amU Aix Marseille Université

NNT : 0000AIXM0000

THÈSE DE DOCTORAT

Soutenue à Aix-Marseille Université
le 20 Mars 2025 par

Léa Toury

Contribution des microARNs miR-140-5p / miR 140-3p et d'autres ARNs non codants à la physiopathologie de la Progeria de Hutchinson-Gilford

Discipline
Biologie santé

Spécialité
Génétique

École doctorale
ED 62 – SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

Laboratoire/Partenaires de recherche
Marseille Medical Genetics
AFM Téléthon
INSERM U1251

Composition du jury

Pr. Véronique PAQUIS Rapporteuse
Université Côte d'Azur – IRCAN, UMR 7284/INSERM U1081/UCA, Nice

Dr. Jean-Marc BRONDELLO Rapporteur
Université de Montpellier – CR HC Inserm, IRMB UMR1183, Montpellier

Pr. Corinne VIGOUROUX Examinatrice
Sorbonne Université - CRSA, AP-HP, Paris

Pr. Martin KRAHN Président du jury
Aix-Marseille Université – MMG, Inserm, AP-HM, Marseille

Pr. Patrice ROLL Directeur de thèse
Aix-Marseille Université – MMG, Inserm, AP-HM, Marseille

Dr. Élise KASPI-PEZZOLI Co-directrice de thèse
Aix-Marseille Université – MMG, Inserm, AP-HM, Marseille

Marseille Medical Genetics

AFMTÉLÉTHON INNOVER POUR GUERIR

Inserm Institut national de la santé et de la recherche médicale

Affidavit

Je soussignée, Léa Toury, déclare par la présente que le travail présenté dans ce manuscrit est mon propre travail, réalisé sous la direction scientifique de Patrice Roll et Elise Kaspi, dans le respect des principes d'honnêteté, d'intégrité et de responsabilité inhérents à la mission de recherche. Les travaux de recherche et la rédaction de ce manuscrit ont été réalisés dans le respect à la fois de la charte nationale de déontologie des métiers de la recherche et de la charte d'Aix-Marseille Université relative à la lutte contre le plagiat.

Ce travail n'a pas été précédemment soumis en France ou à l'étranger dans une version identique ou similaire à un organisme examinateur.

Fait à Marseille, le 9 décembre 2024

Cette œuvre est mise à disposition selon les termes de la Licence Creative Commons Attribution - Pas d'Utilisation Commerciale - Pas de Modification 4.0 International.

Liste de publications et participation aux conférences

1) Liste des publications réalisées dans le cadre du projet de thèse :

    1. **Toury L**, Frankel D, Airault C, Magdinier F, Roll P, Kaspi E. *miR-140-5p and miR-140-3p: Key Actors in Aging-Related Diseases?* Int J Mol Sci. 2022 Sep 28;23(19):11439. doi: 10.3390/ijms231911439. PMID: 36232738; PMCID: PMC9570089.
    2. Trani JP, Chevalier R, Caron L, El Yazidi C, Broucqsault N, **Toury L**, Thomas M, Annab K, Binetruy B, De Sandre-Giovannoli A, Levy N, Magdinier F, Robin JD. *Mesenchymal stem cells derived from patients with premature aging syndromes display hallmarks of physiological aging.* Life Sci Alliance. 2022 Sep 14;5(12):e202201501. doi: 10.26508/lsa.202201501. PMID: 36104080; PMCID: PMC9475049.
    3. **Toury L**, Frankel D, Nael S, Airault C, Novoa-del-Toro E-M, Bartoli C, Abaji M, Baudot A, Magdinier F, Kaspi E¶, Roll P¶. *miR-140-5p overexpression contributes to oxidative stress and mitochondrial dysfunction in Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome fibroblasts through NRF2 pathway.*
       En préparation - Soumission à la revue Aging Cell prévue en mars 2025.

2) Participation aux conférences et écoles d'été au cours de la période de thèses :

    1. MarMaRa Institute annual symposium 2024 – Présentation d'un Poster
    2. MarMaRa - Journée de l'entrepreneuriat, de la valorisation de la recherche & des compétences 2024
    3. 12èmes Assises de Génétique Humaine et Médicale 2024 – Présentation d'un e-Poster
    4. 4th international meeting on laminopathies 2023 – Présentation d'un Poster
    5. 11èmes Assises de Génétique Humaine et Médicale 2022 - Présentation d'un poster - Prix du poster de l'ANPGM
    6. MarMaRa - Rare diseases at the omics era: current tools for frequent challenges 2022

Résumé

La Progeria de Hutchinson-Gilford (HGPS) est une maladie génétique rare causée par la production d'une lamine A anormale appelée progérine, qui s'accumule dans le noyau de la cellule où elle exerce une toxicité dose-dépendante. Cela entraîne une sénescence cellulaire prématurée contribuant au vieillissement accéléré des patients, les premiers symptômes apparaissant vers l'âge d'un an. La maladie s'aggrave avec le temps et conduit au décès vers l'âge de 14 ans. Les patients atteints de HGPS présentent de nombreux signes cliniques caractéristiques du vieillissement, notamment des raideurs articulaires, des lésions osseuses importantes et de l'athérosclérose.

Nous avons identifié par séquençage haut débit (NGS), deux microARNs (miARNs) surexprimés provenant du même précurseur, les miR-140-5p et miR-140-3p, dans les fibroblastes dermiques de patients atteints de HGPS. En particulier, le miR-140-5p est connu pour cibler des gènes impliqués dans la différenciation des chondrocytes et des ostéoblastes, ainsi que dans la régulation du stress oxydatif par la voie NRF2.

Afin d'étudier le rôle potentiel de ces miARNs dans la Progeria, nous avons utilisé divers modèles humains et murins. Ceux-ci comprennent la manipulation *in vitro* de ces miARNs par transfection de fibroblastes de patients et de témoins, la différenciation en chondrocytes et ostéoblastes de cellules souches mésenchymateuses (MSCs) provenant de cellules souches pluripotentes induites (iPSC) de HGPS et de témoins, l'isolement de chondrocytes et d'ostéoblastes de souris nouveau-nées témoins et HGPS (modèle KI *Lmna*$^{G609G/G609G}$), et la collecte de tissus de ces souris à différents âges. Mes résultats mettent en évidence une altération de l'expression de NRF2 associée à la surexpression du miR-140-5p dans les fibroblastes HGPS, conduisant à une augmentation du stress oxydatif et à une inhibition de la fonction mitochondriale. Mes travaux montrent également une augmentation de l'expression des deux miARNs dans les VSMC isolées de l'aorte de jeunes souris HGPS (1 mois), alors que leur expression diminue dans l'aorte, le tissu adipeux et les os de souris HGPS très âgées (4 mois). Mes résultats suggèrent une contribution de la famille des miR-140 à la physiopathologie de la Progeria de Hutchinson-Gilford.

La compréhension des mécanismes par lesquels ces deux miARNs exercent un contrôle épigénétique doit permettre d'améliorer significativement notre connaissance de la physiopathologie de la Progeria et potentiellement d'ouvrir de nouvelles voies thérapeutiques.

Mots clés : microARN, Progeria, vieillissement, stress oxydatif, cellules souches pluripotentes induites

Abstract

Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome (HGPS) is a rare genetic disorder caused by the production of an abnormal form of lamin A, known as progerin, which accumulates in the cell nucleus and exerts dose-dependent toxicity. This leads to premature cellular senescence, contributing to the accelerated aging observed in patients, with symptoms typically appearing around the age of one. The disease worsens over time and usually results in death by the age of 14. Patients with HGPS exhibit many clinical signs characteristic of aging, such as joint stiffness, significant bone lesions, and atherosclerosis.

Through high-throughput sequencing (NGS), we identified two overexpressed microRNAs (miARNs), miR-140-5p and miR-140-3p, originating from the same precursor in the dermal fibroblasts of HGPS patients. Notably, miR-140-5p is known to target genes involved in chondrocyte and osteoblast differentiation, as well as in oxidative stress regulation via the NRF2 pathway.

To investigate the potential role of these microRNAs in Progeria, we utilized various human and mouse models. These included the in vitro manipulation of these microRNAs by transfecting fibroblasts from patients and controls, differentiation into chondrocytes and osteoblasts from HGPS and control induced pluripotent stem cells (iPSC) -derived mesenchymal stem cells (MSCs), isolation of chondrocytes and osteoblasts from newborn mice (HGPS KI *Lmna*$^{G609G/G609G}$ model), and tissue collection from these mice at different ages.

My findings highlight altered NRF2 expression associated with the overexpression of miR-140-5p in HGPS fibroblasts, leading to increased oxidative stress and mitochondrial dysfunction. Furthermore, my work shows an increased expression of both microRNAs in VSMCs isolated from the aortas of young HGPS mice (1 month old), while their expression decreases in the aorta, adipose tissue, and bones of very old HGPS mice (4 months old). These results suggest that the miR-140 family contributes to the pathophysiology of Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome.

Understanding the mechanisms through which these two microRNAs exert epigenetic control could significantly enhance our knowledge of the disease's pathophysiology and potentially open new therapeutic avenues.

Keywords: microRNAs, Progeria, aging, oxidative stress, induced pluripotent stem cells

Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier sincèrement le Pr Patrice Roll et le Dr Elise Kaspi, mes directeurs de thèse, pour leur encadrement, leurs conseils avisés, et leur disponibilité tout au long de ce parcours. Leur rigueur scientifique et leur soutien indéfectible ont été essentiels à l'aboutissement de ce travail.

Aux autres membres de l'équipe PR, Diane, Sara, Mario, Coraline et Alice, je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance. Votre aide et vos encouragements ont été une véritable bouffée d'oxygène dans les moments de doute ou de fatigue. Merci pour votre amitié et pour avoir partagé cette aventure avec moi.

Je n'oublie pas mes collègues du laboratoire MMG, dont la bonne humeur, l'entraide et les discussions enrichissantes ont rendu ces années de recherche plus agréables et stimulantes. Merci pour les moments partagés.

Enfin, je tiens à exprimer ma gratitude envers ma famille et mes proches, en particulier mes parents, Marie, Rémy (et Margot) pour leur amour, leur patience et leur soutien indéfectible tout au long de cette aventure. Leur présence à mes côtés a été une source de force et de motivation inestimable.

À tous ceux qui ont contribué, de manière directe ou indirecte, à l'accomplissement de cette thèse, je vous adresse mes remerciements les plus sincères.

Table des matières

AFFIDAVIT **2**

LISTE DE PUBLICATIONS ET PARTICIPATION AUX CONFERENCES **3**

RESUME **4**

ABSTRACT **5**

REMERCIEMENTS **6**

TABLE DES MATIERES **7**

LISTE DES ABREVIATIONS **9**

LISTE DES FIGURES **11**

LISTE DES TABLEAUX **12**

PREMIERE PARTIE : INTRODUCTION **13**

1. LAMINES ET LAMINOPATHIES **14**

1.1. LES LAMINES, PRINCIPAUX CONSTITUANTS DE LA MATRICE NUCLEAIRE 14

1.1.1. Synthèse, structure, et organisation *14*

1.1.1.1. Synthèse 14

1.1.1.2. Structure 15

1.1.1.3. Organisation 17

1.1.2. Fonctions *19*

1.1.2.1. Architecture du noyau 19

1.1.2.2. Mécanotransduction 20

1.1.2.3. Organisation de la chromatine 21

1.1.2.4. Homéostasie des télomères 21

1.1.2.5. Métabolisme de l'ADN 22

1.2. LES LAMINOPATHIES, PATHOLOGIES TRES HETEROGENES AU NIVEAU CLINIQUE ET GENETIQUE 23

1.2.1. Classification *23*

1.2.2. Les laminopathies systémiques *24*

1.2.2.1. Introduction – Description 24

1.2.2.2. La Progeria de Hutchinson-Gilford et syndromes apparentés 26

1.2.2.2.1. Introduction et définition (HGPS, HGPS-like, APS) 26

1.2.2.2.2. Clinique 26

1.2.2.2.3. Physiopathologie 27

1.2.2.2.4. Conséquences cellulaires de la mutation 28

1.2.2.2.4.1. Anomalies nucléaires 28

1.2.2.2.4.2. Désorganisations épigénétiques 29

1.2.2.2.4.3. Anomalies de voies de signalisation et de différentiation 30

1.2.2.2.4.4. Instabilité génomique et métabolisme de l'ADN 31

1.2.2.2.4.5. Raccourcissement des télomères 32

1.2.2.2.4.6. Dysfonctionnements mitochondriaux 32

1.2.2.2.4.7. Stress oxydant 33

1.2.2.2.4.8. Inflamm'aging et SASP 34

1.2.2.2.4.9. Sénescence cellulaire 35

1.2.2.2.4.10. Épuisement des cellules souches 36

1.2.2.2.5. Modèles animaux 36

1.2.2.2.5.1. Murins 36

1.2.2.2.5.2. Minipig 39

1.2.2.2.5.3. Poisson-zèbre (Zebrafish) 40

1.2.2.2.6. Stratégies thérapeutiques 41

1.2.2.2.6.1. Réparation de la mutation 41

1.2.2.2.6.2. Inhibition de l'épissage aberrant 44

1.2.2.2.6.3. Diminution de la toxicité de la progérine 44

1.2.2.2.6.4. Augmentation de la clairance de la progérine ... 46
1.2.2.2.6.5. Réduction des effets néfastes de l'accumulation de progérine ... 47

2. AUTRES SYNDROMES PROGEROÏDES HORS LAMINOPATHIES ... 48

3. LES ARNS NON CODANTS ... 49

3.1. INTRODUCTION ... 49
3.2. LES MICROARNS ... 50
3.2.1. Synthèse ... 50
3.2.2. Mécanismes d'action ... 51
3.2.3. Rôles physiologiques ... 53
3.2.4. Implication des microARNs en pathologie humaine ... 54
3.2.5. Outils thérapeutiques ... 55
3.2.5.1. Les antimiRs ... 55
3.2.5.2. Les mimics ... 55
3.2.5.3. Les bloqueurs de sites cibles (Target Site Blockers) ... 56
3.3. LES LONGS ARNS NON-CODANTS ... 56
3.3.1. Classification ... 57
3.3.2. Synthèse ... 58
3.3.3. Mécanisme d'action ... 59
3.3.3.1. LncARNs nucléaires ... 59
3.3.3.2. LncARNs cytoplasmiques ... 60
3.3.4. Implication des lncARNs en pathologie humaine ... 61

4. ARNS NON CODANTS ET VIEILLISSEMENT ... 62

4.1. VIEILLISSEMENT PHYSIOLOGIQUE ... 62
4.2. PROGERIA DE HUTCHINSON-GILFORD ... 63

DEUXIEME PARTIE : RESULTATS ... 67

1. AVANT-PROPOS ... 68

ARTICLE 1 (REVUE) – MIR-140 ET VIEILLISSEMENT ... 70

2. RATIONNEL DE L'ETUDE, HYPOTHESE ET OBJECTIFS ... 71

3. RESULTATS ... 72

3.1. ARTICLE 3 ... 73
3.2. MISE EN PLACE DE MODELES CELLULAIRES A PARTIR D'HIPSC DE PATIENTS POUR L'ETUDE DES ALTERATIONS OSSEUSES DANS LA PROGERIA DE HUTCHINSON-GILFORD ... 74
3.2.1. Différenciation chondrocytaire ... 75
3.2.2. Différenciation ostéoblastique ... 77
3.2.3. Cinétique d'expression tissulaire des miR-140 ... 79
3.2.4. Cultures primaires de chondrocytes et d'ostéoblastes murins ... 80
3.2.4.1. Chondrocytes ... 80
3.2.4.1.1. Chondrocytes articulaires murins immatures (iMACs) ... 80
3.2.4.1.2. Chondrocytes costaux ... 81
3.2.4.2. Ostéoblastes ... 82
3.3. IDENTIFICATIONS DE LNCARNS CANDIDATS POTENTIELLEMENT IMPLIQUES DANS LA PHYSIOPATHOLOGIE DE LA PROGERIA DE HUTCHINSON-GILFORD – ALTERATIONS DE LA REGION 14Q3.2 (HOMME) ET 10Q (SOURIS) ... 83

4. DISCUSSION ET PERSPECTIVES ... 86

CONCLUSION GENERALE ... 90

ANNEXES ... 91

ARTICLE 2 ... 93

BIBLIOGRAPHIE ... 94

Liste des abréviations

ABE : Editeur de base adénine

AONs : Oligonucléotides morpholino antisens

APS : Atypical Progeria Syndrome

ARNm : ARN messager

ARNnc : ARN non codants

AWS : Syndrome de Werner atypique

BAF : Barrier-to-autointegration factor

BANF1 : BAF nuclear assembly factor 1

cGAS : Cytoplasmic cyclic GMP-AMP synthase

DDR : Réponse aux dommages de l'ADN

eARNs : ARN enhancer

ECM : Matrice extracellulaire

FT : Farnésyl-transférase

FTI : Inhibiteurs de la farnésyltransférase

hBM-MSCs : human Bone Marrow-MSCs

HDAC : Histone désacétylases

HGPS : Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome

HP1 : Heterochromatin protein 1

ICMT : Isoprényl-Cystéine- Carboxy-Méthyl-Transférase

iPSC : Cellules souches pluripotentes induites

KASH : Klarsicht, ANC-1 et Syne/Nesprin homologue

LAD : Domaines associés à la *lamina*

LAP : Lamina-associated polypeptide

LBR : Récepteur de la lamine B

LINC : Links the Nucleoskeleton and Cytoskeleton

lincARN : LncARNs intergéniques

lncARNs : longs ARN non codants

MAD : Dysplasie Acro-Mandibulaire

MADaM : Dysplasie acromandibulaire associée à MTX2

MAR : Matrix Attachment Regions

MEFs : Fibroblastes embryonnaires murins

miARN : microARN

MSC : Cellules souches mésenchymateuses

NAC : N-acétylcystéine

NGPS : Progeria de Nestor-Guillermo

NLS : Signal de localisation nucléaire

NPC : Pore nucléaire

pré-miARN : Précurseur du miARN

pri-miARN : miARN primaire

RD : Dermopathie restrictive

RE : Réticulum endoplasmique

RFC : Replication Factor C

ROS : Espèces réactives de l'oxygène

SASP : phénotype sécrétoire associé à la sénescence

sgARN : ARN guide unique

SUN : Sad1 et UNC-84

TSB : Target Site Blockers

UTR : untranslated region

VSMC : cellules musculaires lisses vasculaires

Liste des figures

Figure 1 : Biosynthèse des lamines A et C. 14
Figure 2 : Les étapes de maturation post-traductionnelle des prélamines pour générer des lamines A et B matures. 15
Figure 3 : Schéma de la structure des filaments intermédiaires cytoplasmiques et des lamines. 16
Figure 4 : Représentation schématique de la formation des filaments intermédiaires de lamines. 16
Figure 5 : Exemples d'éléments du cytosquelette avec leur diamètre respectif : microtubule, actine, vimentine et lamines. 17
Figure 6 : Les protéines associées aux lamines et leurs fonctions. 19
Figure 7 : Différentes mutations du gène *LMNA* provoquent des maladies qui affectent les muscles striés, le tissu adipeux, les nerfs périphériques ou sont multi-systèmes avec des caractéristiques de vieillissement accéléré. 24
Figure 8 : Patient néerlandais atteint de Progeria, à différents âges. 27
Figure 9: Maturation post-traductionnelle de la progérine. 28
Figure 10 : Altérations nucléaires dans des fibroblastes HGPS. 29
Figure 11 : Photographie d'une souris *Zmpste24*$^{-/-}$. 37
Figure 12 : Phénotype des souris Lmna $^{G609G/+}$ et Lmna $^{G609G/G609G}$. 39
Figure 13 : Photographie montrant l'apparence des minipigs HGPS à la naissance et après 5,5-6 mois de vie. 40
Figure 14 : Phénotype des poissons zprogerin et zprelamin A. 41
Figure 15 : Résultats de l'édition de bases du gène LMNA sur des fibroblastes de patients et sur un modèle murin de Progeria. 43
Figure 16 : Noyaux de fibroblastes HGPS avec et sans traitement par lonafarnib. 45
Figure 17 : Stratégies de traitement de la progéria et leurs cibles. 48
Figure 18 : Synthèse des miARNs et leurs mécanismes d'action. 51
Figure 19 : Principes des interactions miARN-ARNm. 52
Figure 20 : Mécanismes proposés pour la répression post-transcriptionnelle des ARNm par les miARNs. 53
Figure 21 : Mode d'action des antimiRs, des mimics et des TSB. 56
Figure 22 : Classification des lncARNs. 58
Figure 23 : miARNs et leurs cibles, impliqués dans le vieillissement pathologique. 66
Figure 24 : Confirmation du phénotype des MSCs (CD70+, CD90+, CD105 +, CD45-, CD34-) par cytométrie en flux 75
Figure 25 : Évolution de l'expression des miR-140 avant et après différenciation des lignées MSCs témoin (4603) ou MSC HGPS (AG08243) en chondrocytes. 76
Figure 26 : Comparaison de l'expression des miR-140 entre les lignées témoins (4603) et HGPS (AG08243) à J0 et J21 de différenciation 77
Figure 27 : Coloration en rouge alizarine des cellules témoins (AG08498 P10) différenciées à l'aide du premier protocole. 78
Figure 28 : Coloration au rouge alizarine (panel du haut) et à la phosphatase alcaline (Panel du bas) des cellules témoins AG08498 P11 différenciées avec le deuxième protocole. 78
Figure 29 : Expression des miARN-140-5p et 140-3p dans les tissus des souris Lmna $^{G609G/G609G}$ à différents âges comparés à celle de souris WT. 80
Figure 30 : Expression des miR-140 dans des chondrocytes primaires costaux. 82
Figure 31 : Expression de Dnpep dans des chondrocytes primaires costaux. 82
Figure 32 : Schéma de la région 14q3.2. 83
Figure 33 : Localisation des 50 premiers miARNs surexprimés dans le transcriptome des VSMCs de souris Lmna $^{G609G/G609G}$. 84

Liste des tableaux

Tableau 1 : miARNs et pathologies..... 54
Tableau 2 : Surexpression des lncARNs candidats de la région 12q du transcriptome VSMC murin 85

Première partie : Introduction

1. Lamines et laminopathies

1.1. Les lamines, principaux constituants de la matrice nucléaire

Les lamines appartiennent à la famille des filaments intermédiaires de type V. Elles sont les principaux composants de la matrice nucléaire ou nucléosquelette, incluant la *lamina* nucléaire, une région spécialisée de la matrice localisée sous l'enveloppe nucléaire avec laquelle les lamines interagissent. Elles jouent un rôle essentiel dans l'organisation morpho-fonctionnelle du noyau. On distingue deux types de lamines : les lamines de type A, qui regroupent principalement les lamines A et C, et les lamines de type B, regroupant les lamines B1, B2 et B3. Ces deux types de lamines se différencient par leur mode d'expression et par leurs propriétés, ce qui détermine leur localisation spécifique dans le nucléoplasme (Vahabikashi et al., 2022).

1.1.1. Synthèse, structure, et organisation

1.1.1.1. Synthèse

Les lamines de type A sont codées par le gène *LMNA*, localisé sur le chromosome 1q21.2- q21.3. Ce gène est composé de 12 exons. Il permet la production par épissage alternatif du pré-ARNm de la prélamine A (issue des exons 1 à 12, incluant partiellement l'exon 10) et la lamine C (issue des exons 1 à 9 et de l'intégralité de l'exon 10) **(Figure 1)**.

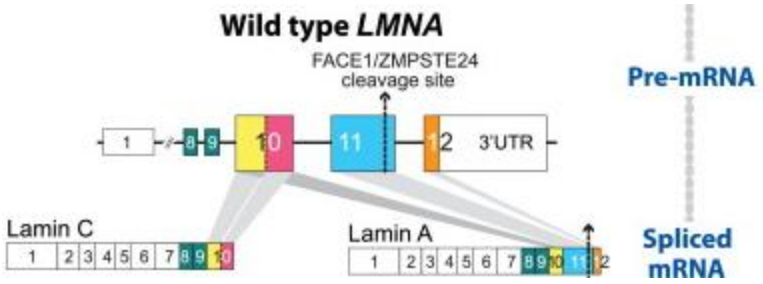


Figure 1 : Biosynthèse des lamines A et C.
D'après Cau *et al.*, *« Nuclear matrix, nuclear envelope and premature aging syndromes in a translational research perspective ».* Seminars in Cell & Developmental Biology, 2014.

Après sa synthèse, la prélamine A subit des modifications post-traductionnelles pour devenir une protéine mature, la lamine A **(Figure 2)** :

- La prélamine A est d'abord farnésylée par la farnésyl-transférase (FT) au niveau d'une séquence de type CaaX portée à son extrémité C-terminale. Le groupement farnésyl ancre la prélamine A à la membrane d'enveloppe du réticulum endoplasmique (RE), sur le versant cytosolique.
- Le motif CaaX farnésylé est reconnu par la protéase ZMPSTE24/FACE1 qui clive les 3 acides aminés C-terminaux.
- La cystéine en C-terminal subit une carboxy-méthylation par l'Isoprényl-Cystéine-Carboxy-Méthyl-Transférase (ICMT).

- L'enzyme ZMPSTE24/FACE1 clive, enfin, les 15 derniers acides aminés en C-terminal, générant la lamine A mature en la séparant du groupement farnésyl qui la maintenait ancrée à la membrane du RE. Cette lamine A devenue soluble, est alors importée dans le noyau grâce à son signal de localisation nucléaire (NLS).

La lamine C, dépourvue de la séquence consensus de prénylation CaaX, est synthétisée directement sous sa forme mature qui est soluble.

D'autres isoformes minoritaires existent, telles que la lamine C2, spécifique des cellules germinales mâles, et la lamine AΔ10, identifiée dans une lignée d'adénocarcinome pulmonaire (Furukawa et al., 1994; Machiels et al., 1996).

La lamine B1 est codée par le gène *LMNB1*, situé sur le chromosome 5q23.3-q31.1. La lamine B2 et la lamine B3 sont codées par le gène *LMNB2*, situé sur le chromosome 19p13.3, et résultent d'un épissage alternatif. Comme la lamine A, les lamines de type B sont synthétisées sous forme de précurseurs. Les prélamines B subissent les trois premières étapes des modifications post-traductionnelles décrites pour la prélamine A, mais pas la quatrième et dernière étape. Ainsi, les lamines de type B restent physiologiquement ancrées à la membrane d'enveloppe du RE, sur le versant cytosolique, avant d'être importées dans le noyau grâce à leur séquence de localisation nucléaire (NLS).

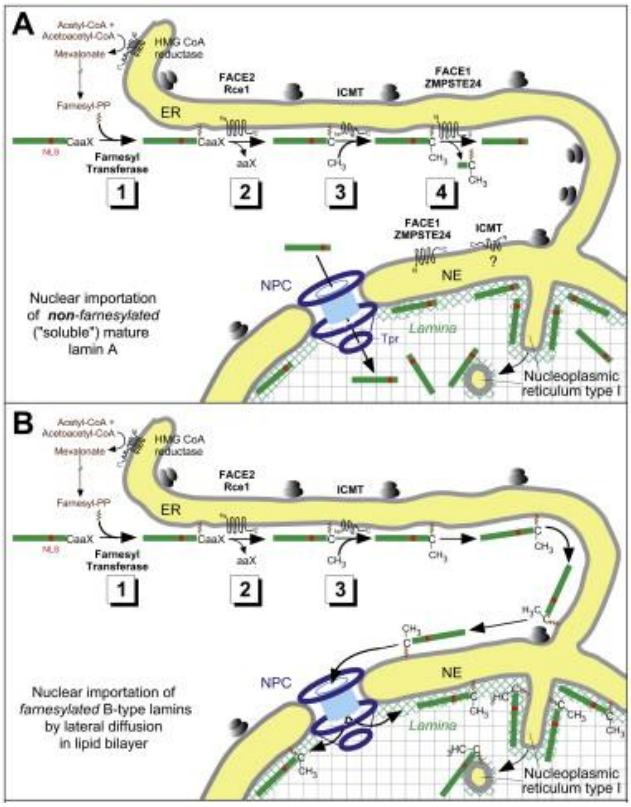


Figure 2 : Les étapes de maturation post-traductionnelle des prélamines pour générer des lamines A et B matures.
A/ 4 étapes de maturation pour générer la lamine A
B/ 3 étapes de maturation pour générer les lamines de type B
NPC : pore nucléaire ; ER : réticulum endoplasmique ; NE : nuclear envelope ; ICMT : isoprenylcystéine caroboxyl methyltransférase. D'après Cau *et al.*, *« Nuclear matrix, nuclear envelope and premature aging syndromes in a translational research perspective ».* Seminars in Cell & Developmental Biology, 2014.

1.1.1.2. Structure

Les lamines partagent des similitudes structurales avec les autres types de filaments intermédiaires cytoplasmiques. Leur structure se compose de trois domaines distincts :

- Un domaine N-terminal (tête), d'environ 30 acides aminés.
- Un domaine central en hélice α de 50 nm de long, contenant quatre sous-domaines (1A, 1B, 2A et 2B) séparés par des domaines de liaison (L1, L12 et L2).

- Un domaine C-terminal (queue), qui contient un domaine de type immunoglobuline et une séquence NLS (Nuclear Localization Signal).

Les lamines possèdent six motifs répétés dans le sous-domaine 1B, qui leur sont spécifiques. Certaines lamines possèdent également un motif CaaX en C-terminal **(Figure 3)** (Vahabikashi et al., 2022).

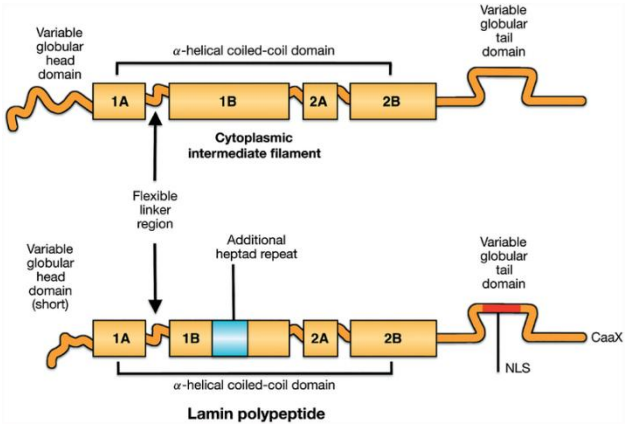


Figure 3 : Schéma de la structure des filaments intermédiaires cytoplasmiques et des lamines.
NLS : signal de localisation nucléaire. Adapté de Worman, *« Nuclear lamins and laminopathies »*.
Journal of Pathology, 2012.

Les monomères de lamines s'assemblent pour former des filaments. Les monomères se combinent d'abord en dimères, qui s'associent ensuite en tétramères. Ces tétramères s'alignent bout à bout pour créer des protofilaments, lesquels se polymérisent pour former les filaments intermédiaires complets **(Figure 4)**. Les filaments de lamines ont un diamètre de 3,5 nm et sont donc de plus petit diamètre que les filaments intermédiaires cytoplasmiques **(Figure 5)** (Turgay et al., 2017).

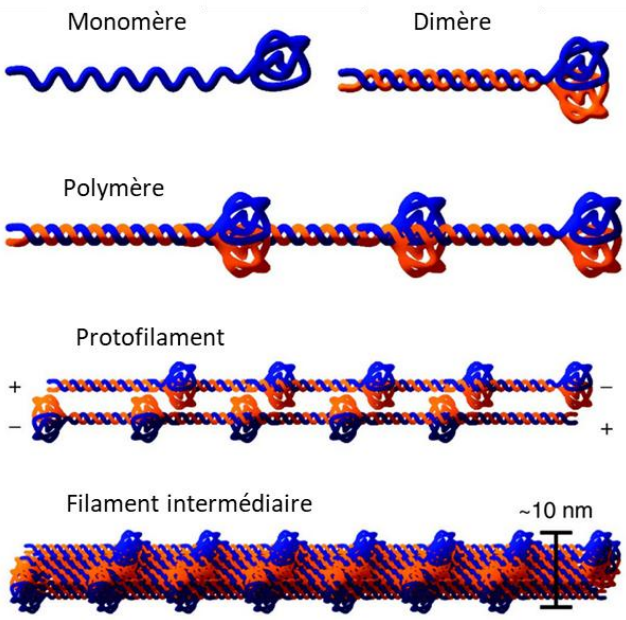


Figure 4 : Représentation schématique de la formation des filaments intermédiaires de lamines.
D'après Dittemer et Misteli, *« The lamin protein family ».* Genome Biology, 2011.

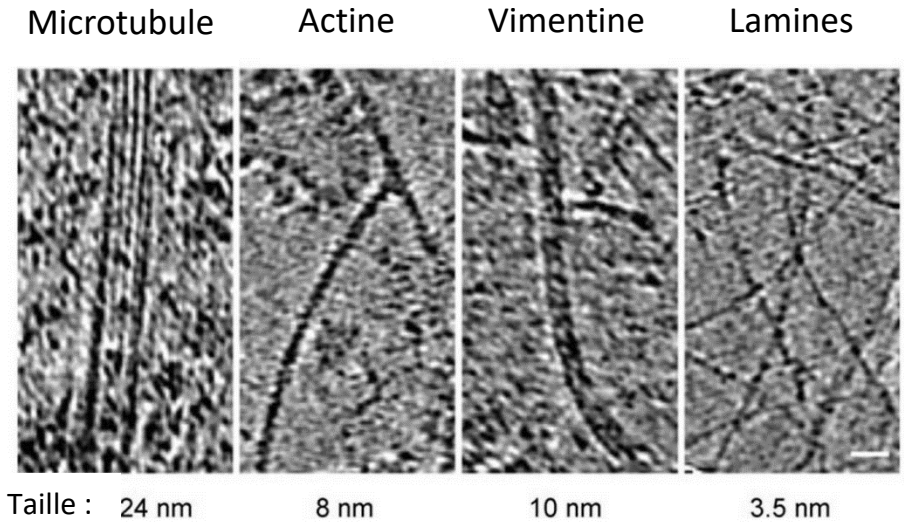


Figure 5 : Exemples d'éléments du cytosquelette avec leur diamètre respectif : microtubule, actine, vimentine et lamines.
Adapté de Turgay *et al*., *« The molecular architecture of lamins in somatic cells »*. Nature, 2017.

1.1.1.3. Organisation

Dans le noyau, les lamines sont localisées dans l'ensemble du nucléoplasme, où chaque isoforme des lamines forme un réseau fibrillaire distinct tout en étant interdépendant des autres, contribuant ainsi à la structure de la matrice nucléaire. Les lamines sont indispensables à la formation de ce réseau ; la perte de lamines A, C ou B1 entraîne des altérations significatives du réseau nucléosquelettique, alors que l'absence de lamine B2 provoque des dommages mineurs (Shimi et al., 2015). Les lamines participent à la formation d'un réseau à la périphérie du nucléoplasme, appelé *lamina* nucléaire, qui interagit avec l'enveloppe nucléaire et les complexes des pores nucléaires (NPC) (Turgay et al., 2017). Les lamines de type A, solubles, sont localisées dans le nucléoplasme ainsi que dans la *lamina* et sont très mobiles, tandis que les lamines de type B sont ancrées à l'enveloppe nucléaire sur sa face nucléoplasmique et ne sont localisées qu'au niveau de la *lamina.* Cependant, les lamines de type B peuvent également être présentes dans le nucléoplasme périnucléolaire lorsque l'enveloppe nucléaire s'invagine à l'intérieur du noyau (Cau et al., 2014a). Lors de la mitose, les lamines de type A et de type B sont phosphorylées et se désassemblent, participant ainsi à la disparition de l'enveloppe nucléaire, avant d'être réintégrées durant la télophase pour reformer l'enveloppe nucléaire.

Les lamines de type B sont exprimées dès le début du développement embryonnaire, tandis que les lamines de type A commencent à être exprimées aux jours 9-10 du développement. L'expression des lamines de type A est étroitement liée à la différenciation cellulaire. Le ratio des lamines de type A par rapport aux lamines de type B varie selon les types cellulaires, en fonction de leur rôle et de leur capacité de déformation. Les tissus mous, tels que le rein, le foie et le cerveau, expriment faiblement les lamines A/C, tandis que les tissus plus rigides, comme les os, les expriment fortement (Dechat et al., 2008a).

De nombreuses protéines du nucléoplasme et de l'enveloppe nucléaire sont associées aux lamines (lamin-binding proteins / lamin associated proteins). Ensemble, elles régulent l'architecture du noyau et l'expression des gènes en modifiant l'organisation de la chromatine **(Figure 6)**.

