une dérégulation de l'expression de 14 miRs sur 375 miRs testés. Parmi les 8 miRs surexprimés, 7 se situent dans un cluster de miRs d'une même région chromosomique (14q32). Nous avons démontré que la progérine était responsable de la délocalisation de ce cluster chez les patients, probablement à l'origine de la surexpression de ces miRs. Nous avons choisi d'étudier 2 miRs de ce cluster, appartenant à une même famille : miR-376a-3p et miR-376b-3p. Le miR-376a-3p est décrit dans la littérature comme inhibiteur du cycle cellulaire (en ciblant notamment CDK2) et de la prolifération. Ayant la même séquence seed, ces 2 miRs pourraient avoir des effets biologiques similaires. Ils sont par ailleurs décrits comme des inhibiteurs de l'autophagie en ciblant des acteurs clés de cette voie. Au cours de ma Thèse, je me suis focalisée sur l'étude du rôle de ces 2 miRs dans le cycle cellulaire et la sénescence dans le contexte de la Progeria. J'ai montré que la transfection de ces 2 miRs (mimics) dans des fibroblastes témoins induisait une diminution de la prolifération cellulaire et de la réplication de l'ADN, ainsi qu'une augmentation du pourcentage de cellules sénescents. J'ai montré que la surexpression de ces miRs induisait une modulation du cycle cellulaire avec une augmentation de cellules en G1/S. Au niveau protéique, je me suis particulièrement intéressée à la protéine CDK2 impliquée dans la régulation cycle cellulaire, lors de la transition de la phase G1 à la phase S. La transfection des 2 miRs entraîne une diminution de l'expression de CDK2. Mes travaux actuels consistent à étudier l'impact des antimimics dirigés contre ces 2 miRs dans les fibroblastes de patients HGPS. La transfection de ces inhibiteurs pourrait améliorer les anomalies du cycle cellulaire, la prolifération et la réplication de l'ADN des cellules HGPS. Plus récemment, nous avons réalisé une seconde étude miRNome dans le cadre du projet plus large financé par l'AFM, incluant l'étude des ARNm et des lncRNAs (longs ARNs non-codants) par NGS (séquençage haut débit) à partir des fibroblastes dermiques et de cellules dérivées d'iPSCs (MSCs et VSMCs). Cette étude a pour objectif d'identifier des voies moléculaires communes dérégulées dans la Progeria et des syndromes génétiques apparentés (HGPS-like et Syndrome Progéroïde Atypique), permettant d'envisager à terme de mêmes approches thérapeutiques. L'analyse de ce 2nd miRNome a permis d'identifier le miR-140-5p comme un nouveau candidat très pertinent, car il cible des transcrits impliqués dans le stress oxydant (NRF2 et SIRT2) et la différenciation osseuse et adipocytaire, en lien avec les atteintes tissulaires chez ces patients. L'ensemble de mes travaux permet de mieux appréhender le rôle des miRs dans la Progeria et des syndromes apparentés, étape indispensable avant d'identifier des approches thérapeutiques nouvelles dans ces maladies au pronostic sombre.

Abstract

Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome (HGPS) is a rare genetic disease characterized by early and accelerated aging leading to the death of patients around the age of 14. It is due, in most cases, to an autosomal dominant de novo mutation in exon 11 of the LMNA gene (p.G608G), responsible for the synthesis of a truncated and toxic lamin A protein called progerin. During patients aging, progerin accumulates in vivo in cells nuclei that express it, and generates dose-dependent nuclear abnormalities at morphological and functional levels. These alterations lead to premature cell senescence, linked to the premature aging of these patients. Our team is interested in the roles of microRNAs (miRs) in this disease. miRs are small non-coding RNAs of about 20 nucleotides regulating the expression of target genes. A miRNome study, conducted by a RT-qPCR approach on dermal fibroblasts of controls and patients, allowed us to identify a deregulation in the expression of 14 miRs out of 375 miRs tested. Among the 8 overexpressed miRs, 7 are in a miR cluster of the same chromosomal region (14q32). We have demonstrated that progerin is responsible for the relocation of this cluster in patients cells, probably causing overexpression of these miRs. We chose to study 2 miRs of this cluster, belonging to the same family: miR-376a-3p and miR-376b-3p. miR-376a-3p is described in the literature as a cell cycle inhibitor (targeting CDK2, in particular) and proliferation. By having the same seed sequence, these 2 miRs could have similar biological effects. They are also described as inhibitors of autophagy by targeting key players in this pathway. During my Thesis, I focused on studying the role of these 2 miRs in the cell cycle and senescence in Progeria context. I showed that transfection of these 2 miRs (mimics) into control fibroblasts induces a decrease in cell proliferation and DNA replication, as well as an increase in the percentage of senescent cells. I showed that the overexpression of these miRs induces a modulation of the cell cycle with an increase of cells in G1/S. At the protein level, I was particularly interested in the CDK2 protein involved in cell cycle regulation during the transition from G1 phase to S phase. Transfection of 2 miRs leads to a decrease in CDK2 expression. My current work is to study the impact of anti-miRs directed against these 2 miRs in fibroblasts of HGPS patients. Transfection of these inhibitors could improve cell cycle abnormalities, proliferation and replication of HGPS cell DNA. More recently, we performed a second miRNome study as part of the larger AFM-funded project, including the study of mRNAs and lncRNAs (long non-coding RNAs) by NGS (high-throughput sequencing) from dermal fibroblasts and derived-cells from iPSCs (MSCs and VSMCs). The aim of this study is to identify common deregulated molecular pathways in Progeria and related genetic syndromes (HGPS-like and Atypical Progeroid Syndrome), allowing the use of same therapeutic approaches. The analysis of this second miRNome has identified miR-140-5p as a new highly relevant candidate, because it targets transcripts involved in oxidative stress (NRF2 and SIRT2) and bone and adipocyte differentiation, in connection with tissue damages in these patients. All of my work provides a better understanding of the role of miRs in Progeria and related syndromes, which represents an essential step before identifying new therapeutic approaches in these diseases characterized by a poor prognosis.