- Le complexe LINC (Links the Nucleoskeleton and Cytoskeleton) permet de lier physiquement le cytosquelette à la *lamina* nucléaire. Il est composé d'un dimère de protéines à domaines SUN (Sad1 et UNC-84), situées au niveau de la face nucléoplasmique de l'EN qui fixent les lamines, et de protéines KASH (Klarsicht, ANC-1 et Syne/Nesprin homologue) situées au niveau de la face cytoplasmique de l'EN qui lient le cytosquelette (Starr & Fridolfsson, 2010). Lors de la méiose chez les mammifères, la protéine SUN1 permet de relier les chromosomes à l'enveloppe nucléaire, un processus essentiel à l'appariement des chromosomes homologues (Gruenbaum & Foisner, 2015a).

- Les protéines à domaines LEM permettent la liaison des lamines à l'hétérochromatine via la protéine BAF (barrier-to-autointegration factor). Parmi cette famille de protéines se trouvent les protéines LAP (lamina-associated polypeptide), dont l'isoforme 2α est un des partenaires principaux des lamines de type A. Cette protéine a la particularité de pouvoir directement lier l'ADN grâce à son motif LEM-like en N-terminal. C'est également la seule isoforme de la famille des protéines LAP2 non associée à l'enveloppe nucléaire, elle peut ainsi se fixer aux lamines de type A du nucléoplasme. (Gruenbaum & Foisner, 2015a).

- Le récepteur de la lamine B (LBR) est une protéine de la face nucléoplasmique de l'EN composée de huit domaines transmembranaires. Elle permet de relier les lamines B à l'hétérochromatine et à la protéine HP1 (heterochromatin protein 1) (Gruenbaum & Foisner, 2015a; Robin & Magdinier, 2016).

- Les NPCs (nuclear pore complexes) sont des assemblages macromoléculaires de multiples copies de protéines différentes, les nucléoporines qui assurent un transport bidirectionnel régulé entre le noyau et le cytoplasme. Les NPCs sont localisés dans l'ensemble de l'enveloppe nucléaire et la traversent, permettant l'échange de molécules entre le cytoplasme et le nucléoplasme. La partie cytoplasmique des NPCs interagit avec le cytosquelette, tandis que la partie nucléoplasmique interagit avec le la matrice nucléaire (Kittisopikul et al., 2021; Xie et al., 2016).

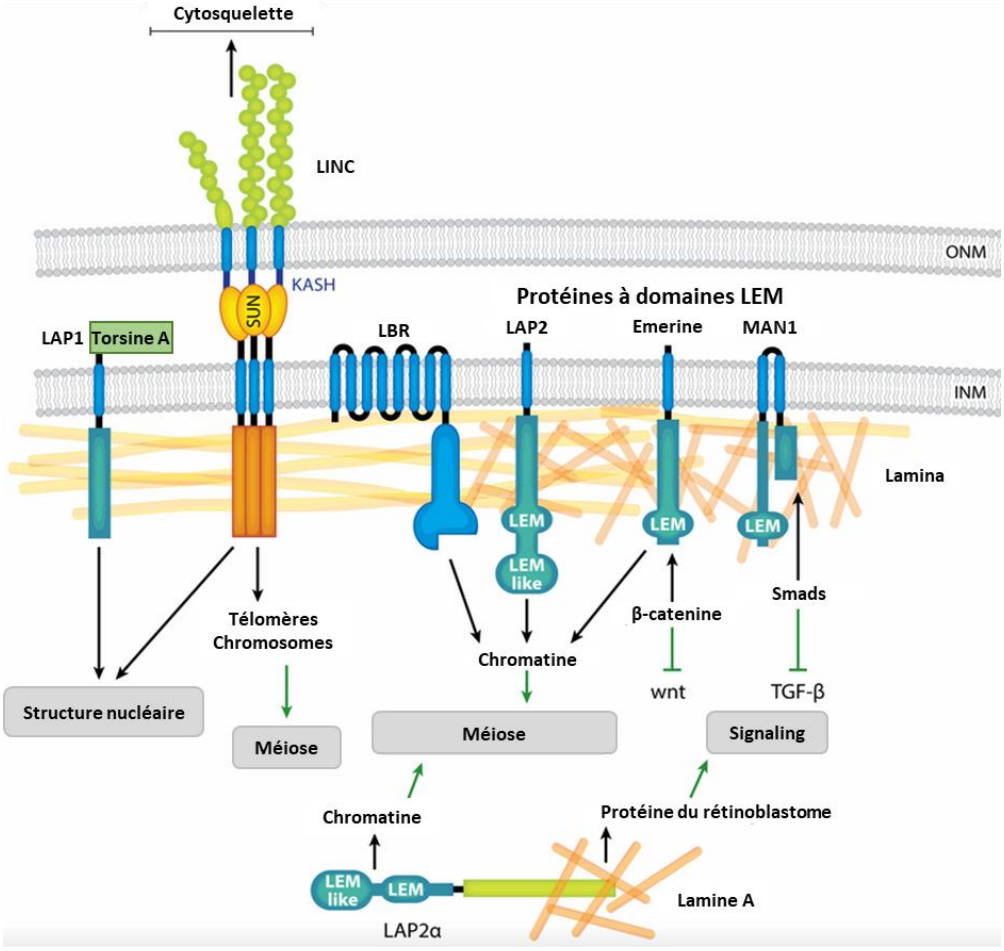


Figure 6 : Les protéines associées aux lamines et leurs fonctions.
INM (inner nuclear membrane): face nucléoplasmique de l'EN
ONM (outer nuclear membrane): face cytosolique de l'EN
Issue de Gruenbaum & Foisner, *« Lamins: Nuclear Intermediate Filament Proteins with Fundamental Functions in Nuclear Mechanics and Genome Regulation ».* Annual review of biochemistry, 2015.

1.1.2. Fonctions

1.1.2.1. Architecture du noyau

Les lamines jouent un rôle fondamental en tant qu'éléments architecturaux assurant un soutien mécanique et constituant un véritable squelette du noyau, d'où le nom de nucléosquelette ou encore matrice nucléaire. Des études *in vitro* et *in vivo*, utilisant des modèles « knockout » ou « knockdown », ont montré que l'absence de lamines entraîne des anomalies de la forme du noyau, comme des invaginations ou des petites protubérances appelées « blebs ». Par exemple, un modèle de knockdown des lamines de type A dans des fibroblastes embryonnaires de souris (MEF) s'accompagne d'une altération de l'architecture de l'enveloppe nucléaire, avec une délocalisation en cluster des NPCs (Sullivan et al., 1999; Xie et al., 2016).

En complément de leur rôle structurel, les lamines interviennent également dans la réparation des ruptures de l'EN. Des fibroblastes dépourvus de tous types de lamines nucléaires (lamines A, C, B1 et B2) subissent des ruptures fréquentes, prolongées, et parfois non réparées de l'EN (N. Y. Chen et al., 2018). Ces ruptures sont normalement

partiellement prises en charge par les lamines, qui jouent un rôle clé dans la réponse à ce stress. Lorsqu'une rupture de l'EN se produit, le contenu du noyau, y compris les protéines de la face nucléoplasmique de l'EN, la chromatine et les protéines associées, est exposé au cytoplasme. La lamine C phosphorylée (nucléoplasmique) se localise rapidement sur la chromatine aux sites de rupture, où elle forme un complexe avec BAF et la cGAS phosphorylée (cytoplasmic cyclic GMP-AMP synthase) pour activer les voies de réparation (Kono et al., 2022).

Les lamines de type A et de type B présentent des propriétés distinctes : les lamines de type A confèrent au noyau une rigidité et une résistance accrues à la déformation, tandis que les lamines de type B lui procurent des propriétés élastiques, favorisant ainsi sa déformabilité. Ces résultats suggèrent que le rapport entre les lamines de type A et celles de type B régule la rigidité nucléaire et sa déformabilité. La faible expression de la lamine A (diminution ratio lamine A/lamines A+C) dans les cellules métastatiques d'adénocarcinome pulmonaire est corrélé à une augmentation du nombre de métastases (Kaspi et al., 2017). Cela suggère que la diminution de l'expression de la lamine A dans les cellules cancéreuses facilite leur déformation et ainsi leur migration à travers les tissus.

1.1.2.2. Mécanotransduction

La mécanotransduction est le processus par lequel une pression physique provenant de l'environnement extracellulaire de la cellule est transformée en un signal intracellulaire, influençant divers mécanismes cellulaires, tels que l'expression des gènes, par décondensation (étirement) de la chromatine (Tajik et al., 2016).

La majorité des forces externes se transmettent au noyau via les complexes LINC et leurs interactions avec les lamines. En effet, l'inhibition simultanée des protéines SUN1 et SUN2, qui forment le complexe LINC et se lient aux lamines, supprime complètement la réponse du noyau aux forces de pression. La tension exercée sur le complexe LINC renforce la connexion physique avec les lamines A et C et favorise leur recrutement, mais pas celui de la lamine B, probablement en raison de la plus grande affinité des protéines SUN pour les lamines A et C. Un knockdown spécifique des lamines de type A (lamine A et C) réduit la rigidité nucléaire et empêche la réponse du noyau à des forces de pression répétées (Guilluy et al., 2014). Les forces de tensions peuvent également entraîner des changements de conformation des lamines de type A, réduisant l'accessibilité des épitopes spécifiques des lamines de type A (Ihalainen et al., 2015). À l'inverse, une contraction plus faible du noyau, augmente la phosphorylation des lamines A et C et entraîne une augmentation de leur solubilité et de leur dégradation (Buxboim et al., 2014).

L'implication des lamines dans la mécanotransduction influence directement la localisation de la chromatine dans le noyau. Sous l'application d'une force, l'inhibition des lamines de type A ou B intensifie le mouvement de la chromatine et stimule la transcription d'un transgène dans la région étirée (Tajik et al., 2016).

Les lamines contribuent également à la réponse cellulaire aux forces mécaniques par leurs interactions avec les complexes de pores nucléaires (NPCs). L'étirement de l'EN peut élargir le canal de transport des NPCs d'environ 30 nm, modifiant ainsi leur capacité de diffusion passive ou facilitée. Ce mécanisme pourrait en partie expliquer la

mécanosensibilité de divers régulateurs transcriptionnels tels que YAP, SMAD3, Snail et Twist1 en augmentant leur entrée dans le noyau au travers des NPCs (Andreu et al., 2022; Elosegui-Artola et al., 2017).

1.1.2.3. Organisation de la chromatine

Les lamines jouent un rôle essentiel dans l'organisation de la chromatine, en interagissant notamment avec les domaines associés à la *lamina* (LAD), qui sont des régions d'hétérochromatine en contact étroit avec la *lamina* nucléaire. Ces LAD, identifiés initialement chez la drosophile par Pickersgill et al., représentent chez l'Homme environ 1000 à 1500 domaines, couvrant plus d'un tiers du génome et se répartissant le long des chromosomes (Pickersgill et al., 2006; Van Steensel & Belmont, 2017). Composés d'hétérochromatine en périphérie du noyau, ces LAD présentent une faible densité en gènes et sont enrichis en marques d'histones répressives (H3K9me2, H3K9me3 et H3K27me3), associées à une activité transcriptionnelle réduite. Les lamines interagissent par ailleurs avec l'ADN dans des régions riches en A-T appelées MAR (Matrix Attachment Regions), permettant une organisation en boucles fonctionnelles de l'ADN dans le noyau, tout en régulant son métabolisme et sa réparation (K. Zhao et al., 1996).

Certains facteurs de transcription se localisent préférentiellement au niveau de la *lamina* nucléaire. Le facteur Oct-1a, par exemple, est lié à la lamine B et se dissocie lors de l'entrée en sénescence de la cellule, ce qui supprime son activité répressive sur ses gènes cibles (Gruenbaum & Foisner, 2015a). Ainsi, une perturbation dans l'organisation ou l'expression de la lamine B peut modifier l'expression des gènes régulés par ces facteurs de transcription. Les lamines de type A, quant à elles, participent à la régulation de l'activité de la protéine du rétinoblastome (Rb) via une interaction avec la protéine LAP2α, ce qui permet un contrôle négatif de la transcription par le facteur E2F, essentiel pour la progression du cycle cellulaire en phase G1 et ainsi la prolifération cellulaire. Dans des fibroblastes humains, une sous-expression des lamines A et C ou de LAP2α peut entraîner un arrêt du cycle en phase G1 (Dechat et al., 2008b).

1.1.2.4. Homéostasie des télomères

Les lamines jouent un rôle clé dans le maintien de l'homéostasie des télomères. Un dysfonctionnement télomérique, provoqué par un raccourcissement excessif des séquences répétées d'ADN à l'extrémité des chromosomes ou par une altération de la shelterine (un complexe protéique protecteur des télomères), entraîne l'entrée des cellules en apoptose ou en sénescence (Harley et al., 1990). Ces défauts sont interprétés comme des dommages de l'ADN, activant les « checkpoints » de réparation. L'interaction des lamines de type A avec les télomères est cruciale pour leur positionnement nucléaire. Par exemple, dans des fibroblastes embryonnaires de souris dépourvues de lamines de type A (MEF *Lmna*$^{-/-}$), les télomères s'accumulent en périphérie du noyau et sont raccourcis. La perte des lamines de type A engendre aussi une instabilité génomique accrue. Les lamines de type A jouent également un rôle dans l'assemblage de l'hétérochromatine télomérique (Gonzalez-Suarez et al., 2009). Les lamines influencent également la mobilité et la dynamique des télomères : des fibroblastes de souris *Lmna*$^{\Delta 8\text{-}11/\Delta 8\text{-}11}$ (souris exprimant une lamine A dépourvue de la séquence codée par les exons 8 à 11 et présentant des anomalies similaires à celles observées dans la dystrophie

musculaire d'Emery-Dreifuss) montrent des altérations de la structure, de la longueur et de la fonction des télomères, associées à des anomalies chromosomiques. De même, des fibroblastes de souris *Lmna*$^{\Delta 9/\Delta 9}$ (exprimant la lamine A dépourvue de la séquence codée par l'exon 9) présentent des télomères raccourcis et de taille anormale (Das et al., 2013). Ces anomalies du maintien de la taille des télomères soulignent l'importance des lamines de type A dans l'homéostasie télomérique.

1.1.2.5. Métabolisme de l'ADN

Au début de la phase de réplication de l'ADN, les lamines A et C forment des foci où se regroupent des protéines clés pour l'initiation de la réplication, telles que la PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) et l'ADN polymérase δ (Musich & Zou, 2009). Une altération dans l'organisation des lamines de type A pourrait ainsi affecter la réplication de l'ADN et entraîner une instabilité génomique dans les cellules. Des études ont montré que l'injection de lamine A humaine sans son extrémité N-terminale dans des extraits d'œufs de *Xenopus* (grenouille) provoquait une inhibition significative (de plus de 90 %) de la synthèse d'ADN, accompagnée d'une désorganisation des facteurs d'élongation tels que RFC (Replication Factor C) et PCNA, qui agissent comme cofacteurs de l'ADN polymérase δ, enzyme essentielle pour l'élongation de l'ADN (Moir et al., 2000).

Les lamines sont aussi impliquées dans la transcription de l'ADN. La surexpression des lamines A et C ou la perte d'expression de la lamine B1 entraîne une inhibition significative de la transcription par l'ARN polymérase II dans les cellules HeLa (Shimi et al., 2008; C. W. Tang et al., 2008). Les lamines s'associent également à plusieurs facteurs de transcription, ce qui suggère qu'elles sont impliquées dans des voies de régulation spécifiques (Dechat et al., 2010).

Les lamines jouent également un rôle majeur dans la réparation de l'ADN. Les lamines de type A apportent un soutien structurel aux foci de dommages de l'ADN en se liant à la protéine γH2AX. Cette histone est un marqueur fiable des sites de dommages double-brin de l'ADN, car il est rapidement phosphorylé au niveau de ces cassures. Les lamines de type A lient et stabilisent également 53BP1, une protéine clé dans la réparation des cassures double-brin par jonction d'extrémités non homologues, en limitant l'expression de la L-cathepsine, une cystéine protéase ciblant 53BP1 (Gruenbaum & Foisner, 2015b). Les fibroblastes embryonnaires de souris mutées *Lmna*$^{\Delta 8\text{-}11/\Delta 8\text{-}11}$ présentent un nombre accru de dommages à l'ADN, associés à une instabilité génomique généralisée. Dans ces cellules, la L-cathepsine active la dégradation de la protéine 53BP1 en réduisant l'expression des gènes *BRCA1* et *RAD51*, essentiels pour les mécanismes de réparation de l'ADN tels que la recombinaison homologue et la jonction d'extrémités non homologues (Das et al., 2013).

1.2. Les laminopathies, pathologies très hétérogènes au niveau clinique et génétique

1.2.1. Classification

Les laminopathies sont un ensemble hétérogène de maladies causées par des mutations des gènes codant les lamines de type A ou B (laminopathies primaires), ou leurs partenaires, comme *ZMPSTE24* (laminopathies secondaires). Certaines sont tissu-spécifiques tandis que d'autres sont systémiques. On regroupe les laminopathies en 4 catégories en fonction du ou des tissus qu'elles atteignent **(Figure 7)** :

- **Laminopathies avec atteinte musculaire :**
  - Dystrophie musculaire d'Emery-Dreifuss de type 2 (OMIM #181350) et 3 (OMIM #616516)
  - Cardiomyopathie dilatée de type 1A (OMIM #115200)
  - Syndrome « main-cœur » type Slovénien (OMIM #610140)
  - Dystrophie musculaire congénitale (OMIM #613205)
- **Laminopathies avec atteinte du tissu adipeux :**
  - Dystrophie partielle familiale de type Dunningan (OMIM #151660)
  - Syndrome « lipoatrophie généralisée, diabète insulino-résistant, papules leucomélanodermiques disséminées, stéatose hépatique et cardiomyopathie » (OMIM # 608056)
- **Laminopathies avec neuropathie périphérique :**
  - Maladie de Charcot-Marie-Tooth type 2B1 (OMIM #605588)
- **Laminopathies systémiques :**
  - Dermopathie restrictive (OMIM #275210)
  - Syndrome de Werner atypique (OMIM # 277700)
  - Dysplasie acromandibulaire (OMIM #248370)
  - Progeria de Hutchinson-Gilford (OMIM #176670)
  - Syndromes « HGPS-like »
  - Syndromes progéroïdes atypiques
  - Autres syndromes progéroïdes

Les laminopathies peuvent également résulter de mutations dans les gènes codant pour les lamines B, comme dans le cas de la leucodystrophie autosomique dominante à début tardif, causée par une duplication du gène *LMNB1* (OMIM #169500), ou de la lipodystrophie partielle acquise, aussi connue sous le nom de syndrome de Barraquer–Simons, provoquée par des mutations hétérozygotes du gène *LMNB2* (OMIM #608709).

Bien qu'il existe dans certains cas, un chevauchement entre les organes et tissus affectés, cette classification reste dans l'ensemble fiable (Shin & Worman, 2022; Worman, 2012).

Seules les laminopathies systémiques seront abordées dans le suite de mon manuscrit.

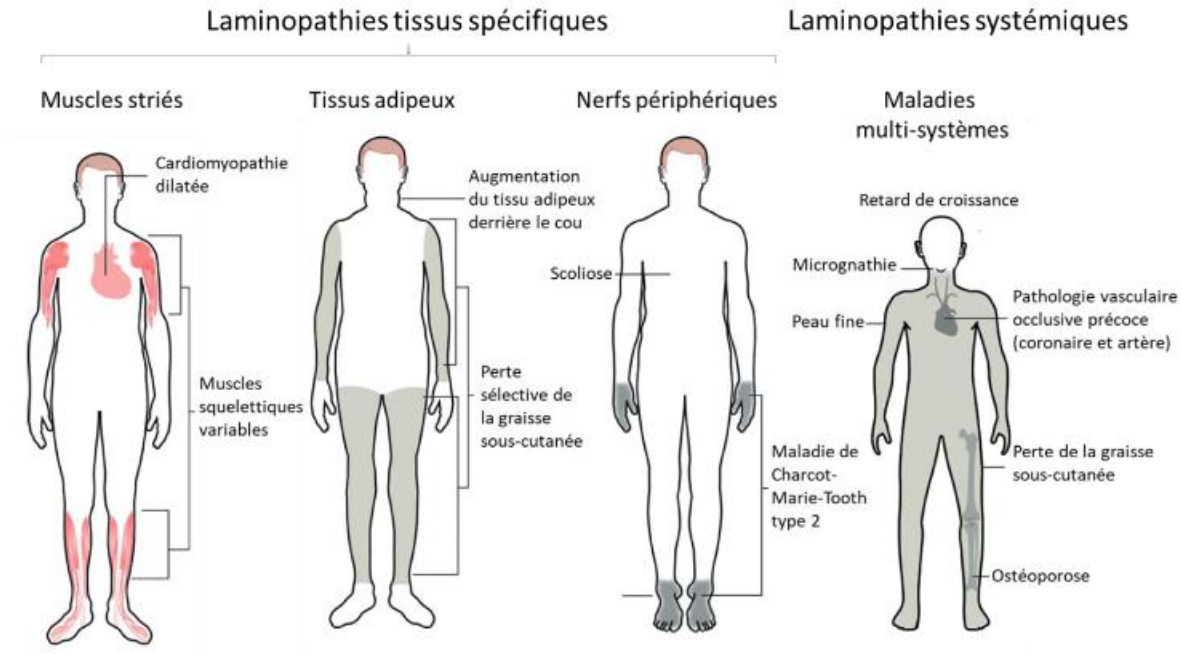


Figure 7 : Différentes mutations du gène *LMNA* provoquent des maladies qui affectent les muscles striés, le tissu adipeux, les nerfs périphériques ou sont multi-systèmes avec des caractéristiques de vieillissement accéléré.
Adapté de Worman, *« Nuclear lamins and laminopathies »*. Journal of Pathology, 2012.

1.2.2. Les laminopathies systémiques

1.2.2.1. Introduction – Description

Les laminopathies systémiques se caractérisent par des signes de vieillissement accéléré à des degrés divers, affectant plusieurs tissus et organes. La dermopathie restrictive peut être considérée comme la forme la plus grave, car elle entraîne le décès du nouveau-né atteint dans les premières heures de vie, voire *in utero*. La Progeria de Hutchinson-Gilford constitue la deuxième forme la plus sévère (décrite en détail dans le paragraphe 1.2.2.2). Enfin, les patients atteints du syndrome de Werner atypique présentent des signes de vieillissement accéléré plus modérés et tardifs, ce qui vaut à ce syndrome le nom de « Progeria de l'adulte ». Des caractères phénotypiques communs sont observés entre ces différentes laminopathies systémiques.

- **Dermopathie restrictive (RD)** (OMIM#275210) (ORPHA#1662)

La dermopathie restrictive est une génodermatose (groupe nosologique rassemblant les maladies de peau héréditaires) létale. Il s'agit d'une maladie génétique très rare puisque moins d'une centaine de cas sont rapportés à ce jour dans la littérature. Contrairement à la Progeria, un retard de croissance intra-utérin (RCIU) et une diminution des mouvements fœtaux sont rapportés dans presque tous les cas. À la naissance, les nouveau-nés présentent une peau fine, tendue, rigide et translucide avec érosions aux points de flexion et une ankylose articulaire généralisée. Une dysmorphie faciale caractéristique avec un faciès inexpressif est observée incluant entre autres des cils et des sourcils clairsemés ou absents, un petit nez pincé, des oreilles d'implantation basse, une rétro/micrognathie et une petite bouche figée en « O ». Les anomalies

squelettiques sont nombreuses associant par exemple des défauts de minéralisation osseuse, des fontanelles élargies, une dysplasie claviculaire et une arthrogrypose généralisée. Les patients décèdent habituellement *in utero* ou durant la première semaine de vie par insuffisance respiratoire en lien avec une hypoplasie pulmonaire. Comme dans la Progeria, aucune anomalie du système nerveux central n'est observée (*Orphanet: Dermopathie restrictive*, s. d.).

Ce syndrome est causé par des mutations homozygotes ou hétérozygotes composites nulles dans le gène *ZMPSTE24* (laminopathie secondaire) ou plus rarement par des mutations hétérozygotes *de novo* du gène *LMNA* (laminopathie primaire). Ces mutations entraînent la production et l'accumulation nucléaire importante de prélamine A farnésylée dans le noyau exerçant, comme la progérine dans la Progeria, un effet toxique à l'origine du phénotype.

- **Syndrome de Werner atypique (AWS)** (OMIM#277700) (ORPHA#79474)

Le syndrome de Werner atypique regroupe divers cas hétérogènes diagnostiqués initialement comme syndrome de Werner, mais sans identification de mutations caractéristiques du gène *WRN*. Comme dans le syndrome de Werner classique, les patients AWS présentent un vieillissement prématuré avec l'apparition de maladies liées à l'âge plus précoce que la population générale, mais avec un début habituellement autour de la vingtième année, parfois plus tôt, et avec une évolution plus rapide.

Un sous-ensemble des AWS est causé par des mutations du gène *LMNA.* Les mutations décrites sont des substitutions d'acides aminés (faux-sens) hétérozygotes dominantes (Renard et al., 2009). Un équipe a décrit deux cas diagnostiqués AWS présentant des mutations d'épissage du gène *LMNA* (jonction exon 10/Intron 11) associées à la production de faibles quantités de progérine nettement inférieures à celles observées dans la Progeria classique (voir paragraphe suivant) (N. Y. Chen et al., 2018; Hisama et al., 2011). Au niveau clinique, ce sous-ensemble se manifeste par un vieillissement accéléré, caractérisé par une petite taille, avec des cheveux gris et fins et un visage doté d'un nez rappelant la forme d'un bec d'oiseau, une atrophie de la peau, une lipodystrophie et une myopathie, accompagné d'autres affections liées au vieillissement, telles que l'ostéoporose et l'athérosclérose. La cataracte est souvent absente contrairement au syndrome de Werner classique (*Orphanet: Syndrome de Werner atypique*, s. d.).

- **Dysplasie Acro-Mandibulaire (MAD)** (OMIM#248370) (ORPHA#2457)

La dysplasie Acro-Mandibulaire est caractérisée par une hypoplasie mandibulaire et claviculaire, une acro-ostéolyse, une raideur articulaire et une lipoatrophie. Il y a deux formes qui se différencient par l'extension de la lipoatrophie : le type A qui présente une lipoatrophie partielle localisée surtout au niveau des extrémités, et le type B où la lipoatrophie est plus généralisée. Les deux formes sont causées par des mutations plus souvent homozygotes dans le gène *LMNA* ou des mutations hétérozygotes composites de *ZMPSTE24* (mutation nulle c.1085_1086insT et mutation faux-sens p.N265S) (*Orphanet: Dysplasie mandibulo-acrale*, s. d.).

1.2.2.2. La Progeria de Hutchinson-Gilford et syndromes apparentés

1.2.2.2.1. Introduction et définition (HGPS, HGPS-like, APS)

En 1886, le Dr Jonathan Hutchinson décrit le cas d'un enfant de 3 ans souffrant d'alopécie et d'une absence de glandes mammaires. L'enfant présente un aspect de personne âgée, chauve, avec des veines proéminentes sur le crâne. Un cas similaire fut décrit par le Dr Gilford en 1897. Il suggère ensuite le nom de « Progeria », "pro" signifiant "précoce" et "geras" signifiant "vieillesse" en grec ancien.

L'incidence de la maladie de 1 pour 8 millions de nouveau-nés était rapportée aux États-Unis entre 1915 et 1967 et de 1 pour 4 millions de nouveau-nés aux Pays-Bas entre 1900 et 2005 (Hennekam, 2006). À ce jour, la Progeria Research Foundation en estime la prévalence à 1 naissance sur 20 millions (Progeria Research Foundation, 2022). La Progeria affecte les deux sexes et toutes les ethnies. En septembre 2024, il est rapporté dans le monde 206 enfants souffrant de Progeria ou d'un syndrome apparenté (Progeria Research Foundation, 2022).

La Progeria de Hutchinson-Gilford (OMIM #176670) (ORPHA #740) est une laminopathie systémique, due à une mutation du gène *LMNA*, qui se caractérise par l'accumulation d'une protéine prélamine A mutée, appelée progérine, localisée dans la *lamina* nucléaire. L'accumulation de cette protéine toxique entraîne la dérégulation de nombreux mécanismes et des fonctions nucléaires. Ces anomalies engendrent une entrée en sénescence précoce des cellules, ce qui contribue au phénotype de vieillissement des patients.

Les syndromes « HGPS-like » sont très similaires à la Progeria « classique » aussi bien cliniquement que dans les mécanismes causant la maladie. Cependant, ils sont dus à d'autres mutations du gène *LMNA* et se caractérisent par une accumulation soit de progérine, soit d'une autre forme de prélamine A tronquée farnésylée, à des niveaux variables. Il s'agit d'un groupe hétérogène avec une sévérité des symptômes et une espérance de vie variant selon la mutation concernée (Barthélémy et al., 2015).

Les syndromes progeroïdes atypiques (APS) sont causés par des mutations dans le gène *LMNA* n'entraînant ni de synthèse de progérine, ni d'autres formes de lamines tronquées. Plus de 20 mutations ont été décrites à ce jour, bien que les mécanismes physiopathologiques restent flous (Coppedè, 2021; Garg et al., 2009; Magno et al., 2020).

1.2.2.2.2. Clinique

Dans sa forme classique, la Progeria se caractérise par un vieillissement prématuré et accéléré, débutant vers l'âge d'un an par un retard de croissance staturo-pondérale, qui reste sous le 3e percentile. Le phénotype s'aggrave ensuite au cours de la vie **(Figure 8)**. Les patients présentent une dysmorphie faciale typique, avec un front proéminent, des yeux saillants, un nez fin en forme de bec d'oiseau, des oreilles décollées, des lèvres fines, ainsi qu'une micrognathie et une rétrognathie. Leur peau est extrêmement fine et sclérosée, avec des veines apparentes et proéminentes. Ils développent aussi une alopécie, d'abord partielle puis totale, une lipodystrophie généralisée et une amyotrophie. Les anomalies osseuses sont marquées, incluant une ostéopénie, une hypoplasie des

clavicules, une ostéolyse des phalanges distales et des côtes, ainsi qu'une ostéoporose qui entraîne des fractures pathologiques. Une raideur articulaire due à l'ostéoarthrite est également fréquente. Les patients souffrent de surdité à basse fréquence, et près de la moitié d'entre eux développent une insulino-résistance. Les patients ne développent pas de puberté. Malgré ces affections, leur développement intellectuel est semblable à celui d'un enfant sain. L'atteinte vasculaire commence tôt, se manifestant par une rigidification précoce et accélérée des vaisseaux, suivie de l'athérosclérose et d'une insuffisance cardiaque (Gordon et al., 1993; Hennekam, 2006; Orphanet: Progéria, s. d.; Ullrich & Gordon, 2015). L'espérance de vie moyenne est de 14,5 ans, le décès survenant généralement par infarctus du myocarde ou, plus rarement, par accident vasculaire cérébral (Gordon et al., 1993).

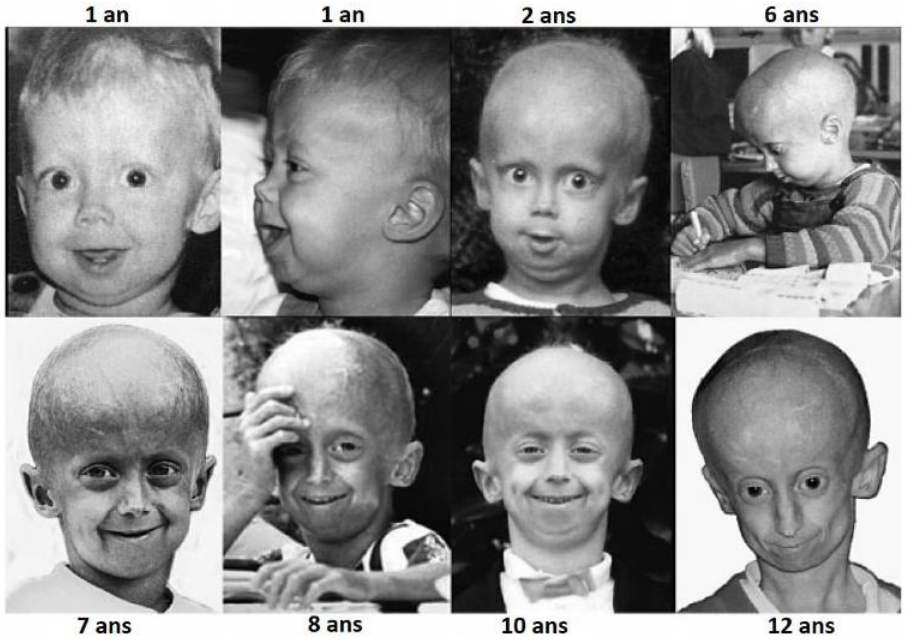


Figure 8 : Patient néerlandais atteint de Progeria, à différents âges.
Adapté de Hennekam, *« Hutchinson–Gilford Progeria Syndrome: Review of the Phenotype »*. American Journal of Medical Genetics Part A, 2006.

1.2.2.2.3. Physiopathologie

La forme classique de la maladie est causée par une mutation ponctuelle *de novo* dans l'exon 11 du gène *LMNA*, c.1824C>T; p.G608G (De Sandre-Giovannoli et al., 2003; Eriksson et al., 2003). Cette mutation isosémantique active un site cryptique d'épissage qui engendre la délétion de 150 nucléotides du transcrit et de 50 acides aminés de la prélamine A. Cette prélamine A mutée subit les mêmes premières étapes post-traductionnelles que la prélamine A classique et sera farnésylée et carboxyméthylée. Cependant, le deuxième site de clivage de l'endonucléase ZMPSTE24/FACE1 ayant été perdu par la délétion, la lamine A mutée, appelée progérine, conserve le groupement farnésyl et reste ancrée à la membrane du réticulum endoplasmique. Après importation dans le noyau, la progérine s'accumule dans la *lamina* nucléaire au contact de l'enveloppe nucléaire dans laquelle elle est ancrée par son groupement farnésyl. Cet ancrage crée une toxicité dose-dépendante de la progérine qui déforme le noyau et dérégule de nombreux mécanismes moléculaires **(Figure 9)**.

De façon intéressante, il a été montré que la progérine est également détectable dans les cellules de personnes saines âgées, autour de 90 ans, bien que présente en quantité moindre que chez les patients atteints de HGPS (Scaffidi & Misteli, 2006). Par ailleurs, il a été observé que le taux de progérine augmente avec l'âge, tant dans les fibroblastes de patients HGPS que dans ceux de sujets sains (Strandgren et al., 2017). Ces résultats soulignent, au travers de la présence de progérine dans les cellules, un lien moléculaire entre le vieillissement normal et pathologique observé dans la Progeria.

Les syndromes « HGPS-like » sont causés par d'autres mutations dans le gène *LMNA*. Elles engendrent une accumulation soit de progérine (c.1968G>A ; c.1968+1G>A ; c.1968+5G>A), soit de prélamine A tronquée comme la prélamine AΔ35 (c.1868C>G) ou la prélamine AΔ90 (c.1968G>A ; c.1968+1G>A ; c.1968+5G>A) (Barthélémy et al., 2015).

La majorité des cas APS sont causés par des mutations *de novo* hétérozygotes faux-sens dans le gène *LMNA* sans accumulation de lamine A tronquée farnésylée. La physiopathologie de ces syndromes n'est pas connue à ce jour (Coppedè, 2021; Doubaj et al., 2012; Garg et al., 2009).

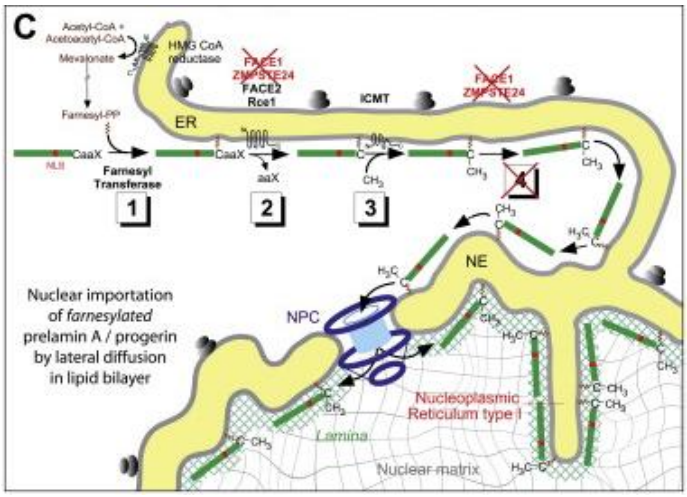


Figure 9: Maturation post-traductionnelle de la progérine.
D'après Cau *et al., « Nuclear matrix, nuclear envelope and premature aging syndromes in a translational research perspective »*. Seminars in Cell & Developmental Biology, 2014.

1.2.2.2.4. Conséquences cellulaires de la mutation

1.2.2.2.4.1. Anomalies nucléaires

Au cours du vieillissement, la progérine s'accumule dans le noyau au niveau de la *lamina* nucléaire. Cette accumulation s'observe *in vitro* ; alors que les noyaux de cellules HGPS apparaissaient normaux à des passages précoces, ils se déforment progressivement au cours des passages parallèlement à l'accumulation croissante de la progérine. Le noyau forme des protubérances appelées « blebs », il augmente de taille et la *lamina* s'épaissit. La répartition des pores nucléaires se désorganise pour former des clusters, alors que certaines parties de l'EN en sont dépourvues **(Figure 10)** (Goldman et al., 2004).

L'expression de prélamine A mutée ou de progérine par transfection dans des cellules témoins engendre les mêmes altérations du noyau (Lu & Djabali, 2018).

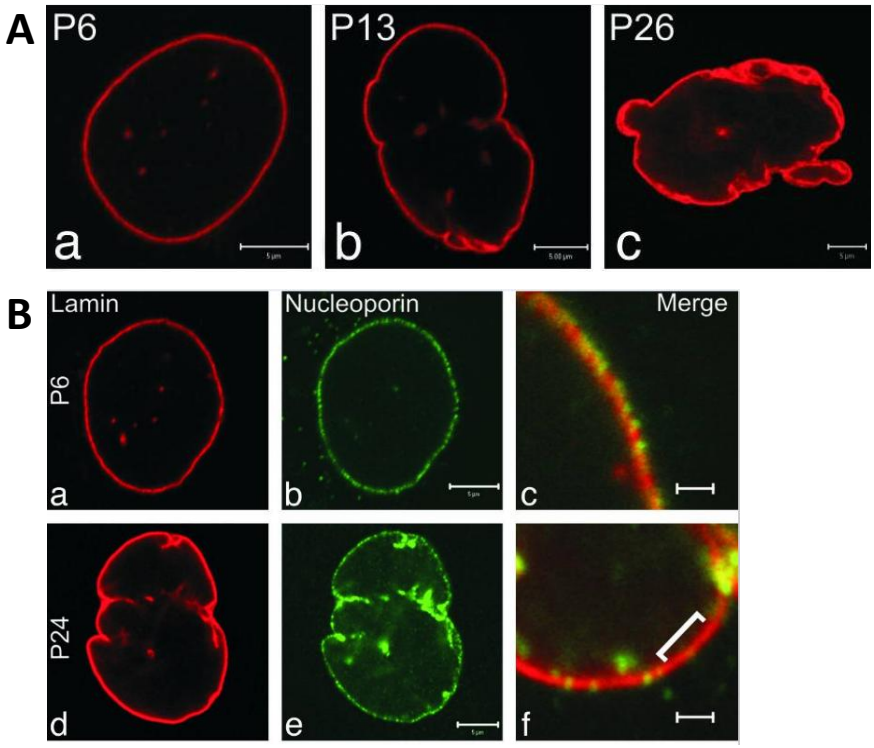


Figure 10 : Altérations nucléaires dans des fibroblastes HGPS.
(A) Noyau de fibroblastes HGPS à passages 6, 13 et 26, marquage des lamines. (B) Répartition des pores nucléaires dans des fibroblastes HGPS à passages 6 et 24. Adapté depuis Goldam *et al., « Accumulation of mutant lamin A causes progressive changes in nuclear architecture in Hutchinson-Gilford progeria syndrome »*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2004.

L'épaississement de la *lamina* entraîne une rigidification de l'EN qui le rend plus sensible au stress mécanique. Cette sensibilité affecte particulièrement les tissus exposés à des stress mécaniques comme les vaisseaux, les muscles ou encore les os. Un stress mécanique continu appliqué sur des cellules endothéliales HGPS engendre une mortalité importante de ces cellules comparée à des cellules témoins (Danielsson et al., 2022). La progérine perturbe également le complexe LINC, qui relie le nucléosquelette au cytosquelette, en stabilisant et immobilisant SUN1 (Vidak & Foisner, 2016). Cette altération modifie les interactions avec certaines protéines, y compris des facteurs de transcription tels que Prx1 et Ing1, ce qui entraîne leur mauvaise localisation dans le nucléoplasme et contribue aux dommages cellulaires (Burla et al., 2018).

1.2.2.2.4.2. Désorganisations épigénétiques

L'hétérochromatine, correspondant à la chromatine fortement condensée, limite l'accessibilité de l'ADN et réduit presque entièrement l'expression génique. Elle est divisée en hétérochromatine constitutive et facultative. L'hétérochromatine constitutive, essentiellement inactive, est localisée dans des séquences répétées, notamment autour des centromères et des télomères, tandis que l'hétérochromatine facultative apparaît à la suite de modifications cellulaires et abrite des gènes transcriptionnellement inactifs.

Dans les fibroblastes HGPS, l'accumulation de progérine entraîne une perte progressive de l'hétérochromatine constitutive par des modifications spécifiques des

histones H3K9me3, H4K20me3 et H3K27me3, des marques qui, en conditions normales, sont connues pour réprimer la transcription (Carrero et al., 2016). L'histone H3K9me3, marqueur clé de l'hétérochromatine constitutive situé dans les régions péricentriques et télomériques, est diminuée dans les cellules HGPS et chez les individus âgés sains présentant de la progérine (Dechat et al., 2008). HP1α, une protéine associée à H3K9me3, joue un rôle crucial dans le maintien de cette structure répressive. Dans les cellules HGPS, la baisse de H3K9me3 conduit à une diminution des interactions entre la *lamina* nucléaire, HP1α et l'hétérochromatine, perturbant ainsi la structure nucléaire (Zeng et al., 2010).

La modification de l'histone H4K20me3, également un marqueur de l'hétérochromatine constitutive au niveau des télomères, est augmentée dans les cellules HGPS, ce qui contribue au raccourcissement des télomères (Pal & Tyler, 2016). Par ailleurs, une dérégulation de H3K27me3, marqueur de l'hétérochromatine facultative, est observée dans les fibroblastes dermiques HGPS, où elle est sous-exprimée dans les régions pauvres en gènes et surexprimée dans les régions riches en gènes (McCord et al., 2013).

Ainsi, l'accumulation de progérine modifie profondément l'organisation de la chromatine, affectant la structure de l'hétérochromatine et perturbant l'expression génique et la stabilité cellulaire, éléments qui contribuent au vieillissement prématuré caractéristique de la Progeria.

1.2.2.2.4.3. Anomalies de voies de signalisation et de différentiation

Les lamines agissent comme un support pour diverses molécules de signalisation et facteurs de transcription. La progérine, en altérant leur fonctionnement, entraîne la dérégulation de plusieurs voies de signalisation.

- **<u>Wnt/ β-caténine</u>**

Plusieurs études utilisant le modèle murin *Zmpste24*$^{-/-}$ (qui accumule une prélamine A farnésylée en raison de l'absence de clivage par *Zmpste24*) ont mis en évidence une altération de la voie Wnt canonique. Par exemple, dans les cellules épidermiques de ce modèle, Espada et al. ont observé une diminution intracellulaire de la forme active de la β-caténine, associée à une réduction de Cycline D1, l'une des cibles directes de cette voie (Espada et al., 2008).

La β-caténine, acteur central de la voie Wnt canonique, agit comme co-activateur transcriptionnel. En l'absence de Wnt3a, elle est dégradée dans le cytoplasme par le protéasome ; en présence de Wnt3a, sa dégradation est inhibée, permettant son accumulation dans le cytoplasme, puis son importation dans le noyau pour activer des gènes cibles (Clevers, 2006). Cette voie joue un rôle crucial dans le développement cartilagineux et osseux. Un défaut de signalisation Wnt peut contribuer aux anomalies osseuses et cartilagineuses observées chez les patients.

Dans les fibroblastes du modèle de souris *Lmna*$^{\Delta 9/\Delta 9}$ (présentant une délétion de l'exon 9 associé à un phénotype de Progeria), une diminution de la signalisation Wnt/β-caténine entraîne des défauts d'expression des protéines de la matrice extracellulaire (Vidak &

Foisner, 2016). En parallèle, lors de la dernière étape de la différenciation ostéogénique, Choi et al. ont constaté que des cellules progénitrices dérivées de cellules iPS HGPS présentent un rapport diminué de β-caténine active entre le noyau et le cytoplasme. La farnésylation de la progérine semble jouer un rôle dans cette diminution : après une semaine de différenciation ostéogénique, des cellules hBM-MSCs (human Bone Marrow-MSCs) exprimant une progérine non farnésylée montrent une accumulation accrue de β-caténine active par rapport à celles exprimant une progérine farnésylée (Choi et al., 2018).

- **NF-κB**

NF-κB est un facteur de transcription clé, activé en réponse au stress, impliqué dans l'inflammation et le vieillissement. Dans les modèles murins *Zmpste24*$^{-/-}$ et *Lmna*$^{G606G/G609G}$, l'accumulation de prélamine A farnésylée ou de progérine entraîne une hyperactivation de la voie NF-κB, avec une augmentation de l'activité de NF-κB et une réduction de son inhibiteur, IκBα (Osorio et al., 2012). Le blocage de la voie NF-κB par un inhibiteur, tel que le salicylate de sodium, prolonge la longévité des souris et réduit leurs anomalies cutanées. NF-κB régule de nombreux gènes, notamment ceux codant des protéines associées à l'inflammation, comme les interleukines, chimiokines, cytokines et molécules d'adhérence. L'altération de son expression est impliquée dans la sénescence cellulaire et contribue au phénomène d'"inflamm'aging" ou inflammation associée au vieillissement (voir chapitre 1.2.2.2.4.8. Inflamm'aging et SASP)

- **p53**

p53 est un facteur de transcription essentiel dans la régulation de nombreuses fonctions cellulaires, notamment le contrôle du cycle cellulaire, la réparation de l'ADN, l'apoptose et la réponse au stress cellulaire. Les dysfonctionnements des télomères causés par la progérine activent la voie de réparation des cassures double-brin de l'ADN (DDR) et la signalisation de p53, entraînant la sénescence cellulaire (Vidak & Foisner, 2016).

1.2.2.2.4.4. Instabilité génomique et métabolisme de l'ADN

Les fibroblastes HGPS montrent une accumulation de foyers contenant l'histone γH2AX, un marqueur de lésions non réparées de l'ADN, et une activation persistante des kinases impliquées dans la réponse aux dommages de l'ADN (DDR), telles qu'ATM, ATR et Chk1. Cette accumulation de γH2AX, qui augmente avec les passages cellulaires *in vitro*, est exacerbée par l'exposition à des agents générant des espèces réactives de l'oxygène (ROS) ou des radiations ionisantes, et elle contribue à ralentir la prolifération cellulaire jusqu'à l'entrée en sénescence prématurée (B. Liu et al., 2005; Richards et al., 2011).

Les modèles HGPS, comme les fibroblastes et les souris *Zmpste24*$^{-/-}$, présentent des anomalies chromosomiques, une augmentation des cassures double-brin et une réduction marquée de la capacité de réparation de l'ADN (Carrero et al., 2016). Dans les cellules HGPS, la réponse aux cassures double-brin induites est retardée, en raison d'un défaut de recrutement au niveau des sites endommagés, de protéines clés de ce mécanisme telles que 53BP1, RAD51 et RAD50. Cette altération modifie les deux voies principales de réparation de l'ADN double-brin, la recombinaison homologue (HR) et la jonction d'extrémités non homologues (NHEJ), provoquant une activation des points de contrôle du cycle cellulaire et freinant ainsi la prolifération (Gonzalo & Kreienkamp, 2015).

1.2.2.2.4.5. Raccourcissement des télomères

Les télomères sont des structures nucléoprotéiques, composées de séquences d'ADN répétitives, qui protègent les extrémités des chromosomes contre la fusion et la dégradation en les empêchant d'être perçus comme des cassures, ce qui évite ainsi l'activation de la réponse aux dommages de l'ADN. Pour contrer leur raccourcissement cyclique, la ribonucléoprotéine (RNP) télomérase ajoute des répétitions télomériques (TTAGGG) aux extrémités chromosomiques. Cependant, dans la plupart des cellules somatiques, l'expression de la télomérase est faible, et, malgré son action, les télomères continuent de se raccourcir au fil des divisions. Lorsque les télomères deviennent trop courts, les chromosomes ne sont plus protégés, ce qui déclenche la réponse aux dommages de l'ADN et aboutit à la sénescence réplicative (voir chapitre sénescence).

Dans les cellules HGPS, l'accumulation de progérine altère la longueur, la structure et la fonction des télomères. *In vitro*, l'expression de la progérine dans des fibroblastes sains entraîne une augmentation des dommages à l'ADN au niveau des télomères, provoquant une sénescence prématurée. Inversement, l'expression de la télomérase dans des cellules HGPS prolonge leur durée de vie en inhibant la signalisation des dommages à l'ADN et en activant les voies de p53 et de pRb (Benson et al., 2010; Gonzalo et al., 2017). Bien que les mécanismes de l'altération des télomères en lien avec l'accumulation de progérine soient mal compris, plusieurs hypothèses sont proposées. Une étude menée par Wood et al. a révélé que, dans les cellules HGPS, la protéine TRF2 (Telomeric Repeat-binding Factor 2), essentielle à la protection des télomères, cesse d'interagir avec les lamines A et C, entraînant un raccourcissement télomérique (Wood et al., 2014). De plus, les modifications épigénétiques induites par l'accumulation de progérine pourraient également contribuer à ce raccourcissement, les télomères étant enrichis en marques H3K9me3 et H4K20me3 (Dechat et al., 2008).

1.2.2.2.4.6. Dysfonctionnements mitochondriaux

Les dysfonctionnements mitochondriaux sont au cœur des altérations cellulaires dans la Progeria. Les fibroblastes des patients HGPS montrent une diminution des protéines impliquées dans la phosphorylation oxydative, réduisant la production d'ATP et provoquant une accumulation de pyrophosphate (PPi) et de ROS (Rivera-Torres et al., 2013). Ces dysfonctionnements sont exacerbés par une altération de la biogenèse mitochondriale, caractérisée par une baisse de l'expression de PGC-1α, un régulateur clé de l'homéostasie mitochondriale (Cisneros et al., 2023; Maynard et al., 2022). La voie métabolique NAMPT-NAD+ (nicotinamide phosphoribosyltransferase-Nicotinamide adénine dinucléotide) est altérée dans les cellules HGPS, conduisant à une diminution des taux de NAMPT et de NAD, à l'origine des anomalies de la respiration mitochondriale (Yoshino et al., 2011).

Les mitochondries des cellules HGPS présentent des anomalies morphologiques, notamment un gonflement et une fragmentation, ainsi qu'une réduction de leur mobilité, probablement due à un déficit énergétique limitant le transport intracellulaire (Kreienkamp & Gonzalo, 2020). Parallèlement, les mitochondries endommagées déclenchent une activation de la mitophagie, comme en témoignent les niveaux élevés de LC3-II, marquant une tentative cellulaire d'élimination des mitochondries non

fonctionnelles (Cisneros et al., 2023). Cependant, cette réponse adaptative reste insuffisante pour compenser les effets délétères, ce qui conduit à une aggravation des dommages cellulaires.

Ces dysfonctions mitochondriales ont des conséquences systémiques importantes. Dans les modèles murins *Zmpste24*$^{-/-}$ et *Lmna*$^{G609G/G609G}$, on observe des signes de sénescence, des dommages accrus à l'ADN mitochondrial et une sécrétion excessive de SASP, exacerbant le stress cellulaire (Y. Li et al., 2024; Maynard et al., 2022; Rivera-Torres et al., 2013). Dans les tissus musculaires et vasculaires, ces anomalies contribuent à la perte de cellules musculaires lisses vasculaires (VSMC), au durcissement des artères et à la calcification vasculaire, des caractéristiques clés de la Progeria (Kreienkamp & Gonzalo, 2020).

1.2.2.2.4.7. Stress oxydant

Le stress oxydatif constitue un facteur majeur de dysfonction mitochondriale et de vieillissement prématuré. Les fibroblastes HGPS présentent un niveau élevé de ROS, entraînant des dommages importants à l'ADN, aux protéines et aux lipides (Caron et al., 2007). Ces altérations sont liées à une prolifération cellulaire réduite, une instabilité génomique accrue et une incapacité à réparer efficacement les cassures double-brin de l'ADN (Gonzalo & Kreienkamp, 2015). Bien que ces anomalies soient exacerbées par l'accumulation de progérine, un facteur clé réside dans l'inhibition de la voie NRF2, un régulateur central des réponses antioxydantes. La progérine, en interagissant directement avec NRF2, empêche l'activation des gènes antioxydants, exacerbant ainsi l'accumulation des ROS et accélérant le vieillissement prématuré des cellules (Kubben et al., 2016).

Dans un contexte normal, NRF2 joue un rôle crucial dans le maintien de l'intégrité mitochondriale. Il régule l'expression de protéines impliquées dans l'homéostasie redox, la biogenèse mitochondriale, et la mitophagie, tout en contrôlant la production de ROS par les mitochondries et l'oxydase NADPH. NRF2 assure un fonctionnement optimal des mitochondries, en modulant des processus comme le potentiel membranaire mitochondrial, l'oxydation des acides gras, et la synthèse d'ATP (Dinkova-Kostova & Abramov, 2015). Cependant, dans les cellules HGPS, la suppression de l'activité de NRF2 par la progérine perturbe ces mécanismes, entraînant une aggravation des dommages mitochondriaux. De plus, la réduction de l'activité des enzymes antioxydantes, telles que MnSOD, rend les cellules particulièrement vulnérables au stress oxydatif (Viteri et al., 2010).

Des études montrent que l'activation pharmacologique de NRF2, par des composés tels que le sulforaphane ou la N-acétylcystéine (NAC), offre des effets protecteurs significatifs. Ces agents réduisent les niveaux de ROS, diminuent les dommages persistants à l'ADN, améliorent la prolifération cellulaire, et restaurent des marqueurs clés tels que la lamine B1 (Gonzalo et al., 2017; Richards et al., 2011). L'activation de NRF2 favorise également la biogenèse mitochondriale via des médiateurs comme PGC-1α, tout en régulant des protéines impliquées dans la qualité mitochondriale, telles que les protéines découplantes (par exemple, UCP3 qui augmente la perméabilité aux protons de la membrane interne des mitochondries et, par conséquent, diminue la production de

superoxyde) et les enzymes de réparation des ROS. En parallèle, NRF2 contribue à la mitophagie, un processus essentiel pour éliminer les mitochondries endommagées, renforçant ainsi les mécanismes de contrôle qualitatif mitochondriaux (Dinkova-Kostova & Abramov, 2015).

Ces observations positionnent NRF2 comme une cible thérapeutique prometteuse pour atténuer les effets du stress oxydatif dans des maladies liées au vieillissement, comme la Progeria. En agissant sur les interactions entre la progérine, les ROS et les mécanismes de régulation mitochondriale, l'activation de NRF2 pourrait non seulement ralentir les phénotypes pathologiques de la maladie, mais également offrir des solutions innovantes pour contrer le vieillissement prématuré et les dysfonctions mitochondriales associées.

1.2.2.2.4.8. Inflamm'aging et SASP

L'inflamm'aging est une inflammation chronique de faible intensité caractéristique du vieillissement, influençant à la fois les processus locaux et systémiques. Cette inflammation persistante résulte de multiples facteurs, dont l'accumulation de dommages tissulaires pro-inflammatoires, une réponse immunitaire défaillante incapable d'éliminer efficacement les agents pathogènes ou les cellules dysfonctionnelles, et la sécrétion accrue de cytokines inflammatoires par les cellules sénescentes. Ces processus activent des voies inflammatoires telles que l'inflammasome NLRP3, augmentant la production de médiateurs pro-inflammatoires comme l'IL-1β, le TNF-α et les interférons. Cette inflammation chronique contribue à des pathologies liées à l'âge, notamment l'athérosclérose, l'obésité, le diabète de type 2, la neuroinflammation et les maladies dégénératives articulaires (López-Otín et al., 2013, 2023). Les souris *NFKB1*$^{-/-}$ (knockout d'une sous-unité de NF-κB) montrent une inflammation systémique chronique qui s'aggrave avec l'âge, avec hypertrophie splénique, élévation des taux plasmatiques d'IL-6 et infiltration hépatique par les cellules immunitaires. Ces signes sont associés à un vieillissement prématuré, caractérisé par une perte de poids, une hypertrophie cardiaque, une réduction du tissu adipeux sous-cutané et une augmentation de la mortalité précoce (Jurk et al., 2014).

Le SASP (phénotype sécrétoire associé à la sénescence) est une réponse hétérogène dépendant des voies de signalisation de l'immunité innée (comme TLRs, et NLRPs), de mTORC1 et de facteurs de transcription (NF-κB, GATA4, etc.). Il a des effets simultanés et parfois contradictoires sur le micro-environnement : il recrute et active les cellules immunitaires via des chimiokines et cytokines, peut aussi supprimer l'immunité (via le TGF-β), favorise la fibrose et la prolifération des fibroblastes, modifie la matrice extracellulaire (ECM), stimule les cellules progénitrices par des facteurs de croissance, et induit une sénescence paracrine dans les cellules voisines. Dans de nombreuses maladies, le SASP provoque une inflammation chronique et une fibrose progressive.

L'inflammation est aggravée par le SASP, conséquence de l'accumulation de cellules sénescentes, ainsi que par l'accumulation de débris extracellulaires et de pathogènes infectieux que la sénescence empêche d'éliminer. Cette situation est également amplifiée par l'épuisement des cellules myéloïdes et lymphoïdes, un phénomène lié à l'involution thymique associée à l'âge. Cette régression du thymus réduit la production de nouveaux

lymphocytes T, entraînant un appauvrissement du répertoire des cellules T et une incapacité à générer des réponses immunitaires efficaces contre de nouveaux antigènes.

1.2.2.2.4.9. Sénescence cellulaire

Chez les patients atteints de HGPS, l'accumulation de progérine entraîne un vieillissement prématuré secondaire à une sénescence prématurée de leurs cellules. La sénescence cellulaire est définie par un arrêt irréversible du cycle cellulaire, en général en phase G1, accompagné de modifications morphologiques, biochimiques et fonctionnelles. Physiologiquement, la plupart des cellules cultivées *in vitro* prolifèrent jusqu'à atteindre une limite réplicative (ou limite de Hayflick), moment où elles entrent en sénescence réplicative. Ce phénomène est dû au raccourcissement progressif des télomères.

Outre la sénescence réplicative, d'autres facteurs peuvent induire une sénescence dite prématurée, indépendamment du raccourcissement des télomères, tels que l'activation d'oncogènes (comme RAS et RAF) ou les dommages non réparés à l'ADN (induits par des UV, des radiations ionisantes ou des ROS). Cette sénescence, parfois qualifiée d'"induite par le stress," agit comme un important mécanisme antitumoral, prévenant la prolifération cellulaire excessive, et limite également la fibrose tissulaire. Deux protéines clés dans l'induction de la sénescence sont p53 et pRb : des signaux de sénescence activent p53, augmentant ensuite p21, qui inhibe les complexes Cycline E/CDK2 et bloque le cycle cellulaire. De même, des signaux de sénescence peuvent réduire la phosphorylation de pRb, permettant à cette protéine hypophosphorylée de se lier au facteur de transcription E2F et de bloquer ainsi le cycle cellulaire induisant la sénescence (Burton & Krizhanovsky, 2014).

Dans les fibroblastes HGPS, l'isoforme Δ133p53α de p53 est diminué, contribuant à la sénescence prématurée. En effet, l'inhibition de Δ133p53α dans ces cellules entraîne une augmentation de l'expression de p21 ainsi que des cytokines pro-inflammatoires (Il-6 et Il-8) associées au SASP. Par ailleurs, la protéine STUB1, qui protège Δ133p53α de la dégradation par autophagie, est elle-même diminuée dans les fibroblastes HGPS sénescents. La restauration de l'expression de Δ133p53α par un vecteur lentiviral augmente la prolifération des fibroblastes HGPS, réduit l'expression de p21 et des marqueurs de dommages de l'ADN, bien que sans effet sur la progérine ou les anomalies nucléaires (Von Muhlinen et al., 2018).

Une étude sur le modèle murin *Zmpste24*$^{-/-}$, menée par Varela et al., a montré que des gènes normalement inhibés par p53, tels que p21, sont surexprimés dans le foie de ces souris, suggérant que les anomalies de l'enveloppe nucléaire pourraient activer p53. Par exemple, les altérations de la chromatine peuvent être perçues comme un stress génotoxique, déclenchant la sénescence ou l'apoptose via p53. Les fibroblastes de ce modèle murin présentent des signes de sénescence, tels qu'une réduction de la prolifération, un arrêt irréversible du cycle, une capacité réplicative limitée et des modifications morphologiques (aplatissement et élargissement du noyau) (Varela et al., 2005).

Bien que la sénescence soit un mécanisme de défense contre les tumeurs, l'accumulation de cellules sénescentes a des effets néfastes sur l'organisme, notamment en modifiant le micro-environnement cellulaire local, en générant une inflammation, en perturbant les fonctions tissulaires et en limitant la capacité de prolifération et de régénération des tissus. Cette accumulation tissulaire de cellules sénescentes, comme observée au cours du vieillissement naturel, peut avoir ainsi à terme un effet pro-tumorigène (Brondello et al., 2012).

1.2.2.2.4.10. Épuisement des cellules souches

Les cellules souches adultes jouent un rôle crucial dans le remplacement des cellules endommagées ou sénescentes dans divers tissus. Leur diminution naturelle avec l'âge altère l'homéostasie tissulaire. Les lamines de type A, absentes dans les cellules souches embryonnaires ainsi que dans les cellules souches hématopoïétiques et neuroendocrines, sont faiblement exprimées dans les cellules souches mésenchymateuses (MSC) dérivées de patients HGPS. Si ces cellules contiennent peu de progérine *in vivo*, son accumulation au fil des passages en culture *in vitro* conduit à un épuisement progressif, lié à des altérations des voies de signalisation Wnt et Notch (Cau et al., 2014)

Dans des modèles murins (par ex., *Zmpste24*$^{-/-}$), on observe une diminution du nombre de cellules souches épidermiques et musculaires ainsi qu'une réduction de leur capacité proliférative. Notamment, l'injection intrapéritonéale de cellules musculaires dérivées de cellules souches de jeunes souris sauvages chez des souris progéroïdes prolonge significativement la survie de ces dernières, soulignant que les dysfonctionnements des cellules souches pourraient contribuer au vieillissement prématuré dans les syndromes progéroïdes (Vidak & Foisner, 2016)

Par ailleurs, l'induction de la sénescence par les voies de réparation des dommages à l'ADN (DDR) et l'activation de p53 peuvent réduire le nombre de cellules souches en limitant leur renouvellement. De plus, l'activation de p53 conduit à des dysfonctionnements mitochondriaux et à l'épuisement des cellules souches en inhibant la protéine PGC1, essentielle à la fonction mitochondriale et régulant la mitogenèse (Varela et al., 2005).

1.2.2.2.5. Modèles animaux

1.2.2.2.5.1. Murins

Parmi les modèles animaux créés ces dernières années pour étudier la Progeria et les syndromes apparentés, le modèle murin reste le plus largement utilisé pour analyser les mécanismes moléculaires *in vivo* et, plus récemment, tester des stratégies thérapeutiques. D'autres modèles, tels que le porc (minipig) ou le poisson-zèbre (zebrafish), déjà employés dans les recherches sur le vieillissement, ont également émergé.

- **Souris « knock-out » *Zmpste24*$^{-/-}$**

L'enzyme ZMPSTE24 est essentielle pour la dernière étape de maturation de la prélamine A. Chez les souris *Zmpste24*$^{-/-}$, cette enzyme est absente, ce qui empêche la formation de la lamine A mature, entraînant ainsi une accumulation de prélamine A

farnésylée dans les noyaux des cellules, de manière similaire à la progérine. Bien que les souris *Zmpste24*$^{-/-}$ apparaissent normales à la naissance, leur croissance staturo-pondérale ralentit dès l'âge de trois semaines. Elles développent ensuite une lordose-cyphose, des anomalies osseuses sévères (telles que l'ostéoporose et des fractures pathologiques, notamment de l'arc zygomatique), une lipoatrophie et une micrognathie. Les souris mutantes souffrent d'alopécie, de sarcopénie et adoptent une démarche lente et claudicante, typique de ce modèle **(Figure 11)**. Au niveau cardiaque, elles montrent une diminution de l'épaisseur de la paroi ventriculaire, des zones de dégénérescence musculaire, une infiltration de cellules inflammatoires et une dilatation ventriculaire. Ces anomalies cardiaques suggèrent que la mort de ces souris, survenant vers l'âge de six mois, pourrait être causée par une cardiomyopathie dilatée et une insuffisance cardiaque (Pendás et al., 2002; Piekarowicz et al., 2019). Toutefois, Bergo et al. n'ont rapporté aucune anomalie cardiaque dans leur étude sur ce modèle murin (Bergo et al., 2002).

Les souris *Zmpste24*$^{-/-}$ représentent un modèle de syndrome progéroïde, permettant d'étudier les mécanismes cellulaires altérés par l'accumulation de prélamine A farnésylée. Jusqu'en 2011, en l'absence d'un modèle avec accumulation de progérine, ce modèle a été utilisé pour évaluer des stratégies thérapeutiques dans le syndrome HGPS visant à réduire la farnésylation de la prélamine A. Toutefois, il ne permet pas d'étudier le mécanisme moléculaire de l'épissage aberrant du gène *LMNA* et de tester des approches thérapeutiques ciblant l'anomalie d'épissage survenant dans la Progeria.

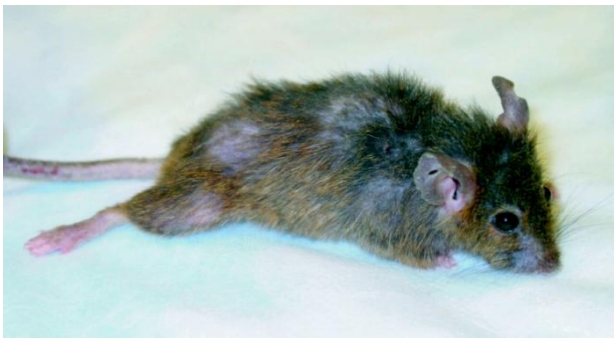


Figure 11 : Photographie d'une souris *Zmpste24*$^{-/-}$.
Illustrant l'alopécie et un traînage caractéristique du membre postérieur. Adapté de Bergo *et al., « Zmpste24 deficiency in mice causes spontaneous bone fractures, muscle weakness, and a prelamin A processing defect ».* Proceedings of the National Academy of Sciences, 2002.

- **<u>Souris « knock-in » *Lmna*$^{G609G/G609G}$</u>**

Ce modèle murin a été développé par Osorio *et al.* (Osorio et al., 2011a) en collaboration avec notre laboratoire Marseille Medical Genetics. C'est le seul modèle murin à présenter la mutation du gène *LMNA* équivalente chez la souris à celle des patients atteints de la forme classique de la Progeria (c.1824C>T ; p.Gly608Gly). La mutation c.1827C>T ; p.Gly609Gly a été insérée dans le locus *Lmna* des souris via un système Cre/lox, entraînant, comme chez l'Homme, l'activation d'un site d'épissage cryptique, et la production d'une prélamine A tronquée similaire à la progérine humaine. Les souris homozygotes *Lmna*$^{G609G/G609G}$ expriment la progérine et la lamine C, ainsi que de très faibles quantités de lamine A. Elles se développent normalement jusqu'à l'âge de 3 semaines, après quoi leur croissance staturopondérale ralentit et des signes de vieillissement accéléré et prématuré apparaissent progressivement. Elles meurent vers l'âge de 4 mois, comparativement à une espérance de vie de 2 ans chez les souris témoins.

Les souris hétérozygotes *Lmna*$^{G609G/+}$ expriment quant à elles la lamine A, la progérine et la lamine C, à l'image de ce qui est observé dans la Progeria humaine où la mutation pathogène est hétérozygote. Leurs symptômes sont moins prononcés, avec un

ralentissement de la courbe de croissance à partir de 8 mois, et une durée de vie moyenne d'environ 242 jours.

De manière intéressante, les souris homozygotes *Lmna*$^{G609G/G609G}$ reproduisent plus fidèlement le phénotype des patients atteints que les souris hétérozygotes *Lmna*$^{G609G/+}$. Cela s'explique par une plus grande résistance des souris à l'accumulation de prélamine A mutée par rapport aux humains. En effet, c'est ce que l'on observe aussi dans le modèle murin *Zmpste24*$^{-/-}$, où la symptomatologie survient au bout de 4 semaines, alors que chez l'Homme, ce génotype entraîne généralement la mort du fœtus avant ou peu après la naissance. Par conséquent, le modèle murin homozygote *Lmna*$^{G609G/G609G}$ est considéré comme un modèle plus pertinent à utiliser dans les études *in vivo* que son équivalent hétérozygote.

Le phénotype observé dans le modèle *Lmna*$^{G609G/G609G}$ est riche et marqué par de nombreuses anomalies touchant différents tissus et organes, se rapprochant plus ou moins du phénotype observé chez l'Homme. Il est entre autres décrit une infertilité, une lipoatrophie généralisée, une attrition des follicules pileux avec perte des poils et une diminution significative de la force de préhension. Les analyses osseuses révèlent des anomalies majeures, telles que l'ostéoporose, une lordocyphose sévère, ainsi qu'une réduction de la taille de la boîte crânienne et des incisives inférieures. À l'instar des patients atteints de Progeria, les souris homozygotes manifestent des altérations cardiovasculaires sévères, associées à une déplétion des cellules musculaires lisses vasculaires (VSMCs) au niveau de la crosse aortique. Cependant, contrairement aux patients HGPS, ce modèle murin développe une bradycardie et des anomalies de la dépolarisation ventriculaire à l'âge de 9 semaines. Les analyses sanguines révèlent également des perturbations hormonales et biologiques, avec une baisse des taux sériques d'IGF-1 (insulin-like growth factor 1), d'insuline et de leptine, et une augmentation des niveaux de l'hormone de croissance (GH) et d'adiponectine. Les souris souffrent également d'une hypoglycémie sévère à partir de 3 mois, contribuant à leur décès précoce.

Au niveau biologique, ce modèle présente des anomalies structurelles des noyaux cellulaires (blebbing), induites par l'accumulation de progérine, ainsi qu'une augmentation des cassures double brin de l'ADN. Des marquages à la β-galactosidase mettent en évidence une sénescence accrue dans le foie et les reins, en lien avec le vieillissement accéléré chez ces animaux (Osorio et al., 2011a; Piekarowicz et al., 2019).

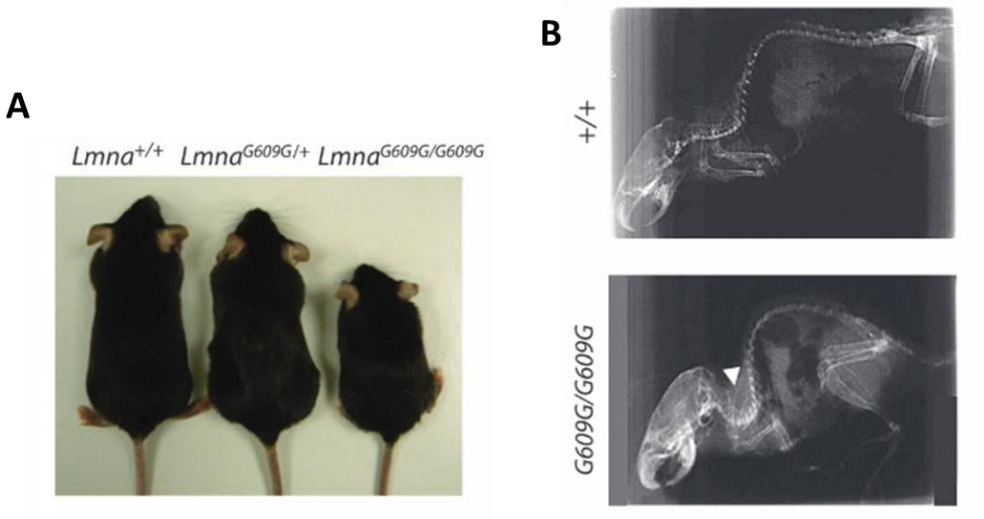


Figure 12 : Phénotype des souris *Lmna* $^{G609G/+}$ et *Lmna* $^{G609G/G609G}$.
(A) Photographies représentatives de souris *Lmna*$^{+/+}$, *Lmna*$^{G609G/+}$ et *Lmna*$^{G609G/G609G}$ âgées de 3 mois. (B) Radiographie d'une souris *Lmna*$^{G609G/G609G}$ âgée de 3 mois comparée à une souris de type sauvage. Adapté de Osorio *et al.,* « *Splicing-Directed Therapy in a New Mouse Model of Human Accelerated Aging* ». Science Translational Medicine, 2011.

Il existe d'autres modèles murins utilisés pour la recherche sur la Progeria comme les souris transgéniques homozygotes pour l'allèle *LMNA* humain c.1824 C>T (Koblan et al., 2021), les souris *Lmna*$^{LAO/LAO}$ qui produisent exclusivement des transcrits mutants de la prélamine A qui donnent de la lamine A mature, les souris *Lmna*$^{nHG/nHG}$, qui produisent exclusivement de la progérine non farnésylée à partir de transcrits de prélamine A mutants (Jung et al., 2012a).

1.2.2.2.5.2. Minipig

Les porcs présentent des similitudes génétiques, anatomiques et physiologiques plus étroites avec les humains que les souris, ce qui en fait un modèle pertinent et de plus en plus utilisé pour les essais précliniques de médicaments préventifs ou thérapeutiques. Leur proximité avec le système cardiovasculaire humain est particulièrement significative dans l'étude de la Progeria. En effet, les cœurs du porc et de l'Homme sont de taille comparable et, à part les primates, le modèle porcin offre la meilleure approximation en matière de vascularisation coronarienne, de flux sanguin, d'hémodynamique et de contractilité myocardique. De plus, la croissance du cœur et du système vasculaire chez le porc, de la naissance à l'âge de 4 mois, correspond à celle observée chez l'humain jusqu'à la fin de l'adolescence. Les profils lipoprotéiques et leur métabolisme sont également très similaires à ceux mesurés chez l'Homme.

En 2019, l'équipe de Vicente Andrés a développé un modèle porcin de Progeria chez des minipigs Yucatan. Ce modèle a été créé via un knock-in hétérozygote de la mutation c.1824 C>T, réalisé grâce à la technologie CRISPR-Cas9 dans des fibroblastes dermiques de porcs mâles, qui ont ensuite été clonés par transfert nucléaire de cellules somatiques dans des ovocytes énucléés de truies. Ce modèle exprime un ARNm présentant 94,9 % d'homologie avec celui de la progérine humaine. La progérine exprimée conserve également son groupement farnésyl, comme observé chez les patients HGPS. Les porcs HGPS, tout comme les souris HGPS, apparaissent normaux à la naissance. Cependant, vers

l'âge de 2,5 mois, les premiers symptômes se manifestent : croissance ralentie, rigidité articulaire, peau tendue et sèche, ainsi qu'un faciès typique. À partir de 4,5 mois, ces porcs présentent une perte de poids et de graisse sous-cutanée, une dysmorphie faciale marquée, une peau plissée avec une pigmentation irrégulière, ainsi que de larges zones d'alopécie ou de poils drus **(Figure 13)**. Contrairement aux patients HGPS, les porcs HGPS présentent des dysfonctionnements microvasculaires du myocarde, accompagnés de fibrose, ainsi que des altérations de l'ECG et des anomalies sévères de la conduction cardiaque. Ces troubles cardiaques entraînent la mort du modèle aux alentours de 6 mois (Dorado et al., 2019).

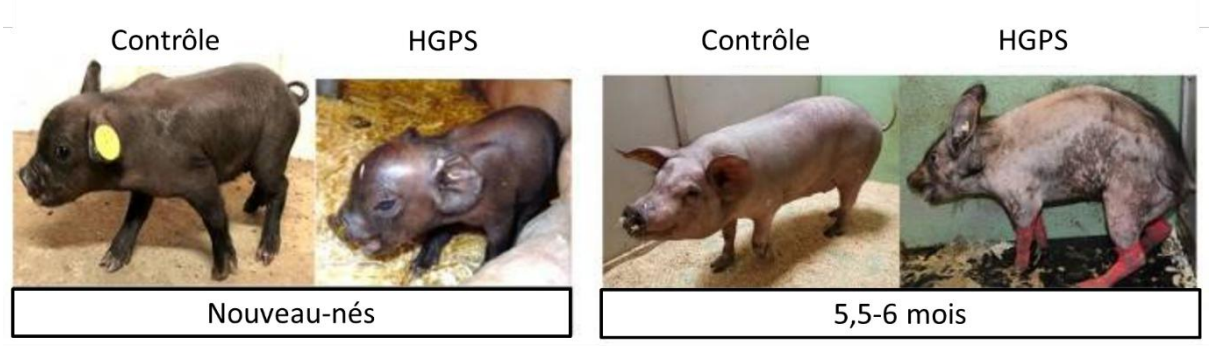


Figure 13 : Photographie montrant l'apparence des minipigs HGPS à la naissance et après 5,5-6 mois de vie.
Les photos n'ont pas été prises à la même distance. Adapté depuis Dorado *et al., « Generation and characterization of a novel knockin minipig model of Hutchinson-Gilford progeria syndrome »*, Cell Discovery, 2019.

1.2.2.2.5.3. Poisson-zèbre (Zebrafish)

Le poisson-zèbre (*Danio rerio*) s'est révélé être un modèle biologique idéal pour l'étude du développement et du vieillissement au niveau de la génétique moléculaire. Cet organisme présente des signes de sénescence comparables à ceux de l'humain, permettant ainsi l'exploration de voies de vieillissement spécifiques, conservées parmi les vertébrés. Grâce à la conservation évolutive des lamines de type A (A et C) et de type B (B1 et B2), le poisson-zèbre constitue un modèle pertinent pour l'étude des laminopathies. De plus, ce modèle vertébré facilite le criblage à haut débit de composés chimiques potentiels pour le traitement de la Progeria de Hutchinson-Gilford et d'autres laminopathies.

Koshimizu *et al.* ont développé des modèles de poisson-zèbre pour étudier la Progeria et les laminopathies. Le premier modèle, nommé zprogerin, a été créé par micro-injection, au stade embryonnaire, d'un transgène du gène *LMNA,* entraînant au niveau protéique une délétion de 37 acides aminés. À l'âge adulte, ce modèle présente une courbure du corps plus ou moins marquée **(Figure14)**.

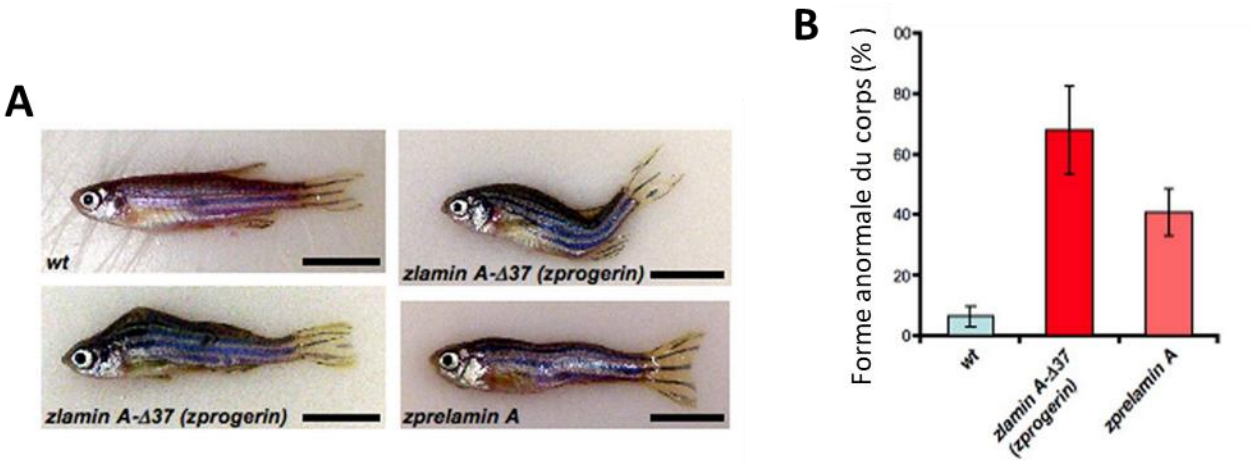


Figure 14 : Phénotype des poissons zprogerin et zprelamin A.
(A) Caractéristiques externes d'un poisson non transgénique contrôle (1,5 an), de deux poissons transgéniques zprogerin (1,5 an) et d'un poisson transgénique zprelamin A (2,1 ans), barres d'échelle : 1 cm. (B) Quantifications des anomalies corporelles (cohortes de 18 mois).
Adapté de Koshimizu *et al., « Embryonic senescence and laminopathies in a progeroid zebrafish model »*, PLoS One, 2011.

Au stade embryonnaire, il souffre d'un déficit en muscles lisses et sa peau devient rugueuse. La sénescence cellulaire est particulièrement induite durant cette phase. Les noyaux des cellules de ce modèle sont déformés, et son espérance de vie est réduite. Après traitement avec un inhibiteur de la farnésyl-transférase, on observe une diminution du nombre de noyaux déformés et une réduction de la sénescence cellulaire. Les chercheurs ont également développé un modèle injecté avec de la prélamine A, qui lui aussi présente des déformations (Koshimizu et al., 2011).

Un deuxième modèle, zLMNA-MO2/MO2.1, a été généré en utilisant des oligonucléotides morpholino antisens (AONs) micro-injectés dans des embryons de poisson-zèbre. Ces AONs induisent l'apparition d'un site cryptique d'épissage dans l'exon 11 du gène *LMNA*, entraînant une délétion de 8 acides aminés. Les embryons zLMNA-MO2 ne présentent pas de déformations corporelles, mais ont une peau rugueuse et un déficit en muscles lisses. Au niveau cellulaire, ce modèle montre une réduction des lipides ainsi qu'une diminution de l'expression du récepteur activé par les proliférateurs de peroxysomes-γ (PPAR-γ), indiquant une inhibition de la différenciation adipogénique. Par ailleurs, plusieurs voies cellulaires sont altérées, telles qu'une réduction du cycle cellulaire, ainsi qu'une augmentation de l'apoptose et de la sénescence (Koshimizu et al., 2011).

1.2.2.2.6. Stratégies thérapeutiques

1.2.2.2.6.1. Réparation de la mutation

La principale limitation des traitements actuels pour la Progeria réside dans l'absence de thérapeutique permettant la guérison des patients, les options disponibles se contentant pour l'instant de ralentir la progression de la maladie. Toutefois, de nouvelles thérapies prometteuses, testées récemment sur des modèles murins de Progeria, ciblent directement la mutation responsable du syndrome et offrent l'espoir d'une guérison pour ces patients.

- **<u>Système CRISPR/Cas9</u>** (Beyret et al., 2019; Santiago-Fernández et al., 2019)

Le complexe CRISPR-Cas9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats associated with Cas9 endonuclease) est un mécanisme de défense des bactéries contre l'ADN étranger. Ce complexe est constitué d'un ARN guide unique (sgARN) qui achemine et fixe le complexe à une séquence d'ADN spécifique. L'enzyme Cas9 coupe l'ADN ciblé, produisant des cassures double brin qui sont réparés principalement par une jonction non homologue produisant des insertions et des délétions.

L'absence de lamine A n'est pas nuisible aux cellules humaines, car elle est compensée par l'expression de la lamine C. Cela laisse envisager la possibilité de restaurer le phénotype cellulaire en inhibant spécifiquement la transcription de la lamine A/progérine sans altérer la production de lamine C. Récemment, deux équipes de recherche ont appliqué la technologie CRISPR-Cas9 sur des modèles de souris atteintes de Progeria pour cibler la mutation responsable du syndrome. Santiago-Fernández *et al,* ont utilisé un ARN guide ciblant la mutation située dans l'exon 11 du gène *Lmna*, tandis que Beyret et ses collaborateurs ont conçu deux ARNs guides, l'un ciblant l'exon 12 du gène *Lmna* de la souris, incluant le site de farnésylation, et l'autre ciblant l'exon 11 près du site de la mutation C>T spécifique de la Progeria (HGPS). Les deux équipes ont choisi le vecteur AAV9 pour sa sécurité et son tropisme étendu à de nombreux types de tissus. Les souris *Lmna*$^{G609G/G609G}$ ont été traitées par injection dans la veine faciale ou par voie intrapéritonéale. Ces stratégies ont conduit à une réduction marquée de l'expression de la progérine dans le foie, le cœur et les muscles et d'une diminution de l'apoptose dans les reins. Dans l'aorte, bien que la déplétion des VSMC soit atténuée, l'expression de la progérine demeure similaire à celle observée chez les souris *Lmna*$^{G609G/G609G}$ non traitées. Sur le plan systémique, les souris traitées se montrent plus robustes, plus actives et perdent moins de poids que les souris HGPS non traitées, et présentent une augmentation d'environ 25 % de leur médiane de survie. Ces résultats pourraient encore être optimisés en utilisant un vecteur AAV présentant un tropisme accru pour le tissu vasculaire, afin d'améliorer l'efficacité du traitement.

- **<u>Édition de bases *in vivo* (« Base editing »)</u>** (Koblan et al., 2021)

La mutation responsable de la Progeria peut également être corrigée par édition de bases *in vivo.* L'éditeur de base adénine (ABE) est une protéine de fusion composée d'une désoxyadénosine désaminase modifiée et d'un variant de Cas9. Cet éditeur de base forme un complexe avec un sgARN. Une fois que le sgARN s'est lié à sa séquence cible, l'éditeur de base peut, dans une fenêtre d'édition de 4 à 5 nucléotides, convertir une base adénine (A) en une base guanine (G). Après la création d'une coupure simple brin, les mécanismes de réparation cellulaires intègrent ensuite la paire de bases modifiée A-T en une paire de bases G-C.

Koblan et al. ont démontré que l'utilisation d'un ABE dans des fibroblastes de patients HGPS *in vitro* entraînait une correction de la mutation dans 90 % des cellules, réduisait la production de progérine et rétablissait la morphologie normale du noyau. Ils ont ensuite injecté en rétro-orbital des souris C57BL/6 porteuses de l'allèle humain complet *LMNA* porteur de la mutation c.1824 C>T avec des vecteurs AAV9 transportant l'ABE. Deux périodes d'injection ont été testées : 3 jours et 14 jours après la naissance **(Figure 15)**.

Les souris injectées à 14 jours présentent une efficacité accrue de l'ABE dans l'aorte, les muscles squelettiques et les os. Cette édition a entraîné une réduction drastique de l'expression de la progérine. À l'âge de 6 mois, l'aorte des souris HGPS qui ont reçu un placebo est quasiment dépourvue de VSMCs alors que les aortes des souris injectées à 14 jours présentent un nombre de VSMCs comparable à celui des souris sauvages (WT). L'espérance de vie des souris traitées a été multipliée par 2,4 comparée aux souris HGPS non traitées.

Les souris injectées à 3 jours post natal, montrent une réduction du taux de progérine dans le foie, le cœur et l'aorte et une 3,3 fois plus de VSMC par rapport au groupe contrôle.

Ces résultats sont très encourageants et représentent un espoir considérable pour les patients atteints de Progeria et leurs familles. Cependant, ces approches ne sont pas encore testées chez l'humain.

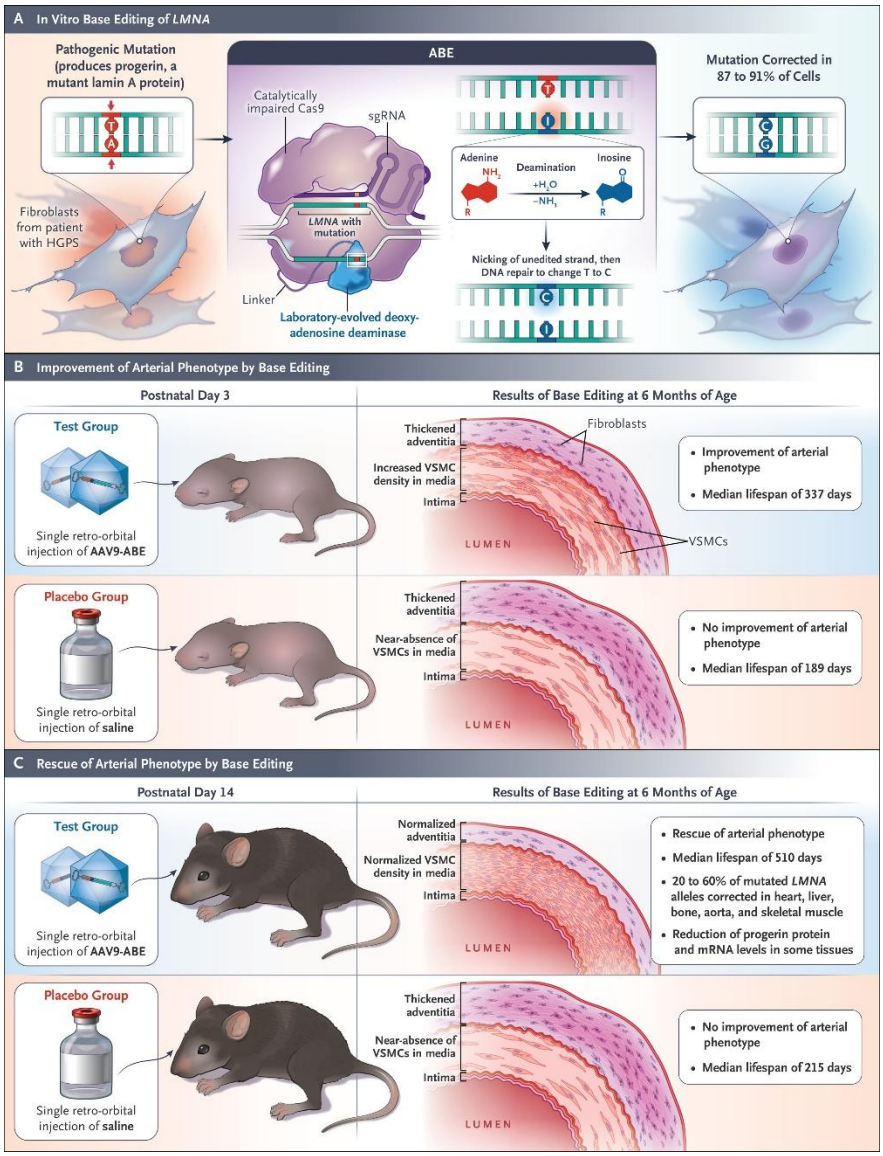


Figure 15 : Résultats de l'édition de bases du gène *LMNA* sur des fibroblastes de patients et sur un modèle murin de Progeria.
Adaptée de Kim et Erikson, *« Base editing in Progeria ».* New England Journal of Medicine, 2021.

1.2.2.2.6.2. Inhibition de l'épissage aberrant

Dans la Progeria classique, bien que la mutation soit isosémantique, elle crée un épissage aberrant qui entraîne la délétion de 50 acides aminés, générant la progérine. Ainsi, une thérapeutique envisagée dans la Progeria consiste à inhiber cet épissage anormal.

- **Oligonucléotides antisens**

Les AONs sont de petits oligonucléotides modifiés qui se fixent sur l'ARNm pré-messager et, par encombrement stérique, empêchent l'accès du spliceosome au site d'épissage.

Plusieurs équipes de recherche ont exploré l'utilisation de différents AONs dans le traitement des mutations responsables de l'épissage aberrant. La majorité de ces AONs cible directement la mutation pour corriger l'épissage défectueux, tandis que certains combinent plusieurs AONs pour bloquer également le site d'épissage donneur. Les résultats des études montrent que ces AONs inhibent efficacement la production de progérine et de lamine A, tout en restaurant la morphologie des noyaux cellulaires. Lorsqu'ils sont administrés à des souris du modèle Progeria présentant la mutation *Lmna*$^{G609G/G609G}$, les AONs améliorent significativement leur état général, augmentant à la fois leur poids corporel et leur espérance de vie (Erdos et al., 2021; J. M. Lee et al., 2016; Puttaraju et al., 2021; Scaffidi & Misteli, 2005).

- **Metformine et MG132**

L'épissage aberrant peut également être inhibé par des molécules pharmacologiques. La metformine et MG132 (un inhibiteur du protéasome détaillé dans le paragraphe « Augmentation de la clairance de la progérine ») diminuent l'expression de SRSF-1, une protéine RNA-binding qui favorise l'épissage aberrant de la progérine (Egesipe et al., 2016; Harhouri et al., 2017a).

1.2.2.2.6.3. Diminution de la toxicité de la progérine

D'autres stratégies thérapeutiques visent à réduire la toxicité de la progérine en inhibant sa farnésylation. Cette toxicité est causée par la persistance sur la progérine du groupement farnésyl, alors qu'il est normalement fixé puis clivé lors de la maturation de la prélamine A (De Sandre-Giovannoli et al., 2003; Eriksson et al., 2003). Ce groupement farnésyl maintient la progérine ancrée à la membrane du réticulum endoplasmique puis de l'EN après son importation nucléaire, entraînant son accumulation dans la *lamina* nucléaire. Les inhibiteurs de la farnésyltransférase (FTI) ont été identifiés comme des traitements potentiels pour la Progeria. Ces petites molécules se lient de manière réversible au site de liaison CAAX de la farnésyltransférase, inhibant ainsi la farnésylation de la progérine et empêchant sa fixation à l'EN (Basso et al., 2006). Le traitement des fibroblastes HGPS avec des FTI restaure la morphologie du noyau (Capell et al., 2005; Toth et al., 2005). Dans les modèles murins HGPS, les FTI augmentent le poids corporel, la masse des tissus adipeux et la minéralisation osseuse (Yang, 2006). Ils retardent également l'apparition des maladies cardiovasculaires et ralentissent la progression de ces pathologies à un stade avancé (Capell et al., 2008).

En 2007, les résultats prometteurs des études précliniques ont conduit au lancement d'un essai clinique prospectif à bras unique (Kleinman, 2019b)(NCT00425607) utilisant le lonafarnib, un FTI initialement développé pour le traitement du cancer. Cette molécule améliore in vitro les anomalies nucléaires **(Figure 16)**. Une cohorte de 25 enfants atteints de Progeria a été traitée par du lonafarnib pendant au moins deux ans. Les résultats ont révélé une augmentation modérée du poids corporel chez 36 % des patients. Au niveau osseux, le traitement a induit une amélioration significative de la rigidité squelettique, avec des augmentations médianes de 40 à 50 % de la rigidité axiale, de 170 à 228 % de la rigidité en flexion et de 167 à 229 % de la rigidité en torsion, ainsi qu'une augmentation de la densité osseuse (≥3 % sur un ou plusieurs sites chez 76 % des enfants, contre 40 % des participants ayant enregistré une diminution sur un ou plusieurs sites). Il a également été observé une amélioration de l'audition neurosensorielle des basses fréquences (Gordon et al., 2012). Plus important encore, le traitement par lonafarnib a augmenté l'espérance de vie moyenne des patients de 1,6 an. À ce jour, le lonafarnib est le seul traitement approuvé par la FDA (Food and Drug Administration) et l'EMA (Agence Européenne des Médicaments) pour traiter les laminopathies associées à l'accumulation de progérine ou de prélamine A farnésylée (EU/3/18/2118 - Orphan Designation for Treatment of Hutchinson-Gilford Progeria | European Medicines Agency (EMA), 2019; Suzuki et al., 2023).

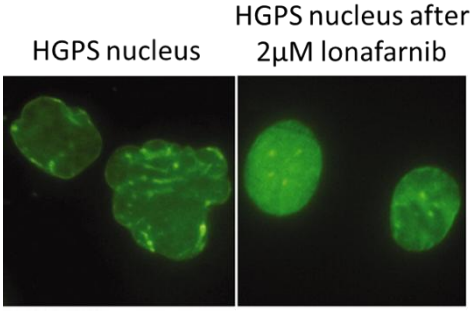


Figure 16 : Noyaux de fibroblastes HGPS avec et sans traitement par lonafarnib.
Adapté de Capell *et al., « Inhibiting farnesylation of progerin prevents the characteristic nuclear blebbing of Hutchinson-Gilford progeria syndrome »*. PNAS, 2005.

Cependant, il a été rapporté que lorsque la farnésyltransférase est inhibée, la progérine peut subir une autre modification post-traductionnelle par la géranylgéranyltransférase I. La présence simultanée d'un inhibiteur de la farnésyltransférase (FTI-277) et d'un inhibiteur de la géranylgéranyltransférase I (GGTI-2147) entraîne une accumulation substantielle de prélamine A non farnésylée, supérieure à celle observée avec chaque inhibiteur utilisé séparément (Varela et al., 2008). Pour surmonter ce problème, notre équipe, en collaboration avec celle de Carlos López-Otín, a exploré une combinaison associant du zoledronate (un bisphosphonate) et de la pravastatine (une statine), appelée ZoPra, qui réduit la prénylation en inhibant la synthèse du farnésyl-pyrophosphate. Les études précliniques sur le modèle murin *Zmpste24*$^{-/-}$ ont été prometteuses et ont conduit à un essai clinique en 2009 (Assistance Publique Hopitaux De Marseille, 2013) (NCT00731016) sur 12 patients HGPS pendant 3,5 ans. Les résultats ont montré que le traitement par ZoPra augmentait partiellement le poids et la densité osseuse des patients, par rapport au traitement par lonafarnib seul (données non publiées).

Un essai clinique à bras unique (Kleinman, 2019a) (NCT00879034) a été réalisé pour évaluer une trithérapie associant pravastatine, zolédronate et lonafarnib, dans le but d'améliorer les paramètres de la maladie en inhibant également la prénylation de la progérine, chaque enzyme jouant un rôle dans la voie de prénylation des protéines. Mené à partir de 2009 à Boston, cet essai a inclus 37 participants atteints de Progeria. Les résultats ont montré une amélioration supplémentaire de la densité minérale osseuse, sans toutefois apporter de bénéfice significatif au-delà de celui déjà observé avec le lonafarnib seul (Gordon et al., 2016).

Toutefois, il est important de rester prudent quant aux effets à long terme des FTIs, car des études ont montré que ces inhibiteurs pourraient provoquer une cardiomyopathie létale, comme montré chez un modèle murin de Progeria *Lmna*^{nPLAO} (ne produisant que de la prélamine A farnésylée sans production de lamine C) en lien avec l'accumulation de prélamine A non farnésylée (Davies et al., 2010).

1.2.2.2.6.4. Augmentation de la clairance de la progérine

L'autophagie est l'un des principaux mécanismes de dégradation des protéines dans les cellules eucaryotes. C'est un processus catabolique par lequel une partie du cytoplasme est adressé au lysosome en réponse à un stress, ce qui permet à la cellule de recycler son matériel en dégradant des organites et des macromolécules cellulaires. La dégradation des différents composants nucléaires, y compris celle de la *lamina* nucléaire, s'effectue par autophagie (Dou et al., 2015; Park et al., 2009). De plus, Lu et Djabali ont observé que dans des cellules HGPS, certains autophagosomes (vacuoles à double membrane qui séquestrent les matériaux cytosoliques à éliminer et fusionnent ensuite avec le lysosome) sont colocalisés avec la progérine (Lu & Djabali, 2018). Ces observations suggèrent que la progérine peut être dégradée par autophagie, bien que ce processus reste insuffisant pour prévenir la progression de la maladie.

Le protéasome est un autre mécanisme de dégradation des protéines. C'est un complexe protéique qui dégrade les protéines endommagées ou inutiles, souvent marquées par l'ubiquitine, et joue un rôle clé dans le cycle cellulaire, la réponse au stress et l'immunité.

- **MG132**

En 2017, notre équipe a étudié l'effet de MG132, un inhibiteur du protéasome, sur l'expression de progérine. De manière surprenante, l'incubation de MG132 à une concentration de 5 µM sur des fibroblastes HGPS a entraîné une réduction significative de la quantité de progérine ubiquitinée, sans provoquer de mort cellulaire notable. Cette diminution de l'accumulation de progérine est attribuée à une surexpression des gènes de l'autophagie, ce qui favorise la clairance de la progérine. De plus, le MG132 augmente l'expression de SRSF-5 et réduit celle de SRSF-1, ce qui inhibe l'épissage aberrant du gène *LMNA*, réduisant encore davantage l'accumulation de progérine. Les cellules HGPS traitées avec du MG132 montrent également une augmentation de la prolifération et une diminution de la sénescence. Par ailleurs, après une injection intramusculaire de MG132 pendant deux semaines, les souris *Lmna*$^{G609G/G609G}$ présentent une diminution de la progérine et de SRSF-1, sans effets indésirables observés (Harhouri et al., 2017b).

- **Rapamycine**

La rapamycine, un immunosuppresseur couramment utilisé pour prévenir le rejet des greffes d'organe, a montré des effets prometteurs dans le traitement des fibroblastes HGPS. En premier lieu, elle réduit la quantité de progérine dans les cellules HGPS en activant l'autophagie. En parallèle, la rapamycine diminue l'apparition des « blebs » nucléaires, réduit les cassures de l'ADN double brin, et restaure la localisation de LAPα, altérée dans la Progeria. De plus, ce traitement permet de restaurer les niveaux d'hétérochromatine en augmentant la triméthylation de H3K9 et en rétablissant la distribution de H3K27me3 sur le chromosome X inactivé chez les femmes (Xi) (Cao et al., 2011; Cenni et al., 2011). La rapamycine améliore la fonction cardiaque et augmente la longévité dans le modèle murin *Lmna*$^{-/-}$ de cardiomyopathie et dans un modèle murin d'athérosclérose (Ramos et al., 2012; Van Skike et al., 2023). Actuellement, un essai clinique de phase I/II (Kleinman, 2023) (NCT02579044) est en cours à l'hôpital de Boston afin d'évaluer l'efficacité de l'évérolimus (un dérivé de la rapamycine) en combinaison avec le lonafarnib chez des enfants HGPS. Cependant, l'utilisation de la rapamycine est associée à de nombreux effets secondaires, tels que l'inhibition de l'adipogenèse et la réduction de la croissance, des processus déjà perturbés chez les patients atteints de Progeria (Yeh et al., 1995).

- **Sulforaphane**

Le sulforaphane, un antioxydant présent dans les légumes crucifères, augmente également la dégradation de la progérine par autophagie. L'association du lonafarnib avec le sulforaphane améliore le phénotype cellulaire des fibroblastes HGPS. De plus, l'acide rétinoïque, seul ou en combinaison avec le sulforaphane, réduit la quantité de progérine et atténue les signes de vieillissement dans les cellules HGPS (Gabriel et al., 2017).

1.2.2.2.6.5. Réduction des effets néfastes de l'accumulation de progérine

Bien que la majorité des stratégies thérapeutiques visent à réduire la quantité de progérine, plusieurs approches sont développées pour atténuer les effets néfastes de cette accumulation.

L'inflammation, un facteur clé du vieillissement physiologique (López-Otín et al., 2023) et pathologique, représente une cible thérapeutique intéressante. En effet, la réduction de l'inflammation pourrait offrir des pistes de traitement. Par exemple, l'inhibition de l'activation de NF-κB par le salicylate de sodium (dérivé de l' acide salicylique) améliore le phénotype et prolonge la durée de vie des souris *Zmpste24*$^{-/-}$ et *Lmna*$^{G609G/G609G}$(Osorio et al., 2012). Le MG132 agit également sur cette voie en inhibant la dégradation de IκB, inhibiteur de NF-kB (Harhouri et al., 2017b).

Par ailleurs, l'augmentation du stress oxydatif observée dans les cellules HGPS peut être atténuée grâce à la N-acétyl cystéine (NAC), un capteur des espèces réactives de l'oxygène (ROS). Le traitement des fibroblastes HGPS avec de la NAC diminue le nombre de cassures double brin de l'ADN et accélère la prolifération cellulaire. De même, le bleu de méthylène, un puissant antioxydant, améliore à la fois le stress oxydatif et la morphologie ainsi que la fonction mitochondriale (Z. Xiong et al., 2016). La protéine ROCK (rho-associated protein kinase) joue un rôle dans la régulation des ROS en modulant

l'interaction entre Rac1b et le cytochrome c. Un traitement *in vitro* des fibroblastes HGPS avec un inhibiteur de ROCK (Y-27632) réduit la production de ROS, rétablit les fonctions mitochondriales et restaure la morphologie nucléaire (Kang et al., 2017). La réactivation de NRF2 permet également d'inhiber l'accumulation de ROS *in vitro* (Kubben et al., 2016).

Dans les cellules HGPS, l'accumulation de progérine entraîne une réduction de l'expression du récepteur de la vitamine D. Kreienkamp et al. ont montré que le traitement par la vitamine D3 (1,25D) améliore le phénotype global des cellules HGPS (Kreienkamp et al., 2016). De plus, le resvératrol, un activateur de SIRT1, atténue la dégénérescence des cellules souches chez les souris *Zmpste24*$^{-/-}$ (B. Liu et al., 2012).

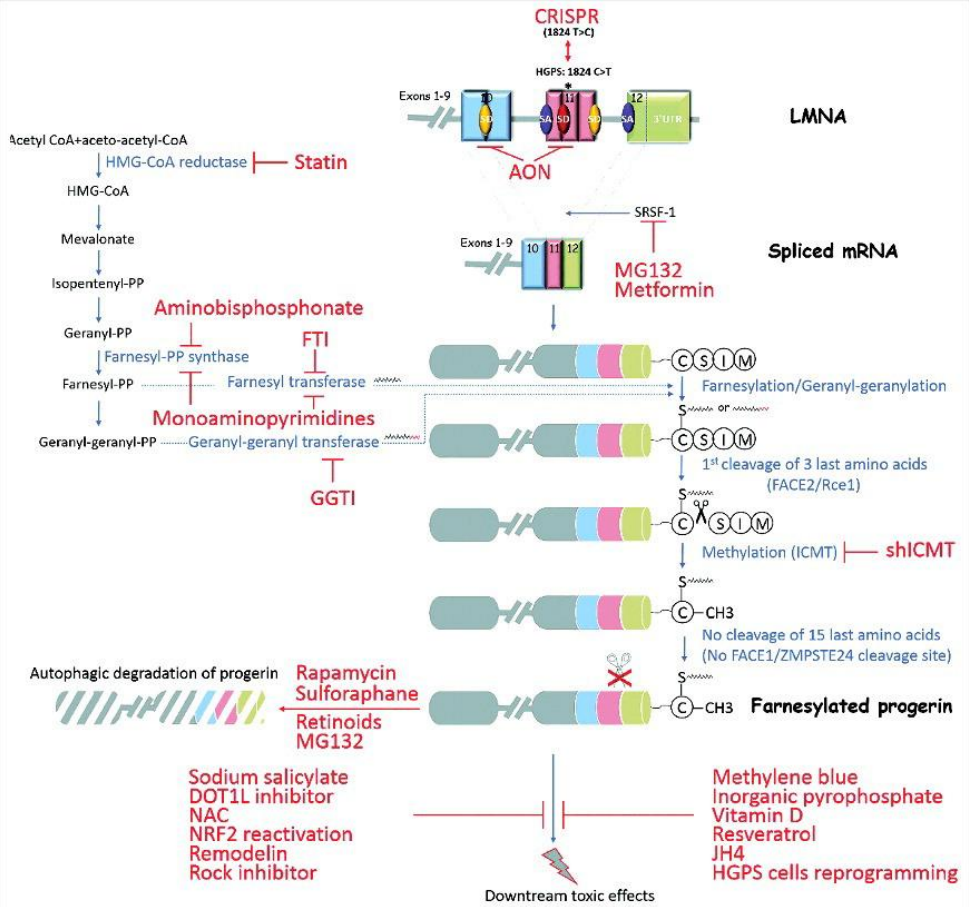


Figure 17 : Stratégies de traitement de la progéria et leurs cibles.
Depuis Harhouri *et al., « An overview of treatment strategies for Hutchinson-Gilford Progeria syndrome »*. Nucleus, 2012.

2. Autres syndromes progéroïdes hors laminopathies

Il existe plusieurs syndromes progéroïdes indépendants des laminopathies. Dans cette section, je me limiterai à la description de deux d'entre eux.

- **<u>Progeria de Nestor-Guillermo (NGPS)</u>**

La Progeria de Nestor-Guillermo également connue sous le nom de syndrome de Nestor-Guillermo ou NGPS est une maladie rare caractérisée par un vieillissement prématuré et accéléré à transmission autosomique récessive. Il partage plusieurs

similitudes phénotypiques avec la Progeria de Hutchinson-Gilford. Les symptômes de cette maladie apparaissent dès l'âge de 2 ans. Le NGPS est caractérisé en particulier par une ostéolyse sévère, une ostéoporose, une lipoatrophie et une dysmorphie faciale. Cependant, contrairement à la Progeria, il n'est pas observé chez les patients de complications cardiovasculaires ou métaboliques. Ce syndrome est causé par des mutations dans le gène *BANF1* (BAF nuclear assembly factor 1) dont la protéine participe à la fixation de l'ADN à la lamine A via les protéines à domaine LEM (LAP2, emerin, MAN1) (OMIM#614008) (ORPHA#280576) (*Orphanet: Progéria de Nestor-Guillermo*, s. d.).

- **Dysplasie acro-mandibulaire associée à MTX2 (MADaM)**

Le syndrome MADaM est une maladie rare autosomique récessive grave décrite récemment par notre équipe (Elouej et al., 2020). Il est caractérisé par un retard de croissance, une résorption osseuse, une calcification artérielle, une glomérulosclérose rénale et une hypertension. Cette maladie est due à des mutations homozygotes du gène *MTX2*, responsable de la synthèse de la metaxine 2, qui joue un rôle clé dans l'importation des protéines au sein des mitochondries. Au niveau cellulaire est observée une fragmentation du réseau mitochondrial et une diminution de l'expression de plusieurs sous-unités de la chaîne respiratoire. Les mécanismes physiopathologiques sont encore peu connus et en cours d'étude au sein de notre équipe.

3. Les ARNs non codants

3.1. Introduction

La découverte des ARNs non codants (ARNnc) a représenté un tournant majeur dans la biologie moléculaire, remettant en question la vision traditionnelle du rôle de l'ARN, longtemps considéré comme un simple intermédiaire entre l'ADN et les protéines. En effet, pendant des décennies, on a pensé que l'ARN messager (ARNm) constituait l'essentiel des ARN, en servant de modèle pour la synthèse des protéines. Les ARNs ribosomiques (ARNr) et les ARNs de transfert (ARNt), impliqués dans la traduction, étaient les seuls ARNs non codants reconnus pour leur rôle essentiel.

Dans les années 1990 et 2000, avec les avancées en génomique et en technologies de séquençage, les scientifiques ont commencé à identifier un nombre croissant de transcrits d'ARNs qui ne codent pas des protéines, mais qui jouent des rôles essentiels dans la régulation de l'expression génique, la stabilité de l'ADN, et d'autres processus cellulaires. Le premier groupe majeur découvert a été celui des petits ARNs interférents (siARN) et des microARNs (miARN), qui régulent l'expression des gènes par des mécanismes d'interférence ARN. Depuis, des classes supplémentaires d'ARNnc ont été découvertes, dont les longs ARNs non codants (lncARN).

Ces découvertes ont révélé que les ARNs non codants occupent une grande partie du génome humain, initialement considéré comme "junk DNA" ou ADN poubelle. On sait aujourd'hui que ces ARNnc jouent un rôle crucial dans la régulation fine de l'expression génétique, dans le développement, et dans diverses maladies, y compris le cancer.

3.2. Les microARNs

Les microARNs (miARNs) sont des petits ARNs non codants de 19 à 25 nucléotides. Ils régulent l'expression des gènes en se fixant, associés à un complexe protéique, généralement sur la région 3'UTR (« untranslated region », région transcrite mais non traduite) des ARNs messagers (ARNm) qu'ils ciblent. Le miARN mature contient une séquence de 7 nucléotides situés en position 2 à 8 de l'extrémité 5', appelée séquence « seed », qui est indispensable à son hybridation complémentaire spécifique sur ses cibles (Brennecke et al., 2005). Sa séquence nucléotidique étant courte, un miARN peut se fixer sur de nombreux transcrits de gènes pour les réguler, et sont ainsi de puissants régulateurs de l'expression des gènes.

Le premier miARN, lin-4, a été découvert en 1993 chez le ver *Caenorhabditis elegans (C. elegans)*. Il régule négativement l'expression de lin-14 pour contrôler la synchronisation développementale du nématode (R. C. Lee et al., 1993). De nombreux miARNs ont ensuite été décrits chez différentes espèces animales, des plantes, des algues et des virus, mais pas chez les organismes unicellulaires. Aujourd'hui, environ 2600 miARNs matures ont été identifiés chez l'Homme (http://www.mirbase.org/).

3.2.1. Synthèse

Les miARNs sont codés par le génome. La majorité des gènes de miARNs sont localisés dans des introns de gènes codants ou non des protéines, mais ils peuvent également être localisés dans des exons ou des séquences Alu du génome. Ils peuvent être organisés en clusters dans certaines régions introniques ou intergéniques. Lorsqu'ils sont localisés dans un gène, leur expression dépend du promoteur de ce gène. Cependant, certains miARNs ont leur propre promoteur et s'expriment alors de façon indépendante (Hammond, 2015a).

Dans la voie canonique **(Figure 18)**, les gènes des miARNs sont transcrits par l'ARN polymérase II sous forme de miARN primaire (pri-miARN), qui sont de longs transcrits en épingle à cheveux de 1 à 2 kb, avec une coiffe en 5' et une queue polyA en 3'. Ces pri-miARNs peuvent contenir la séquence de plusieurs miARNs. Le pri-miARN est ensuite clivé pour former une structure double brin en épingle à cheveux d'environ 70 nucléotides, appelé pré-miARN (précurseur du miARN). Ce clivage est effectué par la RNAse Drosha qui est associée à la protéine DGCR8. Le pré-miARN est ensuite exporté hors du noyau à travers les pores nucléaires, associé à l'Exportine 5 et à la protéine G monomérique Ran couplée au GTP (Yi et al., 2003). Dans le cytoplasme, l'endonucléase III Dicer et son cofacteur TRBP (TAR RNA Binding Protein) liant l'ARN, clive la boucle du pré-miR pour générer un miARN mature double brin d'environ 20 nucléotides (miR-5p/miR-3p). Le complexe RISC (RNA-Induced Silencing Complex) composé d'une protéine Argonaute (Ago), de Dicer, de TRBP s'assemble et prend en charge l'un des brins (appelé guide) tandis que l'autre est dégradé (passager). Cependant, les deux brins 5p et 3p peuvent être alternativement des miARNs guides.

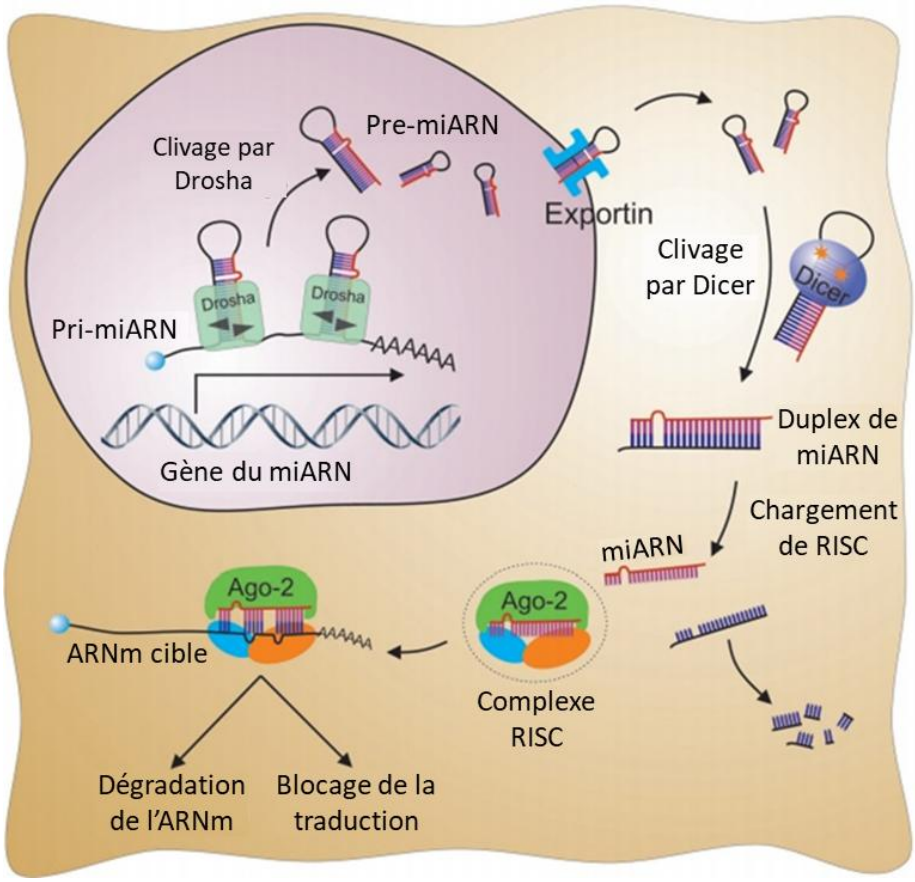


Figure 18 : Synthèse des miARNs et leurs mécanismes d'action.
Adapté de Ugalde *et al., « Micromanaging aging with miRNAs »*. Nucleus, 2011.

Les miARNs peuvent être synthétisés par des voies non canoniques. Par exemple, les miRtrons (des miARNs localisés dans des introns de gènes) sont synthétisés de manière indépendante de Drosha. Les extrémités du pré-miARN sont formées lors de l'épissage des gènes et non par clivage par Drosha. Le pré-miARN subit ensuite les mêmes étapes que dans la voie canonique. Il existe également des processus de synthèse indépendants de Dicer, le miR-451 est l'exemple le plus étudié. Après clivage par Drosha, le pré-miARN se fixe directement sur Ago2 qui le clive (Hammond, 2015b; Wahid et al., 2010).

3.2.2. Mécanismes d'action

Le miARN intégré dans le complexe RISC reconnait des ARNm qui lui sont complémentaires. Le miARN s'hybride majoritairement dans la région 3'UTR des ARNm, mais il peut également se fixer sur la région 5'UTR et, très rarement, les régions codantes. Chez les métazoaires, l'hybridation du duplex miARN-ARNm est souvent imparfaite, mais suit cependant des règles précises **(Figure 19)** : i) la complémentarité de l'ARNm avec la région « seed » du miARN doit impérativement être parfaite. ii) Les mésappariements ou boucles doivent être présents dans la région centrale du duplex miARN-ARNm (nucléotides 9 à 11). Ils empêchent alors le clivage de l'ARNm par la protéine Argonaute 2 (Ago2). iii) S'il n'y a pas de mésappariements, l'ARNm cible est alors clivé par Ago2 puis dégradé. iv) La complémentarité avec la région 3' du miARN doit être suffisante pour stabiliser le duplex (Filipowicz et al., 2008; Hammond, 2015b; Wahid et al., 2010).

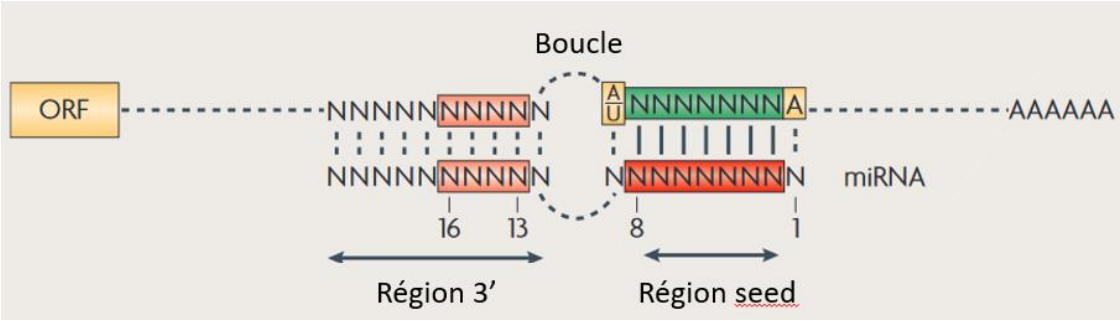


Figure 19 : Principes des interactions miARN-ARNm.
Adapté de Filipowicz *et al.*, *« Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? ».* Nature review genetics, 2008.

Comme décrit précédemment, le complexe RISC peut dégrader les ARNm cibles directement. Mais il peut également inhiber sa traduction par plusieurs mécanismes différents si la complémentarité du duplex n'est pas parfaite **(Figure 20)** :

- Par déadénylation : le complexe déadénylase CCR4-NOT est recruté, ce qui facilite l'élimination de la queue polyA de l'ARNm cible et sa dégradation. L'ARNm est transporté dans les « p-bodies » (granules cytoplasmiques de ribonucléoprotéines (RNP) composés principalement d'ARNm réprimés au niveau de la traduction et de protéines liées à la désintégration de l'ARNm) pour dégradation ou stockage.
- Par blocage de l'initiation de la traduction : soit lors de la reconnaissance de la coiffe, soit lors du recrutement des ribosomes (sous-unité 60S). Lors de ce processus, l'ARNm est également transporté dans les « p-bodies » pour dégradation ou stockage.
- Par protéolyse : en dégradant les peptides en élongation lors de la traduction de l'ARNm cible par les ribosomes.
- Par blocage de l'élongation : en ralentissant l'élongation ou en dissociant les ribosomes traduisant l'ARNm cible.

Les miARNs peuvent également activer l'expression de gènes cibles (Vasudevan et al., 2007). Certains sont réimportés dans le noyau et se fixent sur la région promotrice de gènes pour réguler positivement leur transcription (Place et al., 2008). Du fait de leur petite taille, les miARNs peuvent s'hybrider sur plusieurs ARNm différents, et ceux-ci peuvent être impliqués dans un même processus biologique. Un miARN peut être un activateur et un inhibiteur du même mécanisme biologique en fonction de sa cible. De plus, les miARNs peuvent avoir une action redondante, plusieurs miARNs pouvant cibler un même ARNm (Small & Olson, 2011).

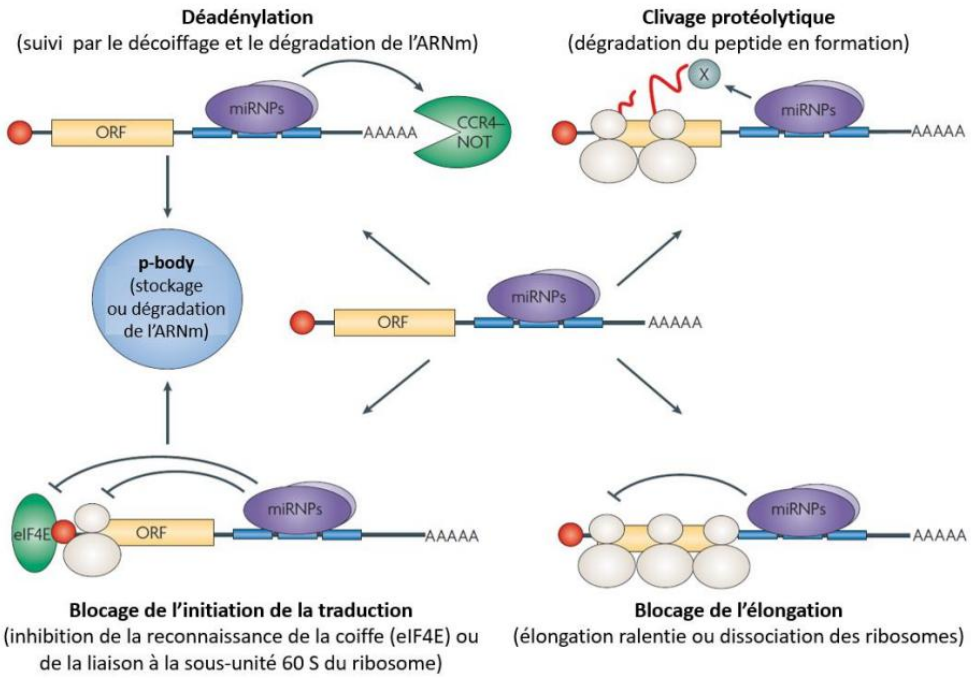


Figure 20 : Mécanismes proposés pour la répression post-transcriptionnelle des ARNm par les miARNs.
miRNPs représente le complexe RISC-miRNA ; ORF : Open Reading Frame, représente les cadres de lecture ouverts. Adapté de Filipowicz *et al*., *« Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? ».* Nature review genetics, 2008.

3.2.3. Rôles physiologiques

Les microARNs sont essentiels dans de nombreux processus biologiques. Leur importance se manifeste particulièrement lors du développement embryonnaire, comme en témoignent des études sur des modèles murins déficients pour les enzymes Dicer et DGCR8, entraînant une mort embryonnaire (Bernstein et al., 2003; Y. Wang et al., 2007). Des miARNs, tels que miR-196 et miR-10, ciblent des clusters de gènes *HOX,* jouant un rôle dans la formation de l'axe antéropostérieur (LAGOS-QUINTANA et al., 2003). Les facteurs de transcription SOX2, OCT4 et NANOG régulent l'expression de nombreux miARNs. De plus, l'expression de certains miARNs est sous le contrôle du promoteur de OCT4. (Boyer et al., 2005).

Les miARNs interviennent dans de nombreux processus physiologiques, tels que la prolifération, la différenciation, l'apoptose, l'angiogenèse et l'immunité. Par exemple, le cluster miR-15a-16-1 est impliqué dans la régulation du cycle cellulaire en provoquant un arrêt en phase G1, via le ciblage notamment de CDK1, CDK2, CDK6 et certaines cyclines (D1, D3 et E1) (Bueno & Malumbres, 2011). D'autres miARNs régulent des voies de signalisation cellulaire, comme le miR-146 qui module la voie NF-κB en ciblant Sirt1, IRAK1 et TRAF6 (Ma et al., 2011; H. Wang et al., 2017). Dans le cadre de l'apoptose, le miR-34 agit en ciblant BCL2 (Bommer et al., 2007), tandis que plusieurs autres miARNs régulent des protéines impliquées dans l'autophagie.

De nombreux miARNs présentent également une spécificité tissulaire. Par exemple, le miR-9 est exprimé préférentiellement dans les neurones (Jung et al., 2012b), le miR-122

dans le foie (Henke et al., 2008), et les miR-1 et miR-133 sont fortement présents dans le cœur, où le miR-133 participe à la prolifération des myoblastes, tandis que le miR-1 favorise leur différenciation (Romaine et al., 2015).

3.2.4. Implication des microARNs en pathologie humaine

Comme les miARNs régulent de nombreux processus physiologiques, ils sont, par conséquent, impliqués dans diverses pathologies. Des altérations des profils d'expression des miARNs ont été mises en évidence dans diverses maladies humaines, notamment le diabète, les maladies cardiovasculaires ou les maladies métaboliques **(Tableau 1)** (Paul et al., 2018; Saliminejad et al., 2019). Les miARNs sont également impliqués dans de nombreux cancers. En fonction de leurs gènes cibles, les miARNs peuvent jouer le rôle d'oncogènes ou de gènes suppresseurs de tumeurs. De plus, l'altération du clivage des microARNs par Drosha et Dicer favorise le développement du cancer. En particulier, dans un modèle de lignée cellulaire de cancer du côlon, la perte de fonction de DICER1 stimule la tumorigenèse et le potentiel métastatique (Iliou et al., 2014). Par ailleurs, la dérégulation des protéines Argonaute joue un rôle clé dans l'oncogenèse (Völler et al., 2013). Par exemple, les niveaux d'expression d'AGO2 sont significativement plus élevés dans les cancers gastriques primaires et leurs métastases ganglionnaires, comparés aux tissus sains (J. Zhang et al., 2013).

D'autres miARNs sont impliqués dans des maladies génétiques. Une mutation ponctuelle dans la région « seed » du miR-96 est responsable de la perte d'audition non syndromique autosomique dominante (Mencía et al., 2009). La délétion d'une copie du cluster miR-17∼92 entraîne des anomalies du squelette, des défauts de croissance et des troubles de l'apprentissage (de Pontual et al., 2011; Y.-C. Han et al., 2015).

Maladies	miARNs	Références bibliographiques
Diabète	miR-124a2	(Baroukh et al., 2007)
	miR-195, miR-15a et b, miR-16	(Joglekar et al., 2007)
	miR-369-5p, miR-130a, miR-27a, miR-410, miR-337, miR-532, miR-320, miR-192, and miR-379	(Hennessy et al., 2010)
	miR-375	(El Ouaamari et al., 2008; Kloosterman et al., 2007; Poy et al., 2004, 2007, 2009; Xia et al., 2011)
	miR-29a, 29b1, 29b2	Rupaimoole & Slack, 2017
	miR-200a	Belgardt et al., 2015; Hennessy et al., 2010
Cardiomyopathie	miR-1, miR-206	Shan et al., 2010
	miR-320	X. Wang et al., 2009
	miR-22	Huang et al., 2013
	miR-548c ,548i	Gupta et al., 2013
Athérosclérose	miR-155	(Weber et al., 2014)
	miR-16	(Shanmugam et al., 2008)
Insuffisance cardiaque	miR-122, miR-210, miR-423-5p, miR-499, miR-622	(Romaine et al., 2015)
	miR-143, miR-145	(W. Zhao et al., 2015)

Tableau 1 : Exemples de miARNs impliqués en pathologie humaine.

3.2.5. Outils thérapeutiques

3.2.5.1. Les antimiRs

Les antimiRs sont des oligonucléotides antisens modifiés conçus pour cibler spécifiquement les microARNs surexprimés dans certaines pathologies. Grâce à leur complémentarité avec le microARN d'intérêt, ils se lient à celui-ci, l'inactivent et empêchent ainsi son interaction avec ses cibles. Pour améliorer leur stabilité et leur efficacité, des modifications sont souvent nécessaires, comme la conjugaison à un ligand ou l'intégration de structures spécifiques. Par exemple, les antimiRs LNA (« Locked Nucleic Acid ») intègrent des acides nucléiques bicycliques modifiés par un pont méthylène entre les atomes 2'O et 4'C du sucre, ce qui leur confère une grande stabilité face aux nucléases et améliore leurs propriétés pharmacocinétiques, telles que leur demi-vie et leur absorption cellulaire.

La première stratégie thérapeutique utilisant les miARNs mise en œuvre chez l'Homme repose sur l'inhibition du miR-122, un microARN spécifique du foie. Ce dernier interagit avec la région 5'UTR du génome du virus de l'hépatite C, stabilisant l'ARN viral et favorisant ainsi la réplication du virus. L'antimiR *Miravirsen*®, un oligonucléotide antisens ciblant le miR-122, réduit efficacement les niveaux d'ARN viral. Il a fait l'objet d'une phase II d'essais cliniques pour le traitement de l'hépatite C (NCT01200420) qui a montré des résultats prometteurs (Santaris Pharma A/S, 2012). L'inhibition du miR-122 entraîne une réduction durable de l'ARN viral (Janssen et al., 2013).

3.2.5.2. Les mimics

Les mimics sont de petites molécules d'ARN double-brin synthétiques qui imitent les duplexes de miARNs endogènes matures, reproduisant ainsi leur mécanisme d'action. Ces duplexes, pris en charge par le complexe RISC, augmentent l'effet du miARN sur ses cibles en rétablissant ou renforçant leur expression. Dans certains cas, une boucle pré-miARN peut être ajoutée pour permettre un clivage par Dicer avant leur intégration dans le complexe RISC.

Pour garantir leur efficacité et leur stabilité *in vivo,* des modifications sont apportées à leur structure, notamment sur les riboses, afin d'améliorer leur résistance aux nucléases, de faciliter leur incorporation dans RISC, de sélectionner préférentiellement le brin actif et d'optimiser leurs propriétés pharmacodynamiques. Par ailleurs, des vecteurs tels que des polymères, des liposomes ou des émulsions lipidiques neutres sont utilisés pour protéger les mimics contre une éventuelle dégradation intracellulaire. Ces mimics sont actuellement explorés en thérapeutique.

3.2.5.3. Les bloqueurs de sites cibles (Target Site Blockers)

Les bloqueurs de sites cibles, ou Target Site Blockers (TSB), sont des oligonucléotides antisens conçus pour empêcher spécifiquement l'interaction entre un miARN mature endogène et la séquence de son ARNm cible. En se fixant avec une haute affinité sur cette séquence cible, les TSB masquent le site d'interaction du miARN, empêchant ainsi toute régulation post-transcriptionnelle sans induire la dégradation de l'ARNm sur lequel ils se lient. Ces outils thérapeutiques sont principalement étudiés dans des modèles précliniques. Ils offrent une approche innovante et ciblée pour bloquer l'effet des miARNs dans diverses pathologies en modulant leur interaction avec de transcrits spécifiques.

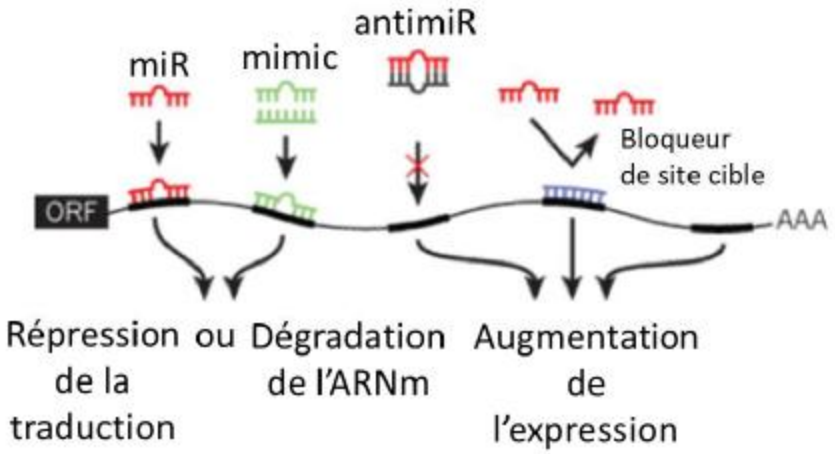


Figure 21 : Mode d'action des antimiRs, des mimics et des TSB.
Adapté de Small *et al., « Pervasive roles of microARNs in cardiovascular biology ».* Nature, 2011.

3.3. Les longs ARNs non-codants

Les lncARNs sont des transcrits de plus de 200 nucléotides qui ne sont pas traduits en protéines. Cette catégorie hétérogène inclut des transcrits intergéniques, antisens ou introniques (Mattick et al., 2023). Ils sont principalement spécifiques à un tissu et jouent un rôle clé dans la différenciation et le développement. MALAT1 et NEAT1 comptent parmi les rares lncARNs qui ne sont pas spécifiques à un tissu ou à un type cellulaire. Ils participent à la régulation de la traduction, du métabolisme et des voies de signalisation. On leur attribue diverses fonctions, telles que la régulation transcriptionnelle en cis ou en trans, l'organisation de domaines nucléaires, ainsi que la modulation de l'activité des protéines ou d'autres molécules d'ARN.

3.3.1. Classification

Les lncARNs sont répertoriés dans la base de données NONCODE. La base en décrit 172 216 chez l'Homme (*NONCODE*, s. d.). La fonction de la plupart des lncARNs n'est à ce jour pas décrite, mais l'implication de certains a été décrite dans la régulation de l'empreinte parentale, le cycle cellulaire, la pluripotence, la longueur des télomères…

Les lncARNs peuvent être classés de différentes manières, mais la classification la plus couramment utilisée repose sur leur localisation génomique d'origine **(Figure 22)** (Y. Tang et al., 2017).

- **LncARNs intergéniques (lincRNA) :** Ils sont transcrits à partir de régions non codantes situées entre les gènes codant pour les protéines et ne se chevauchent pas avec eux. Ils fonctionnent souvent indépendamment des gènes voisins avec leurs propres promoteurs et enhancers. Ils constituent la classe prédominante des lncARNs.
- **LncARNs introniques :** Ils sont transcrits à partir des introns des gènes codant des protéines sans chevaucher les exons. Ils peuvent provenir du brin sens ou antisens.
- **LncARNs enhancer (eARNs) :** Ils sont transcrits à partir de régions enhancers et peuvent être unidirectionnels ou bidirectionnels.
- **LncARNs associés aux promoteurs :** Ils sont transcrits dans une direction opposée au transcrit codant une protéine, à partir de régions proches d'un promoteur.
- **Les lncARNs sens :** sont transcrits à partir des brins sens des gènes codant des protéines, et peuvent chevaucher un ou plusieurs introns et/ou exons de la séquence sens.
- **LncARNs antisens :** Ils sont transcrits à partir du brin opposé d'un gène codant p une protéine, souvent en chevauchant des régions exoniques ou introniques du gène codant. Ils jouent souvent un rôle régulateur en interagissant avec leurs transcrits d'ARNm.
- **LncARNs chevauchant les régions non traduites (UTR) :** Ils sont transcrits à partir de séquences d'ADN chevauchant les régions 3'UTR ou 5'UTR d'un gène codant pour une protéine sur le brin sens.

Il existe également des lncARNs circulaires (circARN) qui se caractérisent par un mécanisme d'épissage circulaire appelé « back-splicing ». Ces ARN circulaires s'accumulent souvent dans le noyau, où ils remplissent une fonction comparable à celle des lncARNs introniques, tout en pouvant également être exportés vers le cytoplasme.

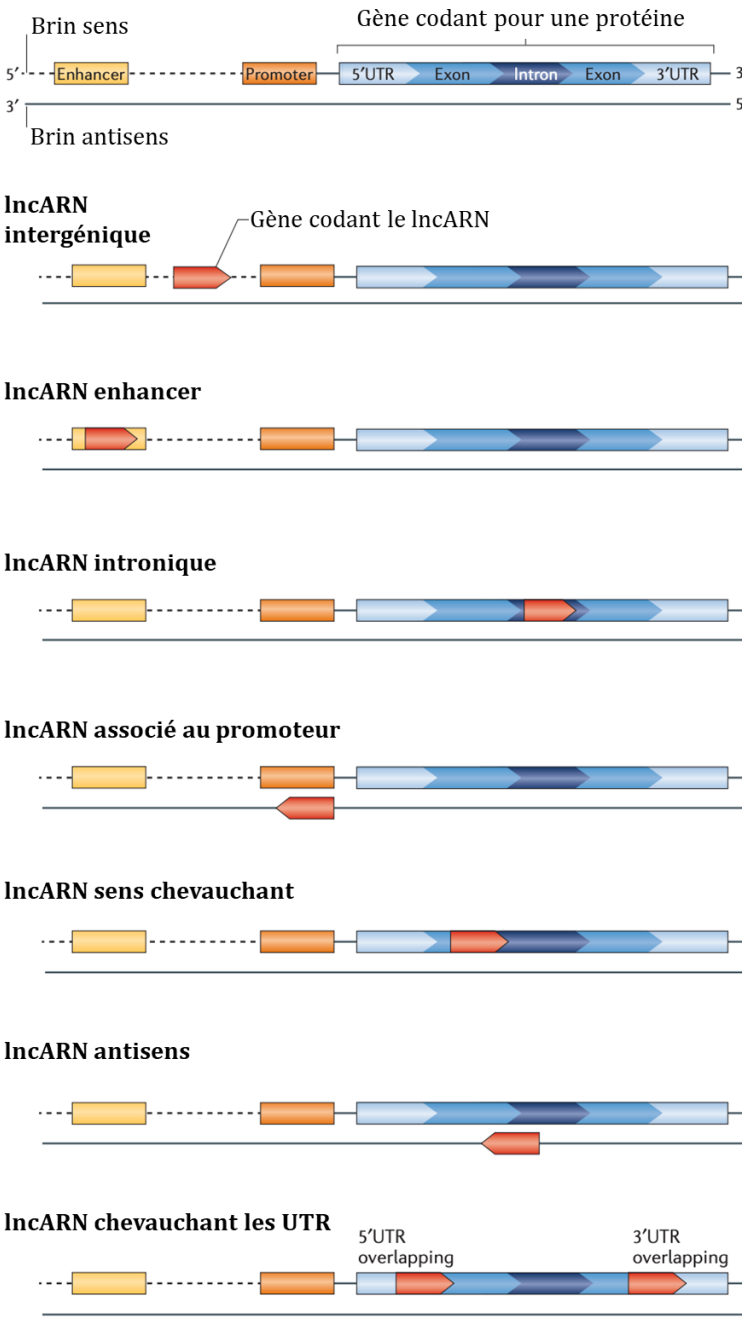


Figure 22 : Classification des lncARNs.
Adaptée de Tang *et al., « The role of long non-coding RNAs in rheumatic diseases »*. Nature Reviews Rheumatology, 2017.

3.3.2. Synthèse

La transcription des lncARNs se déroule en 3 étapes : l'initiation, l'élongation et la terminaison. La transcription est régulée par des séquences régulatrices (enhancers ou promoteurs).

La synthèse des longs ARN non codants est très similaire à celle des ARNm. La plupart des lncARNs sont transcrits par l'ARN polymérase II. Ces transcrits sont coiffés et polyadénylés, comme les ARNm, bien que les lncARNs présentent généralement des niveaux d'expression plus faibles et une plus grande spécificité tissulaire. Malgré les

hypothèses initiales d'instabilité, la plupart des lncARNs sont stabilisés par la polyadénylation ou des structures secondaires, telles que de triples hélices à leurs extrémités 3′. Contrairement aux ARNm, les lncARNs subissent un épissage alternatif important, ce qui donne lieu à de multiples isoformes dont la localisation et les fonctions potentielles sont diverses. Ce processus d'épissage, bien que moins efficace que pour les ARNm, contribue à leur complexité fonctionnelle au sein de la cellule.

Les lncARNs sont majoritairement localisés dans le noyau, où ils interagissent dès leur transcription avec des protéines stabilisatrices ou médiatrices de leurs fonctions. Cela est particulièrement vrai pour les lncARNs de grande taille (>3 kb), dotés d'une structure complexe et riches en séquences répétées, qui restent presque exclusivement nucléaires. Par exemple, NEAT1 est associé au spliceosome durant sa transcription, dont il constitue l'un des composants (Clemson et al., 2009).

Cependant, certains lncARNs peuvent être exportés vers le cytoplasme, un processus qui partage des mécanismes avec celui des ARNm. Par défaut, les longs ARN sont exportés hors du noyau, sauf s'ils contiennent des éléments de rétention nucléaire. Cette exportation dépend du complexe TREX et du récepteur de transport nucléaire Nxf1/TAP-Nxt1/p15 (Guo et al., 2020).

3.3.3. Mécanisme d'action

3.3.3.1. LncARNs nucléaires

- **<u>Modification de la chromatine</u>**

Les lncARNs jouent un rôle crucial dans la régulation de la chromatine, en influençant son organisation et son accessibilité transcriptionnelle. Ils guident des complexes de remodelage, tels que PRC2, YY1 et CTCF, vers des sites spécifiques grâce à des interactions ADN-ARN, notamment via la formation de triplex ADN-ARN. Certains lncARNs, comme TARID, agissent par la formation de structures ADN-ARN appelées R-loops, qui modifient localement la chromatine, favorisant par exemple l'expression de TCF21 en ciblant son promoteur. XIST est le lncARN le plus emblématique dans le remodelage de la chromatine. Il inactiverait le chromosome X en recrutant des enzymes comme SMCHD1. D'autres lncARNs, tels qu'ANRIL et TERRA, contribuent à la répression génique et à la formation d'hétérochromatine. Certains modulent également la topologie chromatinienne, comme ThymoD, qui facilite l'expression de gènes clés tels que Bcl11b en influençant les boucles reliant promoteurs et enhancers. Enfin, d'autres lncARNs, à l'instar d'Airn, repositionnent les nucléosomes et réorganisent les ancrages des boucles contrôlées par CTCF (Herman et al., 2022; Schmitz et al., 2016).

- **<u>Régulation de la transcription</u>**

Les lncARNs régulent la transcription en interagissant avec des facteurs de transcription et des régions cis-régulatrices. Certains lncARNs recrutent des complexes médiateurs dans des régions enhancers, ce qui stabilise la formation de boucles ADN nécessaires pour activer la transcription des gènes associés. DEANR1, un lncARN

impliqué dans la différenciation endodermique, recrute SMAD2/3 au niveau du promoteur de FOXA2 pour activer son expression. D'autres lncARNs empêchent les enzymes telles que les DNMTs (ADN méthyltransférases) de méthyler l'ADN dans leur région promotrice, favorisant ainsi la transcription des ARNm. Lorsqu'ils sont transcrits à partir de régions enhancers, certains lncARNs peuvent perturber les interactions physiques entre enhancers et promoteurs, inhibant ainsi la transcription des gènes codant des protéines. Certains lncARNs agissent comme des échafaudages, reliant différentes protéines pour permettre leur action coordonnée. RMST facilite la liaison de SOX2 à ses sites cibles pour la différenciation neuronale (Herman et al., 2022; Schmitz et al., 2016).

- **Régulation de l'épissage**

Les lncARNs jouent un rôle central dans la régulation de l'épissage en influençant directement ou indirectement les mécanismes moléculaires impliqués. Ils modulent l'équilibre entre l'épissage canonique et le rétro-épissage qui génère des circARNs. Les lncARNs linéaires, comme les transcrits antisens naturels (NATs), agissent également sur l'épissage en formant des hybrides ARN-ARN avec les pré-ARNm pour moduler les isoformes d'épissage, comme asFGFR2 qui altère l'épissage de FGFR2 via des modifications de la chromatine. D'autres NATs, comme NAT Zeb2, bloquent l'épissage en maintenant des introns fonctionnels essentiels à la traduction. Enfin, certains lncARNs influencent l'activité des facteurs d'épissage via leur localisation dans des structures nucléaires (Herman et al., 2022).

3.3.3.2. LncARNs cytoplasmiques

- **Renouvellement des ARNm**

Les lncARNs régulent le renouvellement des ARNm en influençant leur stabilité et leur dégradation. Ces processus, qui incluent le décoiffage en 5', la déadénylation en 3' et la dégradation par des ribonucléases, sont modulés par des interactions entre lncARNs, protéines liant les ARNs (RBPs) et microARNs. Certains lncARNs, comme ceux contenant des éléments répétitifs (par exemple, Alu ou SINEs), forment des structures d'ARN double-brin (dsARN) avec les ARNm cibles, déclenchant la dégradation des ARNm via la voie médiée par STAU1 (SMD). À l'inverse, d'autres lncARNs stabilisent les ARNm cibles en interagissant avec eux, comme TINCR, qui interagit avec STAU1 pour préserver des ARNm impliqués dans la différenciation épidermique (Herman et al., 2022).

- **Régulation de la traduction**

Les lncARNs peuvent favoriser ou réprimer la traduction en s'appariant avec des ARNm. Par exemple, LincRNAp21 s'apparie aux ARNm de JUNB et CTNNB1, réduisant leur association aux polysomes et abaissant ainsi la production des protéines correspondantes, via le recrutement du répresseur traductionnel RCK. À l'inverse, l'ARN antisens ASUchl1 favorise la traduction de l'ARNm Uchl1 en conditions de stress, où un élément SINE B2 dans ASUchl1 se lie à Uchl1 pour augmenter sa traduction (Herman et al., 2022).

- **Modification post-traductionnelle des protéines et stabilité**

Les lncARNs jouent un rôle clé dans la régulation des modifications post-traductionnelles des protéines, influençant ainsi leur fonctionnalité, leur activité et leur stabilité. Par exemple, lnc-DC, exprimé préférentiellement dans les cellules dendritiques, interagit avec la partie C-terminale de STAT3 dans le cytoplasme, augmentant son niveau de phosphorylation en inhibant l'activité phosphatase de SHP1/PTPN6. À l'inverse, NKILA (NF-κB-interacting lncRNA) limite l'activité de NF-κB en bloquant la phosphorylation d'IκB par la kinase IKK, empêchant ainsi l'activation de NF-κB ; une faible expression de NKILA conduit à une hyperactivation de NF-kB, notamment dans les cellules cancéreuses. Les lncARNs influencent également la dégradation des protéines via le système ubiquitine-protéasome. HOTAIR, par exemple, facilite la dégradation de protéines telle qu'ATXN1 et SNUPN en liant les ligases ubiquitine E3 DZIP3 et MEX3B, accélérant ainsi leur ubiquitination et leur élimination. À l'opposé, certains lncARNs stabilisent les protéines, comme FAST (FOXD3-AS1), qui protège la β-caténine de la dégradation (Herman et al., 2022).

- **LncARNs mitochondriaux**

Les lncARNs mitochondriaux régulent l'homéostasie et le métabolisme énergétique des mitochondries, contribuant à divers processus biologiques. Certains lncARNs, tels que lncND5, lncND6, et lncCyt b, sont directement transcrits à partir de l'ADN mitochondrial, tandis que d'autres, comme RMRP, sont transcrits dans le noyau et importés dans les mitochondries. RMRP, par exemple, influence la réplication de l'ADN mitochondrial grâce à des interactions avec des protéines telles que PNPase et GRSF1. D'autres lncARNs mitochondriaux participent à la régulation des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et de la respiration cellulaire. Par ailleurs, le lncARN nucléaire SAMMSON favorise la localisation de p32 dans les mitochondries, augmentant ainsi la production de protéines codées par l'ADN mitochondrial et renforçant l'activité des complexes respiratoires I et IV. Enfin, certains lncARNs modulent les interactions métaboliques entre les mitochondries et d'autres structures cellulaires. Par exemple, LINC00473, transcrit en réponse à la noradrénaline, se localise à l'interface entre les mitochondries et les gouttelettes lipidiques, interagissant avec Perilipin 1 pour réguler la fusion et la fission mitochondriales (Herman et al., 2022).

3.3.4. Implication des lncARNs en pathologie humaine

Les lncARNs jouent un rôle central dans le cancer, intervenant dans la tumorigenèse, la progression tumorale et la réponse aux traitements. Leur expression spécifique, observée dans les tumeurs primaires, les métastases et les tissus normaux adjacents, permet de classifier les cancers en sous-types et d'identifier des thérapies ciblées. Par exemple, HOTAIR est l'un des lncARNs les mieux étudiés. Sa surexpression dans les cellules cancéreuses épithéliales provoque un repositionnement de la protéine polycomb PRC2 à travers le génome, augmentant le potentiel invasif et métastatique de ces cellules. À l'inverse, la perte d'expression de HOTAIR réduit l'invasion tumorale, en particulier

dans les cellules présentant une forte activité de PRC2, illustrant son rôle actif dans la modulation de l'épigénome des cellules cancéreuses. De même, des lncARNs comme FAL1 et MALAT1, amplifiés ou surexprimés dans divers cancers, voient leur déplétion réduire la malignité dans des modèles expérimentaux. Certains, comme p15AS, inhibent l'expression de gènes suppresseurs de tumeurs en favorisant la formation d'hétérochromatine, tandis que d'autres, comme ANRIL, UCA1 ou lincRNA-p21, interagissent avec des voies clés dans le cancer, telles que celles dépendantes de p53. Ces découvertes positionnent les lncARNs non seulement comme des régulateurs majeurs de la biologie tumorale, mais également comme des cibles thérapeutiques prometteuses en oncologie (L. Chen et al., 2021; Esteller, 2011; Sanchez et al., 2023; Schmitz et al., 2016; C.-C. Sun et al., 2023).

Les lncARNs sont de plus en plus associés aux maladies cardiovasculaires (CVD), principales causes de mortalité dans les sociétés occidentales. Des régions génomiques impliquées dans l'infarctus du myocarde codent pour des lncARNs, comme MIAT et ANRIL. La suppression d'une région de 70 kb incluant une grande partie du locus ANRIL accroit la mortalité des souris, particulièrement celles sous régime riche en graisses (Visel et al., 2010). Par ailleurs, des analyses de séquençage ARN ont révélé des changements d'expression de nombreux lncARNs après infarctus du myocarde induit chirurgicalement chez la souris. Parmi eux, le lncARN Mhrt, dérivée du locus Myh7 (gène clé dans les contractions cardiaques), était réduit après l'infarctus. Son expression ectopique a permis de réduire la gravité des symptômes chez des souris en convalescence (P. Han et al., 2014). En outre, des études sur le plasma de patients ont identifié LIPCAR, un lncARN mitochondrial, comme biomarqueur potentiel corrélé à la mortalité liée aux CVD (Kumarswamy et al., 2014). Bien que son rôle causal reste à élucider, ces découvertes soulignent le potentiel des lncARNs en tant que biomarqueurs et cibles thérapeutiques. Leur expression hautement spécifique permet de cibler des sous-groupes cellulaires sans effets systémiques importants, offrant des traitements plus précis et potentiellement mieux tolérés (Schmitz et al., 2016).

4. ARNs non codants et vieillissement

4.1. Vieillissement physiologique

Les geromiRs sont un sous-groupe spécifique de miARNs impliqués dans la régulation du processus de vieillissement (Caravia et al., 2017). Ces miARNs jouent un rôle essentiel dans la modulation des différentes marques cellulaires et moléculaires du vieillissement, appelées "hallmarks of aging" (López-Otín et al., 2023). Ces mécanismes incluent l'instabilité génomique, le raccourcissement des télomères, les altérations épigénétiques, la perte de la protéostasie, le dérèglement de la détection des nutriments, le dysfonctionnement mitochondrial, la sénescence cellulaire, l'épuisement des cellules souches et la communication intercellulaire altérée.

Les geromiRs agissent en régulant l'expression des gènes associés à ces processus, influençant ainsi la durée de vie et la santé des organismes. Les geromiRs sont impliqués dans :

- **Régulation de la réponse aux dommages de l'ADN :** les membres de la famille miR-34 sont activés par la protéine p53 en réponse à des dommages à l'ADN. L'inhibition du miR-34a protège les cellules de l'apoptose induite par les dommages à l'ADN (Rokavec et al., 2014).
- **Contrôle des télomères** : Le miR-23a cible directement TRF2, une protéine du complexe shelterin qui protège les télomères, provoquant ainsi une fragilité télomérique et des altérations chromosomiques (Luo et al., 2015).
- **Altérations épigénétiques** :
    - Le miR-34a inhibe SIRT1, une déacétylase impliquée dans la régulation métabolique et la réponse au stress. Cette inhibition favorise la sénescence cellulaire dans différents contextes (Tazawa et al., 2007).
    - Des miARNs comme miR-290 modulent également les niveaux de méthyltransférases de l'ADN, modifiant l'épigénome et contribuant au vieillissement (Benetti et al., 2008).
- **Régulation des voies métaboliques** : Les miARNs comme miR-1 ciblent l'ARNm de IGF-1, impliquée dans des voies de signalisation majeures de régulation de la durée de vie. Chez des modèles murins, des geromiRs spécifiques réduisent l'activité du récepteur IGF-1, contribuant à prolonger la durée de vie (Mariño et al., 2010a).
- **Sénescence cellulaire** : Certains geromiRs, comme let-7, empêchent la sénescence en régulant les complexes répressifs du cycle cellulaire, permettant ainsi l'expression de gènes favorisant la prolifération (Benhamed et al., 2012).

Ces propriétés font des geromiRs des cibles potentielles pour des interventions thérapeutiques visant à ralentir le vieillissement ou traiter des maladies liées à l'âge (Caravia et al., 2017; López-Otín et al., 2023).

4.2. Progeria de Hutchinson-Gilford

Ces dernières années, les miARNs sont devenus des outils et des cibles utiles pour identifier de nouveaux mécanismes physiopathologiques et pour proposer de nouvelles approches thérapeutiques dans de nombreuses maladies. Dans la Progeria, l'implication de plus en plus de miARNs est décrite.

- **miR-9** (Jung et al., 2012b; Nissan et al., 2012)

Les patients atteints de Progeria présentent un vieillissement systémique, mais ils ne souffrent d'aucun trouble cognitif. Ce phénomène s'explique par l'absence physiologique de lamine A dans les neurones, due à l'expression du miR-9 dans les cellules neurales. Le miR-9 cible la région 3'UTR de la prélamine A, inhibant ainsi la synthèse de la lamine A tout en réprimant également celle de la progérine, chez les patients HGPS. En effet, l'expression de miR-9 ectopique dans des cellules qui ne l'expriment pas naturellement (comme les fibroblastes embryonnaires murins [MEFs] ou les cellules souches

mésenchymateuses [MSCs]) réduit la production de lamine A et de progérine, mais n'affecte pas celle de la lamine C. De plus, la transfection du préARN-miR-9 dans des MSCs dérivées de cellules souches pluripotentes induites (iPSCs) de patients HGPS diminue significativement la proportion de noyaux anormaux (48 % dans les cellules traitées contre 60 % dans les cellules non traitées).

- **miR-342-5p** (C.-L. Zhang et al., 2017)

La surexpression du miR-342-5p dans les MEF *Zmpste24*$^{-/-}$ améliore le phénotype de sénescence cellulaire. Il favorise la prolifération cellulaire et augmente la proportion des cellules en phases G2 et M du cycle cellulaire, en ciblant GAS2 (Growth-arrest-specific 2) qui joue un rôle dans la régulation des microfilaments pendant l'apoptose. Néanmoins, le phénotype cellulaire opposé n'est pas observé dans les MEF de WT transfectées avec l'antimiR-342-5p.

- **miR-365** (X. Xiong et al., 2015)

Le miR-365 est significativement sous exprimé dans les MEFs *Zmpste24*$^{-/-}$. La surexpression du miR-365 dans les MEFs *Zmpste24*$^{-/-}$ augmente la prolifération cellulaire et diminue le pourcentage de cellules sénescentes, tandis que l'inhibition de la fonction du miR-365 conduit à l'activation de la sénescence dans les MEFs WT. De plus, ce miR cible Rasd1, un membre de la superfamille Ras.

- **miR-59** (Hu et al., 2023)

Récemment, Hu *et al,* ont identifié un miR-ARN comme potentielle voie thérapeutique dans la Progeria. Le miR-59 est surexprimé dans une lignée contrôle exprimant la progérine, dans deux lignées HGPS ainsi que dans plusieurs tissus de souris *Lmna*$^{G609G/G609G}$. Le miR-59 inhibe le cycle cellulaire via les protéines HMGA (High Mobility Group A), des petites protéines associées à la chromatine qui peuvent moduler la transcription en modifiant l'architecture de la chromatine. La transfection de l'anti-miR-59 dans des cellules HGPS réduit la sénescence cellulaire en stimulant le cycle cellulaire. Le traitement de souris *Lmna*$^{G609G/G609G}$ par anti-miR-59 inséré dans un vecteur AAV9, réduit la fibrose dans les quadriceps, le cœur et l'aorte, diminue la perte de graisse dermique, et augmente la longévité des souris de 25,5 %.

- **miR-376a-3p et miR-376b-3p** (Frankel et al., 2022)

Notre équipe a réalisé une analyse ciblée du miRNome par RT-qPCR dans des fibroblastes dermiques de patients HGPS et de témoins, permettant d'identifier un cluster de microARNs surexprimés localisé sur le locus 14q32.2-14q32.3. Grâce à l'utilisation de la technique FISH 3D, nous avons mis en évidence une association entre la surexpression de ce cluster et un remodelage de la chromatine au niveau de ce locus dans les fibroblastes HGPS, en lien avec l'accumulation de progérine. Parmi ces microARNs, nous avons montré que la surexpression 376b-3p et miR-376a-3p dans des fibroblastes contrôles entraîne une réduction de la prolifération cellulaire en ciblant CDK2 et favorise la sénescence. À l'inverse, leur inhibition dans les fibroblastes HGPS corrige les défauts de prolifération et de sénescence.

- **<u>miR-29</u>** (Swahari et al., 2024; Ugalde et al., 2011)

L'expression du miR-29 est fortement dérégulée dans le modèle murin *Zmpste24*$^{-/-}$ ainsi que lors du vieillissement normal (Caravia & López-Otín, 2015), ce qui souligne son importance fonctionnelle. La transcription du miR-29 est activée en réponse à des lésions de l'ADN et dépend de l'action de p53. Une fois activé, le miR-29 réprime la phosphatase Ppm1d, qui agit normalement comme un régulateur négatif de p53, entraînant ainsi une amplification de l'activité de ce dernier. Des études fonctionnelles ont montré que la perte partielle de miR-29 prolonge significativement la durée de vie des souris *Zmpste24*$^{-/-}$, tandis que sa surexpression conditionnelle (modèle miR-29TG) est suffisante pour induire des phénotypes liés au vieillissement, tels que des altérations tissulaires, et provoquer une mortalité précoce.

- **<u>miR-34a-5p</u>** (Manakanatas et al., 2022)

Le miR-34a-5p joue un rôle central dans la régulation de la sénescence, particulièrement dans les cellules endothéliales des souris modèles de la Progeria. Dans un modèle de souris exprimant la progérine spécifiquement dans l'endothélium, il est fortement exprimé dans les régions prédisposées à l'athérosclérose de l'arc aortique, ainsi que dans les tissus cardiaques et pulmonaires, et circule dans le sang à des taux élevés. Son knockdown entraîne une diminution de p53, un régulateur majeur de la sénescence, et de p16, un marqueur de la sénescence tardive, sans aucun effet sur p21. Par ailleurs, l'inhibition de p53 réduit l'expression de miR-34a-5p et atténue partiellement l'arrêt du cycle cellulaire médié par p21, avec un impact modéré sur le SASP. Le miR-34a-5p agit donc sur deux voies distinctes, impliquant p53 et p16, pour renforcer et maintenir de manière synergique un état de sénescence. Ce mécanisme contribue directement au développement des pathologies cardiovasculaires liées à la Progeria.

- **<u>miR-141-3p</u>** (Yu et al., 2013)

L'expression de miR-141-3p augmente progressivement au cours de la sénescence cellulaire. La transfection de cellules souches mésenchymateuses humaines (hMSCs) avec miR-141-3p réduit l'expression de ZMPSTE24, ce qui entraîne une accumulation de prélamine A et une augmentation des niveaux de $p16^{INK4A}$ et de γH2AX, des marqueurs associés à la sénescence et aux dommages à l'ADN. Par ailleurs, des formes transcriptionnellement actives d'histones sont enrichies dans les régions codantes de miR-141-3p, et l'ARN polymérase II se lie activement à ces régions pendant la sénescence réplicative. Les inhibiteurs des HDAC (histone désacétylases) induisent l'acétylation des histones dans les régions codantes de miR-141-3p et augmentent son expression dans les hMSCs, ce qui suggère que l'activité des HDAC influence l'expression de ce miARN au cours du vieillissement. Enfin, la transfection d'anti-miR-141-3p atténue les effets induits par les inhibiteurs d'HDAC sur l'expression de ZMPSTE24.

- **<u>miR-1</u>** (Mariño et al., 2010b)

La surexpression du miR-1 perturbe la régulation hormonale chez les souris *Zmpste24*$^{-/-}$, jouant un rôle déterminant dans la diminution de la synthèse hépatique de l'IGF-1. Cette diminution se maintient malgré des concentrations élevées d'hormone de croissance circulante, soulignant l'influence majeure du miR-1 sur l'axe somatotrope.

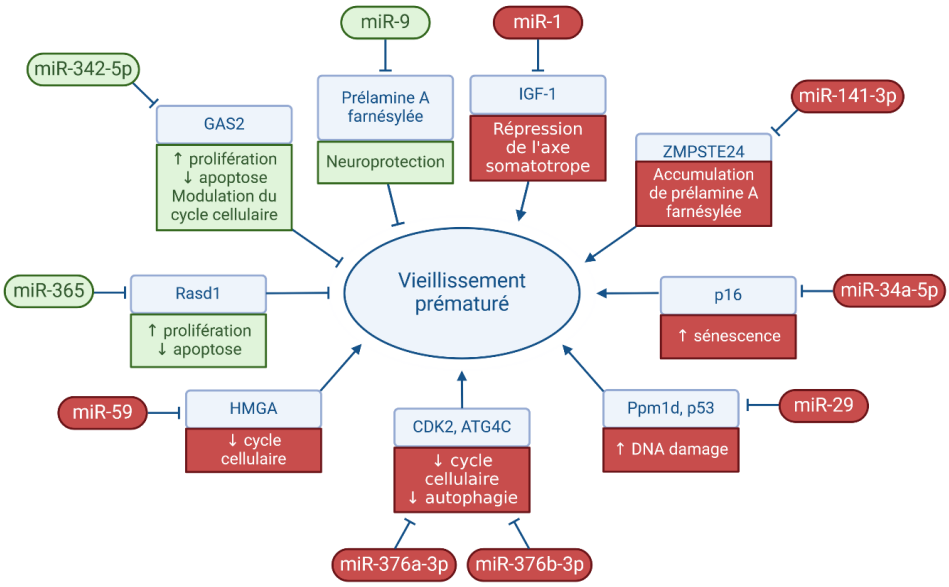


Figure 23 : miARNs et leurs cibles, impliqués dans le vieillissement pathologique.
Les miARNs représentés en vert inhibent le vieillissement prématuré, tandis que ceux en rouge y participent. Ce schéma est proposé en se basant sur les résultats obtenus sur des modèles in vitro et in vivo de syndromes de vieillissement accéléré. Créé avec https://BioRender.com. (Frankel et al., 2018, 2022; Hu et al., 2023; Jung et al., 2012b; Manakanatas et al., 2022; Mariño et al., 2010b; Nissan et al., 2012; Swahari et al., 2024; Ugalde et al., 2011; X. Xiong et al., 2015; Yu et al., 2013; C.-L. Zhang et al., 2017)

Deuxième partie : Résultats

1. Avant-propos

Comme détaillé dans l'introduction de mon manuscrit, la Progeria de Hutchinson-Gilford est une maladie génétique entraînant un vieillissement prématuré et accéléré, au pronostic très sombre.

Depuis l'identification en 2013 du gène causal, *LMNA*, conjointement par notre équipe et celle de Francis Collins aux États-Unis, des efforts considérables ont été déployés par de nombreuses équipes dans le monde afin de connaître la physiopathologie de ce syndrome, avec des objectifs thérapeutiques à terme.

Grâce à ces efforts, on connaît aujourd'hui les principaux mécanismes pathogènes impliquant en premier lieu, dans les formes classiques et HGPS-like, la production et l'accumulation de progérine ou de prélamine A farnésylée dans les cellules des patients. Cette protéine toxique est à l'origine d'une sénescence prématurée qui contribue au vieillissement prématuré et accéléré des patients.

Depuis plusieurs années, notre groupe, dirigé par Patrice Roll, cherche à mieux comprendre l'implication des mécanismes épigénétiques dans la Progeria, en particulier, celle des ARNs non codants dont les microARNs, encore peu explorée.

Les travaux de l'équipe ont déjà montré la contribution des miARNs miR-376a-3p et miR-376b-3p dans la physiopathologie de ce syndrome (Frankel et al., 2022). Plus récemment, nos recherches ont identifié deux nouveaux miARNs, les miR-140-5p et miR-140-3p, dont le rôle pourrait être majeur dans la Progeria en raison de leurs cibles.

L'objectif de ma Thèse a été d'étudier certains des mécanismes moléculaires altérés par la surexpression de ces deux miARNs dans les fibroblastes de patients HGPS et dans un modèle murin de cette maladie. J'ai également participé à la mise en place d'autres modèles *in vitro* et *ex vivo*, notamment à l'aide de cellules iPSc générées à partir de cellules de patients HGPS. J'ai abordé par ailleurs au cours de ma Thèse, d'autres mécanismes épigénétiques en identifiant la surexpression de longs ARN non codants qui pourraient également être des acteurs dans cette pathologie.

L'article 1 est une revue de la littérature faisant la synthèse du rôle des miR-140-5p et miR-140-3p dans les pathologies du vieillissement. Il permettra d'introduire le travail présenté dans **l'article 3** qui étudie plus particulièrement le miR-140-5p.

L'article 2, placé en annexe de ce manuscrit, retrace des travaux collaboratifs auxquels j'ai participé. Dans cette étude, notre équipe a utilisé des cellules souches mésenchymateuses (MSCs) différenciées à partir d'iPSc de patients HGPS ou HGPS-like ; ces deux syndromes étant tous deux associés à l'accumulation de prélamine A farnésylée, ou de patients atteints de syndromes progéroïdes atypiques (APS), chez lesquels il n'a pas d'accumulation de progérine. L'objectif était d'identifier les voies altérées plus ou moins communes dans les MSCs de ces syndromes apparentés grâce à une analyse comparative du transcriptome et du méthylome. Cela a conduit à l'identification de profils de méthylation de l'ADN spécifiques des altérations de voies liées au vieillissement, avec des anomalies du réseau mitochondrial, de la réponse aux dommages de l'ADN et d'une érosion des télomères, suggérant des voies convergentes, indépendantes de

l'accumulation de progérine, alors qu'un profil de méthylation de l'ADN distinct a été observé dans les cellules HGPS et HGPS-L par rapport aux cellules APS.

L'article 3 détaille les résultats du travail principal de ma Thèse montrant la contribution des miR-140-5p et miR-140-3p à la physiopathologie de la Progeria via la répression de la voie antioxydante KEAP1-NRF2, à l'origine d'un stress oxydant et d'une altération des fonctions mitochondriales.

Dans la suite du manuscrit, je détaille également les travaux complémentaires réalisés sur ce projet dans le cadre de ma Thèse.

Article 1 (revue) – miR-140 et vieillissement

Toury L, Frankel D, Airault C, Magdinier F, Roll P, Kaspi E. *miR-140-5p and miR-140-3p: Key Actors in Aging-Related Diseases?* Int J Mol Sci. 2022 Sep 28;23(19):11439. doi: 10.3390/ijms231911439. PMID: 36232738; PMCID: PMC9570089.

International Journal of
Molecular Sciences

MDPI

Review

miR-140-5p and miR-140-3p: Key Actors in Aging-Related Diseases?

Léa Toury [1], Diane Frankel [2], Coraline Airault [1], Frédérique Magdinier [1], Patrice Roll [2] and Elise Kaspi [2,*]

[1] Aix Marseille Univ, INSERM, MMG, 13005 Marseille, France
[2] Aix Marseille Univ, APHM, INSERM, MMG, Hôpital la Timone, Service de Biologie Cellulaire, 13005 Marseille, France
* Correspondence: elise.kaspi@univ-amu.fr; Tel.: +33-491-324-934; Fax: +33-491-804-319

Abstract: microRNAs (miRNAs) are small single strand non-coding RNAs and powerful gene expression regulators. They mainly bind to the 3′UTR sequence of targeted mRNA, leading to their degradation or translation inhibition. *miR-140* gene encodes the pre-miR-140 that generates the two mature miRNAs miR-140-5p and miR-140-3p. miR-140-5p/-3p have been associated with the development and progression of cancers, but also non-neoplastic diseases. In aging-related diseases, miR-140-5p and miR-140-3p expressions are modulated. The seric levels of these two miRNAs are used as circulating biomarkers and may represent predictive tools. They are also considered key actors in the pathophysiology of aging-related diseases. miR-140-5p/-3p repress targets regulating cell proliferation, apoptosis, senescence, and inflammation. This work focuses on the roles of miR-140-3p and miR-140-5p in aging-related diseases, details their regulation (i.e., by long non-coding RNA), and reviews the molecular targets of theses miRNAs involved in aging pathophysiology.

Keywords: microRNA; miR-140; aging-related diseases

check for updates

Citation: Toury, L.; Frankel, D.; Airault, C.; Magdinier, F.; Roll, P.; Kaspi, E. miR-140-5p and miR-140-3p: Key Actors in Aging-Related Diseases? *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 11439. https://doi.org/10.3390/ijms231911439

Academic Editor: Alfredo Ciccodicola

Received: 1 September 2022
Accepted: 26 September 2022
Published: 28 September 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

1. Introduction

The first microRNA (miRNA), lin-4, was described in 1993 in the nematode *Caenorhabditis* elegans, by the Ambros and Ruvkun groups [1,2]. Since then, more than 48,800 mature miRNAs have been discovered from 271 organisms; among them, 2654 mature miRNAs sequences have been reported in humans (miRBase v.22) [3,4].

miRNAs are small non-coding RNAs involved in gene expression regulation. The average length of miRNAs is 22 nucleotides (nt), of which seven correspond to the seed region (nucleotides 2 to 8). Genes encoding microRNAs are intergenic or intragenic. In the first case, a specific promoter regulates transcription; in the second case, miRNA genes are mainly located in introns, whereas few of them are located in exons [5–7].

Conventionally, miRNAs genes are transcribed to primary miRNAs (pri-miRNAs; >1 kb) using RNA polymerase II. Then, pri-miRNA is processed by a complex including DiGeorge Syndrome Critical Region 8 protein (DGCR8) and a RNase III enzyme Drosha, which cleaves the pri-miRNA into a 70 nt stem-loop precursor miRNA (pre-miRNA) [8–12]. Pre-miRNA exportation to the cytoplasm is controlled by RanGTP/exportin 5 complex [13–15]. Lastly, the cytoplasmic RNase III endonuclease Dicer removes the terminal loop, leading to a ≈ 25 nt miRNA duplex [16,17]. This duplex is integrated in "RNA-induced silencing complex", called "RISC-complex", containing the Argonaute protein (AGO). The passenger strand is eliminated from the duplex, whereas the guide strand, corresponding to the mature (≈22 nt) miRNA, is conserved [18]. Both the 5p and 3p strands, arising from the 5′ or 3′ end of the duplex, respectively, can be the guide strand, depending to different factors; e.g., the cell type, developmental stage, enrichment of purines at the 5′end, and miRNA thermodynamic stability [19].

Several non-classical miRNA biogenesis pathways have also been described, independent of Drosha, Dicer, or AGO proteins [5]. Mirtrons are a class of intronic but non-canonical miRNAs that are processed by a DGCR8/Drosha-independent pathway and are generated by spliceosome from direct intron splicing. "Debranched" mirtrons are similar to canonical pre-miRNAs and are exported by Exportin-5 in the cytoplasm. Their further maturation is identical to the canonical manner [20–22].

Intronic miRNAs genes are embedded into a host gene and are mostly processed according to the protein-encoding gene in which they are hosted. In a few cases, intronic miRNA expression differs from the expression of the host gene: miRNA transcription can be independent from the host gene promoter, as the miRNA genes can be regulated by their own independent promoter [23–26].

MiRNAs mainly regulate gene expression due to messenger RNA (mRNA) interactions, inside the RISC complex: the seed region located to the 5′ end of microRNAs usually targets the 3′ untranslated transcript region (3′UTR) of mRNA, leading to mRNA degradation or translation inhibition, according to the base complementarity between these two sequences. In a few cases, a miRNA targets the 5′UTR of mRNA or coding sequence, and this interaction has been reported to induce translation under specific conditions (e.g., in quiescent cells) [27–30]. It has also been well established that some miRNAs can be reimported into the nucleus, where they directly interact with gene promoters, thus inducing gene transcription [31,32].

Considering all these mechanisms, miRNAs are considered major actors in gene expression regulation. In addition, one microRNA is rarely specific to one mRNA, and one mRNA can be targeted by different microRNAs sharing the same seed region. Many studies and reviews are available reporting miRNA involvement in physiological pathways and developmental processes, as well as their deregulation under pathological conditions leading to diseases, such as cancers or genetic diseases. They also have been proposed as potential biomarkers or therapeutic targets in various pathological contexts [33–37].

2. miR-140-5p and miR-140-3p Biogenesis

Gene encoding microRNA-140-5p/-3p is located on chromosome 16q22.1, and is hosted in the 15th intron of the *WW domain containing E3 Ubiquitin protein ligase 2 (WWP2)* human gene. In mice, *miR-140* gene is localized in the 16th intron of *WWP2* gene [7,38]. Its transcription generates two transcripts, miR-140-3p and miR-140-5p, processed from the same pre-miR. *miR-140* gene transcription is independent of the transcription of its host gene, and is regulated by transcription factors, such as Nuclear factor of activated T-cells 3 (NFAT3) and Mothers against decapentaplegic homolog 3 (SMAD3) [38]. Both miR-140-3p and miR-140-5p can be the guide strand and silence mRNAs. Interestingly, as these two miRNAs do not share the same seed region (Figure 1), the predicted targeted mRNAs are thus different [38]. miR-140 (i.e., miR-140-5p in the former studies) was first described as cartilage specific [39]. A large number of studies have demonstrated its key role in osteoarthritis (OA) development. Both miR-140-5p and miR140-3p have also been proposed as plasmatic biomarkers for several diseases and their involvement in cancers has largely been described [40]. In cancer, as well as in an aging context, miR-140-5p and miR-140-3p target molecules involved in cell senescence: anti-senescent molecule forkhead box Q1 (FOXQ1) [41] is a target of miR-140-3p in bladder carcinoma [42], and miR-140-5p enhances cell senescence due to Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase NIMA-interacting 1 (PIN1) repression, in a model of progenitor cell aging [43].

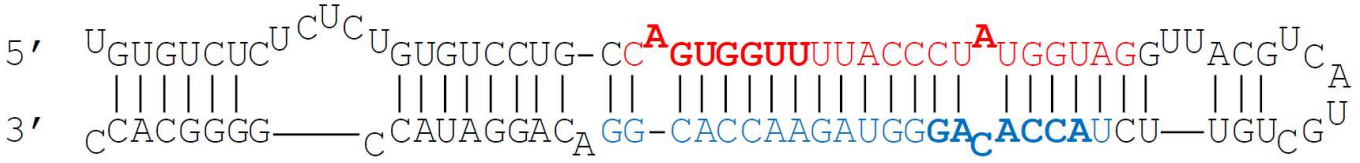


Figure 1. Pre-miR-140 sequence. Representation of the pre-microRNA-140 sequence obtained and modified from miRBase (https://www.mirbase.org/cgi-bin/mirna_entry.pl?acc=MI0000456, accessed on 20 August 2022). The mature sequences of miR-140-5p and miR-140-3p are highlighted in red and blue, respectively. The seed regions of each miRNA are in bold.

This review focuses on the roles of miR-140-3p and miR-140-5p in neurodegenerative diseases, atherosclerosis, visual acuity loss, osteoporosis, and osteoarthritis, which are all age-related diseases, and details the molecular targets of these miRNAs involved in aging pathophysiology.

3. Role of miR-140-5p/-3p in Neurodegenerative Diseases/Cognitive Impairment

Neurodegenerative diseases, such as Alzheimer's disease (AD), Parkinson's disease, or post-stroke infarction, lead to cognitive impairment with aging. Several miRNAs have recently been considered as neuroregulators, as well as neuroprotectors, leading to their consideration as biomarkers or therapeutic targets for neuronal cell death [44].

To our knowledge, no study has evidenced miR-140-5p/-3p involvement in Parkinson's disease. In contrast, two recent publications have highlighted the neurotoxic role of miR-140-5p in AD, based on the study of different AD models. AD is caused by accumulation of β-amyloid (Aβ) in the brain, forming neurotoxic amyloid plaques. miR-140-5p overexpression was observed in hippocampal tissues from a rat model of AD, and associated with neurological function impairment. In hippocampal mouse neurons from an in vitro model of AD, miR-140-5p overexpression (using mimics transfection) led to reactive oxygen species (ROS) production and mitochondrial dysfunction, by directly targeting *phosphatase and tensin homolog-induced putative kinase 1 (PINK1)*, involved in mitochondrial function preservation [45]. miR-140-5p is also upregulated in post mortem brains from AD patients, compared to cognitively normal controls, causing a deleterious circle as it directly targets *A Disintegrin and Metalloproteinase 10 (ADAM10)* and *SRY-box transcription factor 2 (SOX2)*, a transcription factor that positively regulates ADAM10 transcription. ADAM10 expression is thus reduced in AD, leading to Aβ plaque accumulation [46].

Plasmatic miR-140-5p/-3p has also been proposed as a predictive tool for cognitive function evaluation during aging: miR-140-5p levels are positively associated with cognitive performance measures [47]. miR-140-3p, in combination with other defined miRNAs, could represent a plasmatic biomarker, predictive for mild cognitive impairment (MCI—an intermediate state between normal aging and dementia) in elderly populations [48].

Similarly, the miR-140-5p plasmatic level is enhanced during acute ischemic stroke in humans [49]. Interestingly, in a mouse model of ischemic stroke (middle cerebral artery occlusion), miR-140-5p expression was drastically decreased in response to ischemic stroke, in comparison to control mice; while miR-140-5p ectopic overexpression in brain prevented neuronal apoptosis and restrains the development of ischemic injury in this model, via toll-like receptor 4/nuclear factor-kappa B (TLR4/NF-κB) axis regulation [50]. Similar results were obtained in a rat model of ischemia stroke [51,52]. miR-140-3p was also described as neuroprotective from cerebral ischemia-reperfusion injury in an in vitro model (PC12 cells) [53]. Moreover, miR-140-5p directly targets the 3'UTR of *Vascular Endothelial Growth Factor A (VEGFA)*, a pro-angiogenic factor and inhibits endothelial cell properties in vitro (proliferation, migration, and pseudo-capillar formation) under normoxic and hypoxic conditions [52].

These studies suggest that miR-140-5p is downregulated after ischemic stroke. Preventing the downregulation of miR-140-5p and, to a lesser extent, miR-140-3p could be neu-

roprotective and represent a new therapeutic approach, by inhibiting neuro-inflammation and abrogating angiogenesis following ischemic brain injury.

4. Role of miR-140-5p/-3p in Atherosclerosis

Atherosclerosis (AS) is one of the main factors leading to cardiovascular diseases, which are the leading cause of death worldwide [54]. AS is characterized by formation of a plaque in the arterial intima, essentially composed of lipids, such as triglycerides and oxidized Low-Density Lipoprotein (ox-LDL), generating immune and inflammatory responses. Ultimately, plaque growth or plaque rupture causes damage as it induces vessel obstruction [55,56]. In atherosclerotic plaques, phagocytosis is activated by ox-LDL; macrophages accumulate lipids and derive into foam cells. Ox-LDL are the origin of a vicious circle, as they stimulate ROS production, thus accentuating ox-LDL generation. They cause cellular damage in macrophages and they stimulate macrophages phagocytosis and activation into foam cells [57]. During AS, vascular smooth muscle cell (VSMC) dysfunction was also evidenced. Phenotypic alterations, such as gain of proliferation and migration, contribute to plaque progression and vascular injury [58].

Opposite results were published concerning the role of miR-140-5p in lipid accumulation into macrophages-derived foam cells: in a cellular model of AS macrophages (ox-LDL treated THP1 cells), miR-140-5p expression was inversely correlated with ox-LDL macrophages content, suggesting that in AS, miR-140-5p is downregulated. miR-140-5p could participate as a brake in AS, by targeting TLR4. Indeed, miR-140-5p mimic transfection in AS macrophages prevented lipids accumulation, ROS production, and cell apoptosis [57].

In contrast, Zhao and colleagues demonstrated, in similar in vitro model, that miR-140-5p expression was enhanced in ox-LDL-treated macrophages. They showed that miR-140-5p silences Regulatory Factor X7 (RFX7), a transcription factor that binds to the promoter of *ABCA1* gene to induce its expression [59]. This gene encodes ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1), an ABC transporter involved in cholesterol efflux outside macrophages [60]. miR-140-5p could thus amplify the lipid accumulation in atherosclerotic plaque macrophages, participating to AS aggravation. Other arguments support these results. In ApoE$^{-/-}$ mice, an in vivo model of AS, overexpression of miR-140-5p accelerated plaque formation in aorta, in association with reduced levels of RFX7 and ABCA1 in this tissue [59].

miR-140-5p is also involved in VSMC alterations during AS. In AS aorta from ApoE$^{-/-}$ mice, miR-140-5p was enhanced compared to wild type mice, thus increasing oxidative stress, resulting from the increase of ROS production and the decrease of antioxidant molecules (superoxide dismutase (SOD) and gluthathione (GSH)) [61]. Sirtuin 2 (SIRT2) and nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (NRF2), two direct targets of miR-140-5p, may strongly participate in oxidative stress in AS. The mechanistic role of SIRT2 in oxidative stress remains unclear as SIRT2 regulates hypoxia inducible factor 1 (HIF1) expression, but its positive regulation (stabilization) or negative regulation (degradation) is still debated [61,62]. In response to oxidative conditions, NRF2 is translocated into the nucleus, where it acts as a transcription factor activating anti-oxidative gene transcription [61,63]. miR-140-5p expression was also significantly higher in artery tissues from AS patients versus healthy controls, as well as in ox-LDL-treated human VSMCs compared to control conditions. In addition, miR-140-5p inhibition represses AS VSMC migration, proliferation, and stimulates apoptosis, via rescue of roundabout guidance receptor 4 (ROBO4) expression, a vascular-specific receptor involved in angiogenesis [64].

LDL-cholesterol clearance from blood circulation also contributes to reducing atherosclerotic plaque formation. Plasmatic LDL-cholesterol endocytosis, via LDL-receptors (LDLR) on hepatocytes, is a major event controlling plasmatic LDL-cholesterol levels. In humans, the seed region of miR-140-5p was predicted to hybridize with 3′UTR of *LDLR*. This prediction was experimentally confirmed in human hepatic cells, in which miR-140-5p inhibits the cell surface LDLR expression and reduces LDL-cholesterol absorption, while

simvastatine reverts this phenomenon, as this drug is able to reduce miR-140-5p expression [65]. miR-140-5p expression seems to be endogenously regulated during AS. Prostate cancer antigen 3 (PCA3), a long non-coding RNA (lncRNA), physiologically sponges miR-140-5p in macrophage-derived foam cells, thus repressing its deleterious role in AS [59]. Moreover, the plasmatic level of miR-140-5p is inversely correlated with the lncRNA metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1 (MALAT1), which may inhibit miR-140-5p [66].

Concerning miR-140-3p, this miRNA was significantly downregulated in AS aorta from ApoE$^{-/-}$ mice, leading to MKK6 and TP53RK proteins overexpression, compared to control aorta. These two kinases have been reported to be involved in signaling cascades playing a pivotal role in endothelial injury [67,68]. Similarly, in a commercial cell line of human coronary endothelial cells (HCAECs), miR-140-3p directly targets *mitogen-activated protein kinase 1 (MAPK1)*, encoding a serine/threonine protein kinase that belongs to the MAPK family. Activation of MAP kinase signaling results in the production of inflammatory cytokines and chemokines via NF-kB nuclear importation [69,70].

In a vascular injury model (i.e., in-stent restenosis), miR-140-3p was downregulated in arterial smooth muscle cells (ASMC) isolated from restenosis artery wall compared to normal arteries, resulting in abnormal ASMC proliferation enhancement and apoptosis inhibition, which contributed to arterial damage. In this model, *C-Myb* and *B-cell lymphoma 2 (BCL-2)* are no longer targeted by miR-140-3p, causing their upregulation. C-Myb is a transcription factor known to induce ASMC proliferation, while BCL-2 is an outer membrane mitochondrial anti-apoptotic protein [71].

As described for miR-140-5p (see above), several non-coding RNAs are predicted or proven to sponge miR-140-3p in AS. In plasma from coronary atherosclerotic heart disease patients, miR-140-3p was inversely correlated with the lncRNA nuclear enriched abundant transcript 1 (NEAT1) [69]; and in AS aorta from ApoE$^{-/-}$ mice, miR-140-3p was negatively regulated by circRNA_36781, also called circRNA_ABCA1 [67], leading to miR-140-3p downregulation and facilitating endothelial injury in these models.

5. miR-140-5p/-3p and Visual Acuity Loss

During aging, visual acuity loss occurs. Age-related macular degeneration (AMD) is the leading cause of visual impairment in Europe [72]. AMD is divided into two clinical entities: wet and dry AMD [73]. In a cohort of 33 wet AMD patients versus 31 controls, the expression of a panel of 384 microRNAs was investigated in plasma. In this study, miR-140-3p, among 10 others, was found to be downregulated in the AMD group, suggesting that plasmatic miRNAs levels could be predictive for wet AMD. Nevertheless, this observation needs to be confirmed in a larger cohort, and no molecular mechanisms were explored, to highlight the potential role of miR-140-3p in wet age-related macular degeneration [74].

In age-related cataract, another cause of visual acuity loss occurring during aging, no studies have shown a role for miR-140-5p/-3p, unlike other miRNAs [75].

6. Role of miR-140-5p/-3p in Osteoporosis

Osteoporosis is a systemic bone metabolic disorder, characterized by dysregulation of bone turnover, associated with low bone density and mass and accelerated bone loss, leading to bone fragility and fractures [76]. Osteoporosis affects life quality during aging, notably in postmenopausal women. To prevent this worldwide health problem, regular physical exercise is an effective method for stimulating bone osteogenesis in osteoporotic patients, and which improves bone density and reduces osteoporosis-induced risk of fracture [77].

Osteogenic differentiation was induced in a model of bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) submitted to tensile strain, a mechanical stimulation mimicking physical exercise at the cellular level, together with lncRNA-MEG3 expression enhancement; the latter represses miR-140-5p expression through a "sponging" mechanism [78]. Nevertheless, in a cohort of idiopathic osteoporosis patients with prevalent low-traumatic fractures (pre-

and postmenopausal women, and men), seric miR-140-5p, among other miRNAs, was downregulated in comparison to healthy subjects and was inversely correlated to body mass index (BMI) [79].

Conversely, an elevated seric level of miR-140-3p could be a biomarker of osteoporosis, osteopenia, and fractures in post-menopausal women, as miR-140-3p was overexpressed in the serum of osteoporotic post-menopausal women, compared to healthy post-menopausal women [80]. These results were reinforced by Yin et al., who reported higher levels of miR-140-3p in PBMC and serum from osteoporotic post-menopausal women compared to healthy controls. Moreover, in an osteoblastic progenitor cell line (C2C12 cells), miR-140-3p silencing induced cell proliferation and differentiation, and inhibited apoptosis, by targeting Phosphatase and TENsin homolog (PTEN) and thus, inactivating the Phosphatase and TENsin homolog/ Phosphoinositide 3-kinase/ serine/threonine kinase 1 (PTEN/PI3K/AKT) signaling pathway [81]. These results corroborate an older publication, which highlighted the overexpression of miR-140-3p in BMSCs from a model of osteoporotic rats, compared to control animals. The inhibition of miR-140-3p in this cell model promoted osteogenesis [82].

The role of miR-140-3p in osteoblastic differentiation has still not been totally elucidated, as opposite results have been reported [83]: Fushimi et al. demonstrated that miR-140-3p overexpression activates osteoblasts differentiation by targeting Transforming Growth Factor-β3 (TGF-β3) [84]. In contrast, Mao et al. showed in MC3T3-E1, an osteoblastic cell line obtained from mouse calvarium, that upregulation of miR-140-3p suppresses viability and differentiation, by targeting MCF.2 cell line derived transforming sequence-like (MCF2L) [85].

7. Role of miR-140-5p/-3p in Osteoarthritis

Osteoarthritis (OA) is a chronic degenerative joint disease that affects quality of life in elderly populations. OA is associated with articular pain and stiffness, leading to functional disabilities. Several predisposing factors have been identified such as age, gender, obesity, and traumatic injury. Extracellular matrix (ECM) remodeling is impaired, in response to chondrocytes senescence and lesser proteoglycan secretion by chondrocytes. High levels of proinflammatory cytokines (e.g., Interleukin-6 (IL-6)) and matrix-degrading enzymes (e.g., Matrix metallopeptidase 13 (MMP13) and a disintegrin and metalloproteinase metallopeptidase with thrombospondin type 1 motif 5 (ADAMTS5)) are secreted in OA cartilage and synovial fluid. The elevated levels of reactive oxygen species (ROS) associated with oxidative stress cause oxidative damage, leading to OA [86]. During aging, various epigenetic changes occur, such as DNA methylation, histone modifications, and miRNAs regulation. Theses mechanisms are also present in aging-related OA.

miR-140-3p and miR-140-5p are physiologically expressed in cartilage and chondrocytes, and have been highlighted as key actors in OA [87,88]. In normal conditions, miR-140-5p expression increases during chondrogenesis, in parallel to chondrogenic differentiation markers (SRY-related high-mobility group box 9 (SOX9) and Collagen type-II (COL2A1)), as the levels are higher in mature chondrocytes than in Mesenchymal stem cells (MSCs) [89]. Mouse models were generated to investigate the miR-140-5p/3p involvement in cartilage development and regeneration. Specific deletion of the *miR-140* gene sequence in the intronic region of *Wwp2* gene led to the abolishment of both miR140-3p and miR-140-5p expression in these miR-140$^{-/-}$ mice, whereas transgenic mice overexpressing both miR140-3p and miR-140-5p in cartilage were generated, using *pri-miR-140* insertion near the cartilage-specific *Col2a1* promoter [90]. Mouse developmental observations showed that miR-140$^{-/-}$ mice exhibited a mild skeletal phenotype with a short stature, and during aging, OA damage was associated with ECM degradation and cartilage fibrosis. Moreover, transgenic mice were protected from OA development in a model of antigen-induced arthritis [90]. miR-140-5p was reduced in joint tissues from old mice compared to healthy young mice [91] and many teams have described a downregulation of miR-140-5p expression in human OA-cartilage, in comparison to healthy cartilage [38,89,92]. This decrease

of miR-140-5p in OA-cartilage was corroborated by in vitro models of OA-chondrocytes, which have also objectified miR-140-5p expression decreases [89,93,94].

Regulatory mechanisms for miR-140-5p are opposed, independently of those regulating WWP2: NFAT3 increases miR-140-5p levels in OA-chondrocytes, and SOX9 physiologically stimulates miR-140-5p expression during chondrogenesis [38,95]. Conversely, several mechanisms negatively regulate miR-140-5p expression in OA-chondrocytes: TGF-β/SMAD3, hypermethylation of CpG sites of the regulatory region of *miR-140* gene, and Interleukin-1β (IL-1β) stimulation [38,88,96]. Moreover, in chondrocytes extracted from OA cartilage tissue, LINC01534 was overexpressed in comparison to healthy cartilage tissue, and this lncRNA directly targets and sponges miR-140-5p. LINC01534 overexpression is mediated by IL-1β [97].

In an in vitro model of OA chondrocytes (IL-1β treatment), miR-140-5p was decreased compared to non-stimulated chondrocytes. In this model, miR-140-5p transfection prevented chondrocytes senescence, and ECM degradation, as the expression of two major ECM components (COL2 (collagen type II) and ACAN (Aggrecan)), was restored, in association with a reduction of ECM degradation enzymes [89]. Comparatively, in a rat OA model, intra-articular injection (IAJ) of miR-140-5p attenuates OA progression and prevents chondrocyte senescence [93,94,98]. During OA, miR-140-5p downregulation contributes to cartilage remodeling impairment. The absence of inhibition of miR-140-5p targets in chondrocytes results in chondrocytes senescence (via NUMB-like endocytic adaptator protein (NUMBL) and Jagged1 (JAG1) in the Notch pathway), chondrocytes pyroptosis (apoptosis occurring in an inflammatory state) (via cathepsin B/Nod-like receptor protein 3), inflammation (via IL-1β, Interleukin-6 (IL-6), SMAD3, C-X-C motif chemokine receptor 4 (CXCR4)), ECM catabolism (MMP13, ADAMTS5), and inhibition of chondrocytes proliferation (fucosyltransferase 1 (FUT1)) (Figure 2) [88,90,99–105].

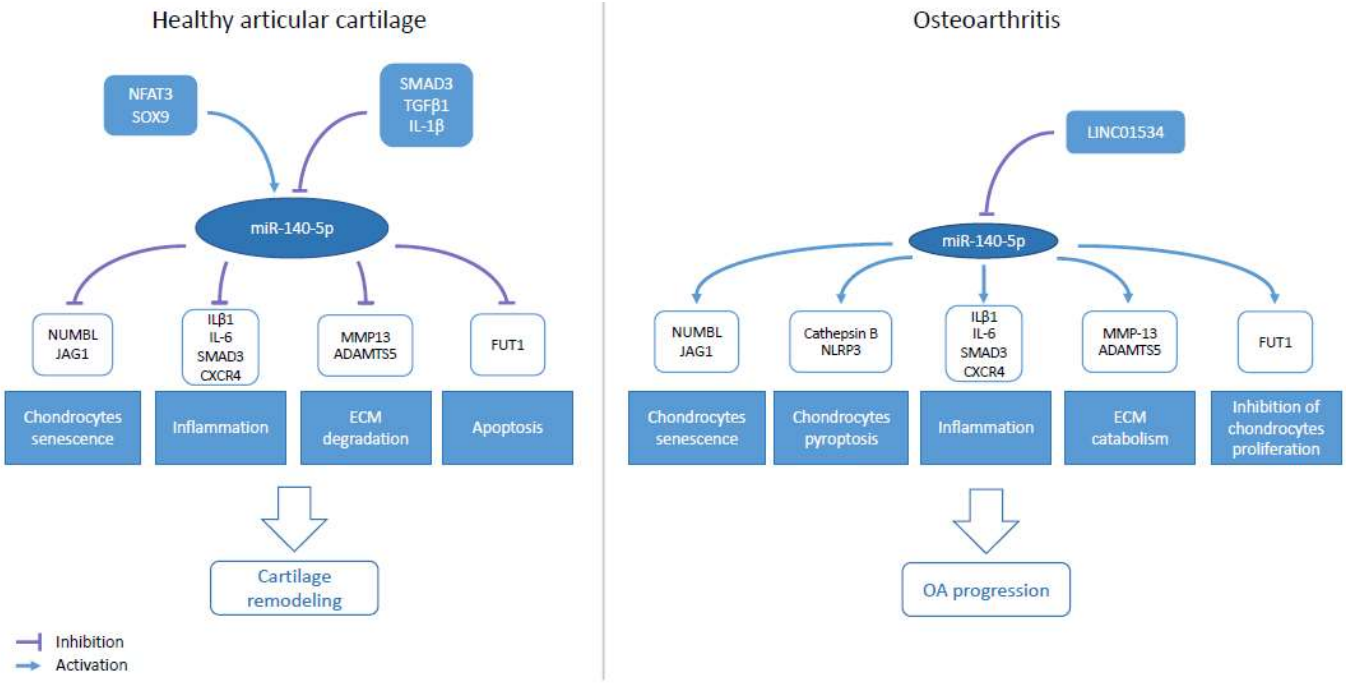


Figure 2. Role of miR-140-5p in osteoarthritis (OA). Schematic representation of miR-140-5p regulators and targets, and biological consequences, in cartilage remodeling and OA progression.

miR-140-3p is also expressed in cartilage to a greater extent than miR-140-5p [87]. Similarly to miR-140-5p, miR-140-3p is downregulated in OA-chondrocytes [38]. This downregulation may be the result of direct targeting of miR-140-3p by the lncRNA LINC01385 in OA-tissues [106]. A few targets of miR-140-3p have been identified as being involved in OA progression: miR-140-3p attenuates OA progression and regulates chondrogene-

sis due to CXCR4 and Ras-like proto-oncogene (RALA) inhibition, respectively [99,100]. miR-140-3p level has been monitored in the serum from OA patients before and after high tibial osteotomy (HTO), which represents one option for OA-treatment, as cartilage regeneration is expected after this surgery. miR-140-3p expression is significantly up-regulated 6 and 18 months post-surgery, indicating that the miR-140-3p seric level may represent a prognostic biomarker for the cartilage repair process [107].

Considering all these data, miR-140-5p/-3p represent serious targets for OA treatment. As described previously, intra-articular injection of miR-140-5p in animal models of OA slows down OA progression [93,94,98]. To protect miR-140-5p from degradation, one team generated exosomes overexpressing miR-140-5p (miR-140-5p transfected cells) or not (untransfected cells) and derived from human synovial mesenchymal stem cells. These overexpressing miR-140-5p exosomes stimulated chondrocytes proliferation in vitro and prevented OA progression in a rat model [108]. In humans, gene editing has been performed using the CRISPR/Cas9 method, in order to silence miR-140-5p/-3p expression in primary OA chondrocytes, without *WWP2* expression modulation. This recent development has only been used at this stage to identify miR-140-5p/-3p targets, but opens up great possibilities as a tool to further evaluate the role of miRNAs in AO and to assess potential new therapies [109].

8. Conclusions

miR-140-5p/-3p have been widely studied in the context of cancer, but also in diseases related to aging, particularly in osteoarthritis. Both miR-140-5p and miR-140-3p are derived from the same gene, but have different targets. Despite this, these two miRNAs are often involved in the same pathologies with similar or opposite actions. They are key actors in the pathophysiology of many diseases and/or can be used as predictive circulating biomarkers.

A list of miRNAs regulating aging-related pathways, such as senescence, DNA damage response, has been established; the miRNAs involved in physiological aging are thus, grouped under the term "geromiRs" [110]. Even if miR-140-5p/-3p are not listed as "GeromiRs", this review highlights that miR-140-5p/3p, and particularly miR-140-5p, are involved in the most common aging-related pathologies. Considering the major involvement of miR-140-5p/-3p in physiological aging, it would be interesting to analyze the role of these miRNAs in the pathophysiology of diseases with accelerated and premature aging.

Author Contributions: Conceptualization, E.K., P.R., F.M., D.F., C.A. and L.T.; writing—original draft preparation, E.K., L.T.; writing—review and editing, P.R., D.F., F.M. and C.A.; supervision, P.R. and F.M.; project administration, P.R. and E.K. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: Our research on miR-140-5p/-3p is funded by Association Française contre les Myopathies (AFM-Telethon) n°23408. This work was supported by the Institute National de la Santé et de la recherche médicale (INSERM) and Aix Marseille University.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript; or in the decision to publish the results.

References

1. Lee, R.C.; Feinbaum, R.L.; Ambros, V. The C. Elegans Heterochronic Gene Lin-4 Encodes Small RNAs with Antisense Complementarity to Lin-14. *Cell* **1993**, *75*, 843–854. [CrossRef]
2. Wightman, B.; Ha, I.; Ruvkun, G. Posttranscriptional Regulation of the Heterochronic Gene Lin-14 by Lin-4 Mediates Temporal Pattern Formation in C. Elegans. *Cell* **1993**, *75*, 855–862. [CrossRef]
3. Kozomara, A.; Birgaoanu, M.; Griffiths-Jones, S. MiRBase: From MicroRNA Sequences to Function. *Nucleic Acids Res.* **2019**, *47*, D155–D162. [CrossRef] [PubMed]
4. Plotnikova, O.; Baranova, A.; Skoblov, M. Comprehensive Analysis of Human MicroRNA–MRNA Interactome. *Front. Genet.* **2019**, *10*, 933. [CrossRef] [PubMed]
5. O'Brien, J.; Hayder, H.; Zayed, Y.; Peng, C. Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. *Front. Endocrinol.* **2018**, *9*, 402. [CrossRef]

6. Hsu, P.W.C. MiRNAMap: Genomic Maps of MicroRNA Genes and Their Target Genes in Mammalian Genomes. *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, D135–D139. [CrossRef]
7. Rodriguez, A.; Griffiths-Jones, S.; Ashurst, J.L.; Bradley, A. Identification of Mammalian MicroRNA Host Genes and Transcription Units. *Genome Res.* **2004**, *14*, 1902–1910. [CrossRef]
8. Lee, Y.; Ahn, C.; Han, J.; Choi, H.; Kim, J.; Yim, J.; Lee, J.; Provost, P.; Rådmark, O.; Kim, S.; et al. The Nuclear RNase III Drosha Initiates MicroRNA Processing. *Nature* **2003**, *425*, 415–419. [CrossRef]
9. Ha, M.; Kim, V.N. Regulation of MicroRNA Biogenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2014**, *15*, 509–524. [CrossRef]
10. Denli, A.M.; Tops, B.B.J.; Plasterk, R.H.A.; Ketting, R.F.; Hannon, G.J. Processing of Primary MicroRNAs by the Microprocessor Complex. *Nature* **2004**, *432*, 231–235. [CrossRef]
11. Alarcón, C.R.; Lee, H.; Goodarzi, H.; Halberg, N.; Tavazoie, S.F. N6-Methyladenosine Marks Primary MicroRNAs for Processing. *Nature* **2015**, *519*, 482–485. [CrossRef] [PubMed]
12. Han, J.; Lee, Y.; Yeom, K.-H.; Kim, Y.-K.; Jin, H.; Kim, V.N. The Drosha-DGCR8 Complex in Primary MicroRNA Processing. *Genes Dev.* **2004**, *18*, 3016–3027. [CrossRef]
13. Okada, C.; Yamashita, E.; Lee, S.J.; Shibata, S.; Katahira, J.; Nakagawa, A.; Yoneda, Y.; Tsukihara, T. A High-Resolution Structure of the Pre-MicroRNA Nuclear Export Machinery. *Science* **2009**, *326*, 1275–1279. [CrossRef] [PubMed]
14. Bohnsack, M.T.; Czaplinski, K.; Gorlich, D. Exportin 5 Is a RanGTP-Dependent DsRNA-Binding Protein That Mediates Nuclear Export of Pre-MiRNAs. *RNA* **2004**, *10*, 185–191. [CrossRef] [PubMed]
15. Yi, R.; Qin, Y.; Macara, I.G.; Cullen, B.R. Exportin-5 Mediates the Nuclear Export of Pre-MicroRNAs and Short Hairpin RNAs. *Genes Dev.* **2003**, *17*, 3011–3016. [CrossRef]
16. Zhang, H.; Kolb, F.A.; Jaskiewicz, L.; Westhof, E.; Filipowicz, W. Single Processing Center Models for Human Dicer and Bacterial RNase III. *Cell* **2004**, *118*, 57–68. [CrossRef] [PubMed]
17. Hutvágner, G.; McLachlan, J.; Pasquinelli, A.E.; Bálint, É.; Tuschl, T.; Zamore, P.D. A Cellular Function for the RNA-Interference Enzyme Dicer in the Maturation of the *Let-7* Small Temporal RNA. *Science* **2001**, *293*, 834–838. [CrossRef]
18. Kobayashi, H.; Tomari, Y. RISC Assembly: Coordination between Small RNAs and Argonaute Proteins. *Biochim. Et Biophys. Acta (BBA)—Gene Regul. Mech.* **2016**, *1859*, 71–81. [CrossRef]
19. Meijer, H.A.; Smith, E.M.; Bushell, M. Regulation of MiRNA Strand Selection: Follow the Leader? *Biochem. Soc. Trans.* **2014**, *42*, 1135–1140. [CrossRef]
20. Ruby, J.G.; Jan, C.H.; Bartel, D.P. Intronic MicroRNA Precursors That Bypass Drosha Processing. *Nature* **2007**, *448*, 83–86. [CrossRef]
21. Wen, J.; Ladewig, E.; Shenker, S.; Mohammed, J.; Lai, E.C. Analysis of Nearly One Thousand Mammalian Mirtrons Reveals Novel Features of Dicer Substrates. *PLoS Comput. Biol.* **2015**, *11*, e1004441. [CrossRef] [PubMed]
22. Wong, A.C.H.; Rasko, J.E.J. Splice and Dice: Intronic MicroRNAs, Splicing and Cancer. *Biomedicines* **2021**, *9*, 1268. [CrossRef]
23. Monteys, A.M.; Spengler, R.M.; Wan, J.; Tecedor, L.; Lennox, K.A.; Xing, Y.; Davidson, B.L. Structure and Activity of Putative Intronic MiRNA Promoters. *RNA* **2010**, *16*, 495–505. [CrossRef] [PubMed]
24. Marsico, A.; Huska, M.R.; Lasserre, J.; Hu, H.; Vucicevic, D.; Musahl, A.; Orom, U.; Vingron, M. PROmiRNA: A New MiRNA Promoter Recognition Method Uncovers the Complex Regulation of Intronic MiRNAs. *Genome Biol.* **2013**, *14*, R84. [CrossRef] [PubMed]
25. Veronese, A.; Visone, R.; Consiglio, J.; Acunzo, M.; Lupini, L.; Kim, T.; Ferracin, M.; Lovat, F.; Miotto, E.; Balatti, V.; et al. Mutated β-Catenin Evades a MicroRNA-Dependent Regulatory Loop. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 4840–4845. [CrossRef]
26. Gao, X.; Qiao, Y.; Han, D.; Zhang, Y.; Ma, N. Enemy or Partner: Relationship between Intronic Micrornas and Their Host Genes. *IUBMB Life* **2012**, *64*, 835–840. [CrossRef]
27. Bartel, D.P. MicroRNAs: Target Recognition and Regulatory Functions. *Cell* **2009**, *136*, 215–233. [CrossRef]
28. Helwak, A.; Kudla, G.; Dudnakova, T.; Tollervey, D. Mapping the Human MiRNA Interactome by CLASH Reveals Frequent Noncanonical Binding. *Cell* **2013**, *153*, 654–665. [CrossRef]
29. Xu, W.; San Lucas, A.; Wang, Z.; Liu, Y. Identifying MicroRNA Targets in Different Gene Regions. *BMC Bioinform.* **2014**, *15*, S4. [CrossRef]
30. Ørom, U.A.; Nielsen, F.C.; Lund, A.H. MicroRNA-10a Binds the 5′UTR of Ribosomal Protein MRNAs and Enhances Their Translation. *Mol. Cell* **2008**, *30*, 460–471. [CrossRef]
31. Dharap, A.; Pokrzywa, C.; Murali, S.; Pandi, G.; Vemuganti, R. MicroRNA MiR-324-3p Induces Promoter-Mediated Expression of RelA Gene. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e79467. [CrossRef] [PubMed]
32. Place, R.F.; Li, L.-C.; Pookot, D.; Noonan, E.J.; Dahiya, R. MicroRNA-373 Induces Expression of Genes with Complementary Promoter Sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 1608–1613. [CrossRef] [PubMed]
33. Saliminejad, K.; Khorram Khorshid, H.R.; Soleymani Fard, S.; Ghaffari, S.H. An Overview of MicroRNAs: Biology, Functions, Therapeutics, and Analysis Methods. *J. Cell. Physiol.* **2019**, *234*, 5451–5465. [CrossRef] [PubMed]
34. Frankel, D.; Delecourt, V.; Harhouri, K.; De Sandre-Giovannoli, A.; Lévy, N.; Kaspi, E.; Roll, P. MicroRNAs in Hereditary and Sporadic Premature Aging Syndromes and Other Laminopathies. *Aging Cell* **2018**, *17*, e12766. [CrossRef]
35. Pathania, A.S.; Prathipati, P.; Pandey, M.K.; Byrareddy, S.N.; Coulter, D.W.; Gupta, S.C.; Challagundla, K.B. The Emerging Role of Non-Coding RNAs in the Epigenetic Regulation of Pediatric Cancers. *Semin. Cancer Biol.* **2022**, *83*, 227–241. [CrossRef]

36. Beilerli, A.; Gareev, I.; Beylerli, O.; Yang, G.; Pavlov, V.; Aliev, G.; Ahmad, A. Circular RNAs as Biomarkers and Therapeutic Targets in Cancer. *Semin. Cancer Biol.* **2022**, *83*, 242–252. [CrossRef]
37. Mirzaei, S.; Paskeh, M.D.A.; Okina, E.; Gholami, M.H.; Hushmandi, K.; Hashemi, M.; Kalu, A.; Zarrabi, A.; Nabavi, N.; Rabiee, N.; et al. Molecular Landscape of LncRNAs in Prostate Cancer: A Focus on Pathways and Therapeutic Targets for Intervention. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **2022**, *41*, 214. [CrossRef]
38. Tardif, G.; Pelletier, J.-P.; Fahmi, H.; Hum, D.; Zhang, Y.; Kapoor, M.; Martel-Pelletier, J. NFAT3 and TGF-β/SMAD3 Regulate the Expression of MiR-140 in Osteoarthritis. *Arthritis Res. Ther.* **2013**, *15*, R197. [CrossRef]
39. Tuddenham, L.; Wheeler, G.; Ntounia-Fousara, S.; Waters, J.; Hajihosseini, M.K.; Clark, I.; Dalmay, T. The Cartilage Specific MicroRNA-140 Targets Histone Deacetylase 4 in Mouse Cells. *FEBS Lett.* **2006**, *580*, 4214–4217. [CrossRef]
40. Ghafouri-Fard, S.; Bahroudi, Z.; Shoorei, H.; Abak, A.; Ahin, M.; Taheri, M. MicroRNA-140: A MiRNA with Diverse Roles in Human Diseases. *Biomed. Pharmacother.* **2021**, *135*, 111256. [CrossRef]
41. Wang, P.; Lv, C.; Zhang, T.; Liu, J.; Yang, J.; Guan, F.; Hong, T. FOXQ1 Regulates Senescence-Associated Inflammation via Activation of SIRT1 Expression. *Cell Death Dis.* **2017**, *8*, e2946. [CrossRef] [PubMed]
42. Wang, Y.; Chen, J.; Wang, X.; Wang, K. MiR-140-3p Inhibits Bladder Cancer Cell Proliferation and Invasion by Targeting FOXQ1. *Aging* **2020**, *12*, 20366–20379. [CrossRef]
43. Chen, L.; Liu, J.; Tao, X.; Wang, G.; Wang, Q.; Liu, X. The Role of Pin1 Protein in Aging of Human Tendon Stem/Progenitor Cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2015**, *464*, 487–492. [CrossRef]
44. Basak, I.; Patil, K.S.; Alves, G.; Larsen, J.P.; Møller, S.G. MicroRNAs as Neuroregulators, Biomarkers and Therapeutic Agents in Neurodegenerative Diseases. *Cell Mol. Life Sci.* **2016**, *73*, 811–827. [CrossRef] [PubMed]
45. Liang, C.; Mu, Y.; Tian, H.; Wang, D.; Zhang, S.; Wang, H.; Liu, Y.; Di, C. MicroRNA-140 Silencing Represses the Incidence of Alzheimer's Disease. *Neurosci. Lett.* **2021**, *758*, 135674. [CrossRef] [PubMed]
46. Akhter, R.; Shao, Y.; Shaw, M.; Formica, S.; Khrestian, M.; Leverenz, J.B.; Bekris, L.M. Regulation of ADAM10 by MiR-140-5p and Potential Relevance for Alzheimer's Disease. *Neurobiol. Aging* **2018**, *63*, 110–119. [CrossRef]
47. Gullett, J.M.; Chen, Z.; O'Shea, A.; Akbar, M.; Bian, J.; Rani, A.; Porges, E.C.; Foster, T.C.; Woods, A.J.; Modave, F.; et al. MicroRNA Predicts Cognitive Performance in Healthy Older Adults. *Neurobiol. Aging* **2020**, *95*, 186–194. [CrossRef]
48. Kayano, M.; Higaki, S.; Satoh, J.; Matsumoto, K.; Matsubara, E.; Takikawa, O.; Niida, S. Plasma MicroRNA Biomarker Detection for Mild Cognitive Impairment Using Differential Correlation Analysis. *Biomark. Res.* **2016**, *4*, 22. [CrossRef]
49. Sørensen, S.S.; Nygaard, A.-B.; Nielsen, M.-Y.; Jensen, K.; Christensen, T. MiRNA Expression Profiles in Cerebrospinal Fluid and Blood of Patients with Acute Ischemic Stroke. *Transl. Stroke Res.* **2014**, *5*, 711–718. [CrossRef]
50. Song, W.; Wang, T.; Shi, B.; Wu, Z.; Wang, W.; Yang, Y. Neuroprotective Effects of MicroRNA-140-5p on Ischemic Stroke in Mice via Regulation of the TLR4/NF-KB Axis. *Brain Res. Bull.* **2021**, *168*, 8–16. [CrossRef]
51. Wang, S.; Cui, Y.; Xu, J.; Gao, H. MiR-140-5p Attenuates Neuroinflammation and Brain Injury in Rats Following Intracerebral Hemorrhage by Targeting TLR4. *Inflammation* **2019**, *42*, 1869–1877. [CrossRef] [PubMed]
52. Sun, J.; Tao, S.; Liu, L.; Guo, D.; Xia, Z.; Huang, M. MiR-140-5p Regulates Angiogenesis Following Ischemic Stroke by Targeting VEGFA. *Mol. Med. Rep.* **2016**, *13*, 4499–4505. [CrossRef] [PubMed]
53. Yi, M.; Li, Y.; Wang, D.; Zhang, Q.; Yang, L.; Yang, C. KCNQ1OT1 Exacerbates Ischemia–Reperfusion Injury Through Targeted Inhibition of MiR-140-3P. *Inflammation* **2020**, *43*, 1832–1845. [CrossRef] [PubMed]
54. Available online: Https://www.Who.Int/News-Room/Fact-Sheets/Detail/Cardiovascular-Diseases-(Cvds) (accessed on 1 September 2022).
55. Borén, J.; Chapman, M.J.; Krauss, R.M.; Packard, C.J.; Bentzon, J.F.; Binder, C.J.; Daemen, M.J.; Demer, L.L.; Hegele, R.A.; Nicholls, S.J.; et al. Low-Density Lipoproteins Cause Atherosclerotic Cardiovascular Disease: Pathophysiological, Genetic, and Therapeutic Insights: A Consensus Statement from the European Atherosclerosis Society Consensus Panel. *Eur. Heart J.* **2020**, *41*, 2313–2330. [CrossRef] [PubMed]
56. Weber, C.; Noels, H. Atherosclerosis: Current Pathogenesis and Therapeutic Options. *Nat. Med.* **2011**, *17*, 1410–1422. [CrossRef]
57. Liu, H.; Mao, Z.; Zhu, J.; Shen, M.; Chen, F. MiR-140-5p Inhibits Oxidized Low-Density Lipoprotein-Induced Oxidative Stress and Cell Apoptosis via Targeting Toll-like Receptor 4. *Gene Ther.* **2021**, *28*, 413–421. [CrossRef]
58. Bennett, M.R.; Sinha, S.; Owens, G.K. Vascular Smooth Muscle Cells in Atherosclerosis. *Circ. Res.* **2016**, *118*, 692–702. [CrossRef]
59. Zhao, Z.-W.; Zhang, M.; Liao, L.-X.; Zou, J.; Wang, G.; Wan, X.-J.; Zhou, L.; Li, H.; Qin, Y.-S.; Yu, X.-H.; et al. Long Non-Coding RNA PCA3 Inhibits Lipid Accumulation and Atherosclerosis through the MiR-140-5p/RFX7/ABCA1 Axis. *Biochim. Et Biophys. Acta (BBA)—Mol. Cell Biol. Lipids* **2021**, *1866*, 158904. [CrossRef]
60. Yu, X.-H.; Zhang, D.-W.; Zheng, X.-L.; Tang, C.-K. Cholesterol Transport System: An Integrated Cholesterol Transport Model Involved in Atherosclerosis. *Prog. Lipid Res.* **2019**, *73*, 65–91. [CrossRef]
61. Liu, Q.; Ren, K.; Liu, S.; Li, W.; Huang, C.; Yang, X. MicroRNA-140-5p Aggravates Hypertension and Oxidative Stress of Atherosclerosis via Targeting Nrf2 and Sirt2. *Int. J. Mol. Med.* **2018**, *43*, 839–849. [CrossRef]
62. Kaitsuka, T.; Matsushita, M.; Matsushita, N. Regulation of Hypoxic Signaling and Oxidative Stress via the MicroRNA–SIRT2 Axis and Its Relationship with Aging-Related Diseases. *Cells* **2021**, *10*, 3316. [CrossRef] [PubMed]
63. Zhao, L.; Qi, Y.; Xu, L.; Tao, X.; Han, X.; Yin, L.; Peng, J. MicroRNA-140-5p Aggravates Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity by Promoting Myocardial Oxidative Stress via Targeting Nrf2 and Sirt2. *Redox Biol.* **2018**, *15*, 284–296. [CrossRef] [PubMed]

64. Luo, Y.; Li, Y.; Peng, H.; Zhao, Y. MiR-140-5p Regulates Vascular Smooth Muscle Cell Viability, Migration and Apoptosis by Targeting ROBO4 Gene Expression in Atherosclerosis. *Mol. Med. Rep.* **2021**, *23*, 213. [CrossRef]
65. Xu, Y.; Gao, J.; Gong, Y.; Chen, M.; Chen, J.; Zhao, W.; Tan, S. Hsa-MiR-140-5p down-Regulates LDL Receptor and Attenuates LDL-C Uptake in Human Hepatocytes. *Atherosclerosis* **2020**, *297*, 111–119. [CrossRef]
66. Teng, L.; Meng, R. Long Non-Coding RNA MALAT1 Promotes Acute Cerebral Infarction Through MiRNAs-Mediated Hs-CRP Regulation. *J. Mol. Neurosci.* **2019**, *69*, 494–504. [CrossRef] [PubMed]
67. Li, H.; Liu, X.; Sun, N.; Wang, T.; Zhu, J.; Yang, S.; Song, X.; Wang, R.; Wang, X.; Zhao, Y.; et al. Differentially Expressed Circular Non-Coding RNAs in Atherosclerotic Aortic Vessels and Their Potential Functions in Endothelial Injury. *Front. Cardiovasc. Med.* **2021**, *8*, 657544. [CrossRef] [PubMed]
68. Yokoyama, M.; Shimizu, I.; Nagasawa, A.; Yoshida, Y.; Katsuumi, G.; Wakasugi, T.; Hayashi, Y.; Ikegami, R.; Suda, M.; Ota, Y.; et al. P53 Plays a Crucial Role in Endothelial Dysfunction Associated with Hyperglycemia and Ischemia. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **2019**, *129*, 105–117. [CrossRef]
69. Zhang, H.; Ji, N.; Gong, X.; Ni, S.; Wang, Y. NEAT1/MiR-140-3p/MAPK1 Mediates the Viability and Survival of Coronary Endothelial Cells and Affects Coronary Atherosclerotic Heart Disease. *Acta Biochim. Et Biophys. Sin.* **2020**, *52*, 967–974. [CrossRef]
70. Yang, L.; Chu, Y.; Wang, Y.; Zhao, X.; Xu, W.; Zhang, P.; Liu, X.; Dong, S.; He, W.; Gao, C. SiRNA-Mediated Silencing of Wnt5a Regulates Inflammatory Responses in Atherosclerosis through the MAPK/NF-KB Pathways. *Int. J. Mol. Med.* **2014**, *34*, 1147–1152. [CrossRef]
71. Zhu, Z.-R.; He, Q.; Wu, W.-B.; Chang, G.-Q.; Yao, C.; Zhao, Y.; Wang, M.; Wang, S.-M. MiR-140-3p Is Involved in In-Stent Restenosis by Targeting C-Myb and BCL-2 in Peripheral Artery Disease. *J. Atheroscler. Thromb.* **2018**, *25*, 1168–1181. [CrossRef]
72. Glatz, M.; Riedl, R.; Glatz, W.; Schneider, M.; Wedrich, A.; Bolz, M.; Strauss, R.W. Blindness and Visual Impairment in Central Europe. *PLoS ONE* **2022**, *17*, e0261897. [CrossRef] [PubMed]
73. Velez-Montoya, R.; Oliver, S.C.N.; Olson, J.L.; Fine, S.L.; Quiroz-Mercado, H.; Mandava, N. Current knowledge and trends in age-related macular degeneration: Genetics, Epidemiology, and Prevention. *Retina* **2014**, *34*, 423–441. [CrossRef] [PubMed]
74. Ertekin, S.; Yıldırım, O.; Dinç, E.; Ayaz, L.; Fidancı, S.B.; Tamer, L. Evaluation of Circulating MiRNAs in Wet Age-Related Macular Degeneration. *Mol. Vis.* **2014**, *20*, 1057–1066. [PubMed]
75. Yu, X.; Zheng, H.; Chan, M.T.; Wu, W.K.K. MicroRNAs: New Players in Cataract. *Am. J. Transl. Res.* **2017**, *9*, 3896–3903. [PubMed]
76. Drake, M.T.; Clarke, B.L.; Lewiecki, E.M. The Pathophysiology and Treatment of Osteoporosis. *Clin. Ther.* **2015**, *37*, 1837–1850. [CrossRef]
77. Benedetti, M.G.; Furlini, G.; Zati, A.; Letizia Mauro, G. The Effectiveness of Physical Exercise on Bone Density in Osteoporotic Patients. *BioMed Res. Int.* **2018**, *2018*, 4840531. [CrossRef]
78. Zhu, G.; Zeng, C.; Qian, Y.; Yuan, S.; Ye, Z.; Zhao, S.; Li, R. Tensile Strain Promotes Osteogenic Differentiation of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells through Upregulating LncRNA-MEG3. *Histol. Histopathol.* **2021**, *36*, 939–946. [CrossRef]
79. Kocijan, R.; Muschitz, C.; Geiger, E.; Skalicky, S.; Baierl, A.; Dormann, R.; Plachel, F.; Feichtinger, X.; Heimel, P.; Fahrleitner-Pammer, A.; et al. Circulating MicroRNA Signatures in Patients With Idiopathic and Postmenopausal Osteoporosis and Fragility Fractures. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2016**, *101*, 4125–4134. [CrossRef]
80. Ramírez-Salazar, E.G.; Carrillo-Patiño, S.; Hidalgo-Bravo, A.; Rivera-Paredez, B.; Quiterio, M.; Ramírez-Palacios, P.; Patiño, N.; Valdés-Flores, M.; Salmerón, J.; Velázquez-Cruz, R. Serum MiRNAs MiR-140-3p and MiR-23b-3p as Potential Biomarkers for Osteoporosis and Osteoporotic Fracture in Postmenopausal Mexican-Mestizo Women. *Gene* **2018**, *679*, 19–27. [CrossRef]
81. Yin, R.; Jiang, J.; Deng, H.; Wang, Z.; Gu, R.; Wang, F. MiR-140-3p Aggregates Osteoporosis by Targeting PTEN and Activating PTEN/PI3K/AKT Signaling Pathway. *Hum. Cell* **2020**, *33*, 569–581. [CrossRef]
82. Li, K.-C.; Chang, Y.-H.; Yeh, C.-L.; Hu, Y.-C. Healing of Osteoporotic Bone Defects by Baculovirus-Engineered Bone Marrow-Derived MSCs Expressing MicroRNA Sponges. *Biomaterials* **2016**, *74*, 155–166. [CrossRef] [PubMed]
83. Wu, Y.-Z.; Huang, H.-T.; Cheng, T.-L.; Lu, Y.-M.; Lin, S.-Y.; Ho, C.-J.; Lee, T.-C.; Hsu, C.-H.; Huang, P.-J.; Huang, H.H.; et al. Application of MicroRNA in Human Osteoporosis and Fragility Fracture: A Systemic Review of Literatures. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 5232. [CrossRef] [PubMed]
84. Fushimi, S.; Nohno, T.; Nagatsuka, H.; Katsuyama, H. Involvement of MiR-140-3p in Wnt3a and TGFβ3 Signaling Pathways during Osteoblast Differentiation in MC3T3-E1 Cells. *Genes Cells* **2018**, *23*, 517–527. [CrossRef] [PubMed]
85. Mao, J.-H.; Sui, Y.-X.; Ao, S.; Wang, Y.; Liu, Y.; Leng, H. MiR-140-3p Exhibits Repressive Functions on Preosteoblast Viability and Differentiation by Downregulating MCF2L in Osteoporosis. *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.* **2020**, *56*, 49–58. [CrossRef]
86. Loeser, R.F.; Collins, J.A.; Diekman, B.O. Ageing and the Pathogenesis of Osteoarthritis. *Nat. Rev. Rheumatol.* **2016**, *12*, 412–420. [CrossRef]
87. Woods, S.; Charlton, S.; Cheung, K.; Hao, Y.; Soul, J.; Reynard, L.N.; Crowe, N.; Swingler, T.E.; Skelton, A.J.; Piróg, K.A.; et al. MicroRNA-Seq of Cartilage Reveals an Overabundance of MiR-140-3p Which Contains Functional IsomiRs. *RNA* **2020**, *26*, 1575–1588. [CrossRef]
88. Duan, L.; Liang, Y.; Xu, X.; Xiao, Y.; Wang, D. Recent Progress on the Role of MiR-140 in Cartilage Matrix Remodelling and Its Implications for Osteoarthritis Treatment. *Arthritis Res. Ther.* **2020**, *22*, 194. [CrossRef]
89. Miyaki, S.; Nakasa, T.; Otsuki, S.; Grogan, S.P.; Higashiyama, R.; Inoue, A.; Kato, Y.; Sato, T.; Lotz, M.K.; Asahara, H. MicroRNA-140 Is Expressed in Differentiated Human Articular Chondrocytes and Modulates Interleukin-1 Responses. *Arthritis Rheum.* **2009**, *60*, 2723–2730. [CrossRef]

90. Miyaki, S.; Sato, T.; Inoue, A.; Otsuki, S.; Ito, Y.; Yokoyama, S.; Kato, Y.; Takemoto, F.; Nakasa, T.; Yamashita, S.; et al. MicroRNA-140 Plays Dual Roles in Both Cartilage Development and Homeostasis. *Genes Dev.* **2010**, *24*, 1173–1185. [CrossRef]
91. Castanheira, C.I.G.D.; Anderson, J.R.; Fang, Y.; Milner, P.I.; Goljanek-Whysall, K.; House, L.; Clegg, P.D.; Peffers, M.J. Mouse MicroRNA Signatures in Joint Ageing and Post-Traumatic Osteoarthritis. *Osteoarthr. Cartil. Open* **2021**, *3*, 100186. [CrossRef]
92. Tardif, G.; Hum, D.; Pelletier, J.-P.; Duval, N.; Martel-Pelletier, J. Regulation of the IGFBP-5 and MMP-13 Genes by the MicroRNAs MiR-140 and MiR-27a in Human Osteoarthritic Chondrocytes. *BMC Musculoskelet. Disord.* **2009**, *10*, 148. [CrossRef] [PubMed]
93. Si, H.-B.; Yang, T.-M.; Li, L.; Tian, M.; Zhou, L.; Li, D.-P.; Huang, Q.; Kang, P.; Yang, J.; Zhou, Z.-K.; et al. MiR-140 Attenuates the Progression of Early-Stage Osteoarthritis by Retarding Chondrocyte Senescence. *Mol. Ther. Nucleic Acids* **2020**, *19*, 15–30. [CrossRef] [PubMed]
94. Si, H.-B.; Zeng, Y.; Liu, S.-Y.; Zhou, Z.-K.; Chen, Y.-N.; Cheng, J.-Q.; Lu, Y.-R.; Shen, B. Intra-Articular Injection of MicroRNA-140 (MiRNA-140) Alleviates Osteoarthritis (OA) Progression by Modulating Extracellular Matrix (ECM) Homeostasis in Rats. *Osteoarthr. Cartil.* **2017**, *25*, 1698–1707. [CrossRef] [PubMed]
95. Yamashita, S.; Miyaki, S.; Kato, Y.; Yokoyama, S.; Sato, T.; Barrionuevo, F.; Akiyama, H.; Scherer, G.; Takada, S.; Asahara, H. L-Sox5 and Sox6 Proteins Enhance Chondrogenic MiR-140 MicroRNA Expression by Strengthening Dimeric Sox9 Activity. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 22206–22215. [CrossRef] [PubMed]
96. Papathanasiou, I.; Trachana, V.; Mourmoura, E.; Tsezou, A. DNA Methylation Regulates MiR-140-5p and MiR-146a Expression in Osteoarthritis. *Life Sci.* **2019**, *228*, 274–284. [CrossRef]
97. Wei, W.; He, S.; Wang, Z.; Dong, J.; Xiang, D.; Li, Y.; Ren, L.; Kou, N.; Lv, J. LINC01534 Promotes the Aberrant Metabolic Dysfunction and Inflammation in IL-1β-Simulated Osteoarthritic Chondrocytes by Targeting MiR-140-5p. *Cartilage* **2021**, *13*, 898S–907S. [CrossRef]
98. Cao, F.; Chen, Y.; Wang, X.; Wu, L.-M.; Tian, M.; Li, H.-Y.; Si, H.-B.; Shen, B. Therapeutic Effect and Potential Mechanisms of Intra-Articular Injections of MiR-140-5p on Early-Stage Osteoarthritis in Rats. *Int. Immunopharmacol.* **2021**, *96*, 107786. [CrossRef]
99. Ren, T.; Wei, P.; Song, Q.; Ye, Z.; Wang, Y.; Huang, L. MiR-140-3p Ameliorates the Progression of Osteoarthritis via Targeting CXCR4. *Biol. Pharm. Bull.* **2020**, *43*, 810–816. [CrossRef]
100. Karlsen, T.A.; Jakobsen, R.B.; Mikkelsen, T.S.; Brinchmann, J.E. MicroRNA-140 Targets RALA and Regulates Chondrogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells by Translational Enhancement of SOX9 and ACAN. *Stem. Cells Dev.* **2014**, *23*, 290–304. [CrossRef]
101. Karlsen, T.A.; de Souza, G.A.; Ødegaard, B.; Engebretsen, L.; Brinchmann, J.E. MicroRNA-140 Inhibits Inflammation and Stimulates Chondrogenesis in a Model of Interleukin 1β-Induced Osteoarthritis. *Mol. Ther. Nucleic Acids* **2016**, *5*, e373. [CrossRef]
102. Liang, Y.; Duan, L.; Xiong, J.; Zhu, W.; Liu, Q.; Wang, D.; Liu, W.; Li, Z.; Wang, D. E2 Regulates MMP-13 via Targeting MiR-140 in IL-1β-Induced Extracellular Matrix Degradation in Human Chondrocytes. *Arthritis Res. Ther.* **2016**, *18*, 105. [CrossRef]
103. Li, W.; Zhao, S.; Yang, H.; Zhang, C.; Kang, Q.; Deng, J.; Xu, Y.; Ding, Y.; Li, S. Potential Novel Prediction of TMJ-OA: MiR-140-5p Regulates Inflammation Through Smad/TGF-β Signaling. *Front. Pharmacol.* **2019**, *10*, 15. [CrossRef] [PubMed]
104. Zhang, L.; Qiu, J.; Shi, J.; Liu, S.; Zou, H. MicroRNA-140-5p Represses Chondrocyte Pyroptosis and Relieves Cartilage Injury in Osteoarthritis by Inhibiting Cathepsin B/Nod-like Receptor Protein 3. *Bioengineered* **2021**, *12*, 9949–9964. [CrossRef] [PubMed]
105. Swingler, T.E.; Niu, L.; Smith, P.; Paddy, P.; Le, L.; Barter, M.J.; Young, D.A.; Clark, I.M. The Function of MicroRNAs in Cartilage and Osteoarthritis. *Clin. Exp. Rheumatol.* **2019**, *37* (Suppl. S120), 40–47. [PubMed]
106. Wang, Z.; Huang, C.; Zhao, C.; Zhang, H.; Zhen, Z.; Xu, D. Knockdown of LINC01385 Inhibits Osteoarthritis Progression by Modulating the MicroRNA-140-3p/TLR4 Axis. *Exp. Ther. Med.* **2021**, *22*, 1244. [CrossRef] [PubMed]
107. Kwak, Y.H.; Kwak, D.-K.; Moon, H.-S.; Kim, N.Y.; Yee, J.-S.; Yoo, J.-H. Significant Changes in Serum MicroRNAs after High Tibial Osteotomy in Medial Compartmental Knee Osteoarthritis: Potential Prognostic Biomarkers. *Diagnostics* **2021**, *11*, 258. [CrossRef]
108. Tao, S.-C.; Yuan, T.; Zhang, Y.-L.; Yin, W.-J.; Guo, S.-C.; Zhang, C.-Q. Exosomes Derived from MiR-140-5p-Overexpressing Human Synovial Mesenchymal Stem Cells Enhance Cartilage Tissue Regeneration and Prevent Osteoarthritis of the Knee in a Rat Model. *Theranostics* **2017**, *7*, 180–195. [CrossRef]
109. Chaudhry, N.; Muhammad, H.; Seidl, C.; Downes, D.; Young, D.A.; Hao, Y.; Zhu, L.; Vincent, T.L. Highly Efficient CRISPR-Cas9-Mediated Editing Identifies Novel Mechanosensitive MicroRNA-140 Targets in Primary Human Articular Chondrocytes. *Osteoarthr. Cartil.* **2022**, *30*, 596–604. [CrossRef]
110. Ugalde, A.P.; Español, Y.; López-Otín, C. Micromanaging Aging with MiRNAs: New Messages from the Nuclear Envelope. *Nucleus* **2011**, *2*, 549–555. [CrossRef]

2. Rationnel de l'étude, hypothèse et objectifs

La Progeria est une maladie caractérisée par de profondes anomalies cellulaires, principalement dues à l'accumulation de progérine dans le noyau. Les miARNs, sont de puissants régulateurs de l'expression génétique et leur dérégulation est de plus en plus rapportée comme étant impliquée dans le vieillissement physiologique et pathologique.

Un premier miRNome par RT-qPCR sur panel ciblé a permis à notre équipe d'identifier un cluster de gènes de miARNs surexprimés situé sur le locus 14q3.2 dans des fibroblastes HGPS. Nous avons montré que cette surexpression était secondaire au remodelage de la chromatine de cette région (Frankel et al., 2022). Parmi les miARNs surexprimés, nous avons identifié les miR-376a-3p et miR-376b-3p comme des acteurs de la maladie. Ces miARNs ciblent des régulateurs du cycle cellulaire (CDK2) et de l'autophagie (Beclin-1, ATG4C et ATG5), entraînant une inhibition de la dégradation de la progérine et une sénescence prématurée ; ces deux phénomènes contribuant au phénotype.

Afin d'être plus exhaustifs et de compléter l'étude précédente, notre équipe a réalisé, dans le cadre du précédent plan stratégique AFM de notre Unité, un transcriptome par NGS incluant les ARNs non codants sur des fibroblastes témoins, HGPS et HGPS-like. Cette étude a conduit à l'identification de 65 lncARNs et 10 miARNs dérégulés chez les patients. Parmi ces 10 miARNs, nous nous sommes concentrés sur les miR140-5p et miR-140-3p, tous deux issus du même précurseur, qui sont surexprimés dans les fibroblastes des patients. Ces deux miARNs sont particulièrement intéressants, car ils ciblent des transcrits de molécules clés impliquées dans des voies connues comme étant altérées dans le syndrome et liées à son phénotype clinique. Par exemple, ils régulent le stress oxydatif en ciblant SIRT2 et NRF2, et la différenciation chondrogénique et ostéoblastique en inhibant respectivement DNPEP ou BMP2. Ils sont également impliqués dans des pathologies associées au vieillissement physiologique **(voir Article 1. miR-140 et vieillissement)**.

L'objectif de mes travaux a donc été d'étudier et de comprendre l'implication de ces deux miARNs dans la physiopathologie de cette maladie grâce à des études fonctionnelles s'appuyant sur une combinaison de modèles *in vitro* et *in vivo*. Mon travail a été également l'occasion d'identifier, à partir des données de transcriptome obtenues, des lncARNs qui nous paraissent pertinents à étudier plus en détail.

3. Résultats

3.1. Article 3

Léa Toury, Diane Frankel, Sara Nael, Coraline Airault, Elva-María Novoa-del-Toro, Catherine Bartoli, Mario Abaji, Anaïs Baudot, Frederique Magdinier, Elise Kaspi¶, Patrice Roll¶.

miR-140-5p overexpression contributes to oxidative stress and mitochondrial dysfunction in Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome fibroblasts through NRF2 pathway.

A soumettre dans la revue Aging Cell.

miR-140-5p overexpression contributes to oxidative stress and mitochondrial dysfunction in Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome fibroblasts through NRF2 pathway

Léa Toury[1], Diane Frankel[2], Sara Nael[1], Coraline Airault[1], Elva-María Novoa-del-Toro[1], Catherine Bartoli[1], Mario Abaji[3], Anaïs Baudot[1], Frederique Magdinier[1], Elise Kaspi[2¶], Patrice Roll[2¶*]

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

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

3- Aix Marseille Univ, APHM, INSERM, MMG, Hôpital la Timone, M2GM, 13385 Marseille, France

¶ These authors contributed equally to this work.

***Corresponding author:** Patrice Roll, MD, PhD, Aix-Marseille Univ, INSERM, MMG, U 1251, Faculté des Sciences Médicales et Paramédicales 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

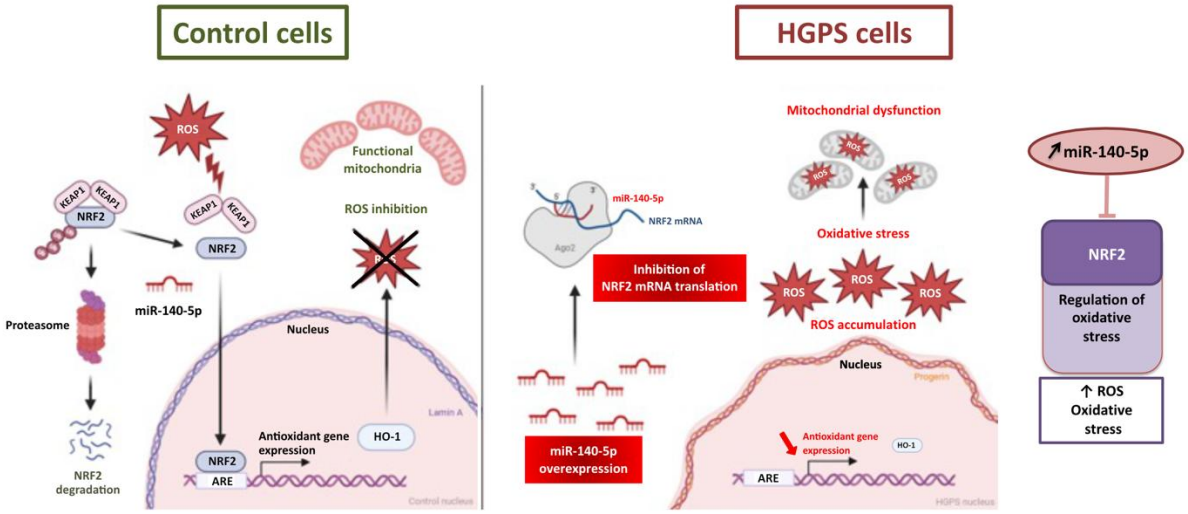
Authors' e-mail adresses: lea.toury@univ-amu.fr; sara.nael@univ-amu.fr; coraline.airault@univ-amu.fr; diane.frankel@univ-amu.fr; elvamn@uio.no; bartoli13012@gmail.com; mario.abaji@univ-amu.fr; anais.baudot@univ-amu.fr; frederique.magdinier@univ-amu.fr; elise.kaspi@univ-amu.fr; patrice.roll@univ-amu.fr.

Running title: miR-140-5p overexpression in HGPS

Keywords: lamins, Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome, microRNA, miR-140, NRF2, oxidative stress, mitochondria

Character count (including blanks): 44,424

Graphical abstract



This study identifies a novel molecular mechanism involving miR-140-5p that contributes to the pathogenesis of HGPS. By decreasing NRF2 expression, miR-140-5p overexpression results in downregulation of the NRF2/KEAP1/HO-1 antioxidant pathway in HGPS fibroblasts, leading to increased oxidative stress and mitochondrial dysfunction, two hallmarks of aging.

Abstract

Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome (HGPS) is a rare, fatal genetic disorder characterized by accelerated aging. The accumulation of an abnormal and toxic protein called progerin within HGPS nuclei disrupts cellular processes, including gene expression and DNA repair. Oxidative stress, resulting from an imbalance between reactive oxygen species (ROS) production and antioxidant defense, is one of the hallmarks of HGPS.

To identify novel molecular mechanisms underlying HGPS pathogenesis, we performed miRNA expression profiling in HGPS compared to healthy control fibroblasts. We identified 10 differentially expressed (DE) miRNAs between HGPS and control cells. We focused on miR-140-5p and miR-140-3p, 2 miRNAs upregulated in HGPS fibroblasts. miR-140-5p is known to directly target the transcript of NRF2, a master regulator of the antioxidant response. Using *in vitro* mimic and antimiR transfections, we demonstrated that miR-140-5p overexpression in HGPS fibroblasts results in the downregulation of the NRF2/KEAP1/HO-1 antioxidant pathway, leading to increased oxidative stress. Furthermore, our results indicate that miR-140-5p overexpression induces mitochondrial dysfunction, characterized by a reduced oxidative phosphorylation capacity. miR-140-5p, by targeting regulation oxidative stress and mitochondrial function through NRF2, may play a pivotal role in the pathophysiology of HGPS and offer new therapeutic avenues.

1. INTRODUCTION

Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome (HGPS; OMIM #176670) is a devastating rare genetic disorder characterized by accelerated aging beginning in childhood. Children with HGPS exhibit a multisystemic disease, presenting with a wide range of premature aging phenotypes, including growth retardation, hair loss, lipoatrophy, amyotrophy, skeletal abnormalities, and cardiovascular disease. Tragically, they succumb to these complications around 14 years old usually due to myocardial infarction or stroke as a result of early atherosclerosis (Gordon et al. 1993).

The underlying cause of HGPS lies in a mutation within the *LMNA* gene, which encodes Lamin A and Lamin C, crucial proteins that, along with Lamins B, constitute the nuclear *lamina*, involved in nuclear integrity and function. The most common form of HGPS arises from a *de novo* heterozygous mutation (c.1824C > T, p.G608G) in exon 11 of the *LMNA* gene. This mutation leads to aberrant splicing that results in the production of a truncated and toxic nuclear lamin A precursor (prelamin AΔ50), called progerin (De Sandre-Giovannoli et al. 2003; Eriksson et al. 2003).

HGPS belongs to a broader category of diseases called laminopathies, all of which involve defects in lamins or their interacting proteins. Other, rarer forms of premature aging syndromes, collectively termed HGPS-like, share many clinical features with HGPS. These conditions arise from diverse *de novo* exonic or intronic mutations that also result in the intracellular accumulation of toxic prelamin A isoforms. The severity of the HGPS-like phenotype can vary depending on the specific mutation, ranging from a mild adult form to a severe neonatal form of progeria (Barthélémy et al. 2015). The accumulation of progerin or other toxic prelamin A isoforms within the nucleus disrupts the nuclear *lamina*, triggering a cascade of cellular defects, including nuclear envelope abnormalities, loss of heterochromatin, DNA damage, and oxidative stress (Cau et al. 2014; Gonzalo et al. 2017). All these defects lead to premature cell senescence that contribute to accelerated aging.

Oxidative stress, resulting from an imbalance between reactive oxygen species (ROS) production and antioxidant defense mechanisms, is a hallmark of HGPS and a major contributor to its devastating effects (Cau et al. 2014). Chronic exposure to excessive ROS can lead to irreversible cellular damages through the oxidation of proteins, lipids, and DNA. In healthy cells, a finely tuned balance exists between ROS generation and removal by antioxidant mechanisms. However, in HGPS cells, this balance is disrupted. Increased ROS production coupled with insufficient detoxification by the antioxidant defense system leads to a state of chronic oxidative stress (Kristiani & Kim 2023). Consequently, fibroblasts of young HGPS patients exhibit significantly higher levels of oxidized proteins compared to age-matched controls, resembling those found in 80-year-old individuals (Trigueros-Motos et al. 2011; Viteri et al. 2010).

The nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (NRF2) pathway plays a critical role in the cellular antioxidant response. NRF2 is a basic leucine zipper protein (bZIP) transcription factor encoded by the *NFE2L2* gene that controls the expression over 200 cytoprotective genes including antioxidant proteins. Under normal conditions, NRF2 is kept inactive by Kelch-like

enoyl-CoA hydratase-associated protein 1 (KEAP1) and is degraded after its polyubiquitination by the Cullin 3 (Cul3) E3 ubiquitin ligase by the proteasome in the cytoplasm (Ngo & Duennwald 2022). However, when ROS accumulate and induce a stress response, NRF2 is released from KEAP1 that undergoes conformational change after modification of specific stress-sensing cysteine residues. This results in NRF2 stabilization and its nuclear translocation. There, it binds to the antioxidant response element (ARE) in the promoter regions of genes encoding antioxidant proteins, such as heme oxygenase 1 (HO-1) (Dai et al. 2020). Disruption of the NRF2 pathway in HGPS has been identified as a key driver of the premature aging phenotype. Kubben *et al* (Kubben et al. 2016) demonstrated that progerin can sequester NRF2 at the nuclear *lamina*, hindering its transcriptional activity and exacerbating chronic oxidative stress.

MicroRNAs (miRNAs) are a class of endogenous small non-coding RNAs (19-25 nucleotides) that regulate gene expression by targeting messenger RNAs (mRNAs). They primarily bind to the 3' untranslated region (3'UTR) of mRNAs, leading to either translational repression or mRNA degradation (Wahid et al. 2010). Dysregulation of miRNA expression has been implicated in a variety of human diseases, including cancer and neurodegenerative disorders. A number of miRNAs have been implicated in laminopathies and associated with deleterious effects (Frankel et al. 2018). While only a few miRNAs have been linked to HGPS pathophysiology, previous studies have shed light on their potential involvement in the disease. For instance, miR-9, highly expressed in neurons, protects neural cells from progerin accumulation by targeting the 3'UTR of wild-type prelamin A and progerin transcripts, triggering their degradation (Jung et al. 2012; Nissan et al. 2012). Other miRNAs, all overexpressed in HGPS cells, have been described to contribute to HGPS pathogenesis, such as miR-1 and miR-29 (Ugalde et al. 2010; Ugalde et al. 2011), miR-34a-5p (Manakanatas et al. 2022), miR-376a-3p and miR-376b-3p (Frankel et al. 2022) or miR-59 (Hu et al. 2023).

To deepen our understanding of the role of miRNAs in HGPS, we conducted a comprehensive miRNA expression profiling using next-generation sequencing (NGS) on dermal fibroblasts obtained from HGPS, HGPS-like patients and healthy controls. We demonstrated the critical role of miR-140-5p in HGPS fibroblasts as its overexpression represses NRF2, a key regulator of the antioxidant response. This repression contributes to increased oxidative stress, which could ultimately drive cellular senescence and participate in the premature aging phenotype characteristic of HGPS.

2. RESULTS

2.1 Profiling of miRNA expression identifies miR-140-5p and miR-140-3p overexpression in HGPS fibroblasts

To identify miRNAs dysregulated in HGPS, we performed miRNA expression profiling using NGS on primary fibroblasts from 4 HGPS, 1 HGPS -like, 2 age-matched controls and a healthy 82-year-old donor for comparison with physiological ageing. The HGPS cohort included four

classical cases with the heterozygous *LMNA* c.1824C>T (p.G608G) mutation (HGPS1, HGPS2, HGPS3 and HGPS4) and one HGPS-like patient (HGPS-L) with the heterozygous *LMNA* c.1968+1G>A mutation **(Table S1)**. This HGPS-like patient, previously described by our team in (Navarro et al. 2004), exhibited a severe neonatal premature aging syndrome and succumbed to respiratory distress at six months. Like the classical HGPS patients, HGPS-L produces the prelamin AΔ50 transcript (progerin) (Barthélémy et al. 2015). Since miRNA expression in HGPS patient's fibroblasts is closely related to progerin accumulation, which increases with cell passage (Harhouri et al. 2017), we adjusted the cell passages used for our NGS analysis to account for progerin detection in patient's cells **(Figure S1)**.

The miRNA-Seq analysis identified 693 miRNAs. Unsupervised hierarchical clustering of all expressed miRNAs separated the samples into distinct subgroups **(Figure 1A)**. Notably, the four HGPS patients (HGPS1, HGPS2, HGPS3 and HGPS4) clustered together with the elderly subject (C3, 82 years), while the other two controls (C1 and C2) formed a separate group. The HGPS-L patient was clearly distinct from all others.

To identify miRNA of interest, we applied a selection pipeline **(Figure S2)**. Statistical analyses revealed 10 differentially expressed (DE) miRNAs between the HGPS/HGPS-L group and control cells (FDR< 0.05) among the 693 expressed miRNAs **(Figures 1B and 1C)**. Among these 10 DE miRNAs, 6 were overexpressed and 4 were underexpressed **(Figure 1C)**. Unsupervised hierarchical clustering of these 10 differentially expressed miRNAs clearly separated patients and controls **(Figure 1D)**. Importantly, within the patient group, HGPS-L was distinct from the 4 classical HGPS cases, while in the control group, the elderly subject (C3) was separated from the 2 younger controls.

To refine the selection of miRNAs of interest, we analyzed raw count plots and excluded miRNAs with low expression levels (less than 200 counts for both groups) or heterogeneous expression (presence of outliers in a group) **(Figures S3A to S3C)**. This step eliminated 5 additional miRNAs. RT-qPCR assays on mRNA extracts used for NGS confirmed the deregulation of the remaining 5 miRNAs **(Figure 1C)**. Three miRNAs were overexpressed (miR-210-3p, miR-140-5p, and miR-140-3p), and two were underexpressed (miR-503-3p and miR-424-3p) in the HGPS/HGPS-like group. Considering the numerous targets of miR-140-5p and miR-140-3p, which are involved in pathways known to be dysregulated in HGPS or to contribute to its phenotypic manifestations (Toury et al. 2022) **(Figures S8)**, we prioritized these 2 miRNAs for further study.

To confirm the overexpression of miR-140-5p and miR-140-3p in a larger patient cohort and to assess their impact on cellular aging and senescence, we quantified each of these two miRNAs by RT-qPCR in five patients (HGPS2, HGPS3, HGPS4, two new patients HGPS5, HGPS7) together with five controls (C1, C2, C3 and two new controls C4 and C5) at different passages. We confirmed the overexpression of miR-140-5p (FC=4.18, $p = 0.0079$) and miR-140-3p (FC=4.29, $p = 0.0079$) in HGPS fibroblasts compared to controls **(Figure 1E)**. While the expression of miR-140-5p and miR-140-3p were highly correlated ($R^2 = 0.9783$, $p < 0.001$) **(Figure S3D)**, there was no significant correlation between the expression of either miRNA and

the level of senescence (R^2 = 0.1539, p = ns for miR-140-5p and R^2 = 0.1769, p = ns for miR-140-3p) **(Figure S3E)**.

To evaluate the relevance of these 2 miRNAs in an animal model context, we further quantified the expression of mmu-miR-140-5p and mmu-miR-140-3p by RT-qPCR in primary cultures of vascular smooth muscle cells (VSMCs) extracted from the thoracic aorta of *Lmna*$^{G609G/G609G}$ mice (n = 6) compared with wild-type mice (n = 4). The aorta that exhibits a loss of VSMCs was showed to be severely affected in this progeria mouse model (Hamczyk et al. 2018). Similar to human HGPS fibroblasts, we observed overexpression of these 2 miRNAs in VSMCs from *Lmna*$^{G609G/G609G}$ mice (miR-140-5p, FC = 1.76, p = 0.0218 and miR-140-3p FC = 1.54, p = 0.0168) **(Figure 1F)**.

2.2 HGPS fibroblasts exhibit a downregulation of the NRF2/KEAP1/HO-1 antioxidant pathway

Previous studies have shown that miR-140-5p can enhance oxidative stress by directly targeting NRF2 and SIRT2 mRNAs, thereby exacerbating atherosclerosis (Liu et al. 2019). Given our observation of miR-140-5p overexpression in HGPS/HGPS-like patient fibroblasts, we investigated NRF2 expression under basal conditions in four distinct HGPS cell lines (HGPS1, HGPS2, HGPS3 and HGPS5) and two distinct controls (C2, C4).

We found a reduced NRF2 protein level in all HGPS fibroblasts compared to controls (mean decrease: 72%) **(Figure 2A)**. This decreased level is associated with a decrease in level of the antioxidant enzyme HO-1, which is known to be transcriptionally regulated by NRF2, also observed in all HGPS fibroblasts (mean decrease: 51%) **(Figure 2A)**. Additionally, we observed a significant reduction of KEAP1 level **(Figure S4A)**. KEAP1 is the protein partner that sequesters NRF2 in the cytoplasm for degradation under normal conditions (Ngo & Duennwald 2022).

At the transcriptional level, while NRF2 transcript *(NEF2L2)* level remained unchanged, HO-1 transcript *(HMOX1)* level was significantly decreased in HGPS fibroblasts ($p \leq 0.05$) **(Figure S4B)**.

Immunofluorescence analysis revealed a distinct distribution of NRF2 in HGPS fibroblasts compared to controls. While NRF2 was consistently detected in all nuclei of control fibroblasts, we observed a heterogeneous pattern in HGPS fibroblasts **(Figures 2B and S5)**. Notably, we found a negative association between NRF2 expression and progerin accumulation in HGPS nuclei. HGPS fibroblasts with a high progerin level exhibited a loss of NRF2 **(Figures 2B, 2C and S5)** with however some variations between HGPS cell lines.

Using a fractionation protocol to isolate cytoplasmic and nuclear NRF2 protein fractions, we also observed differences between HGPS and controls. As expected, NRF2 was not detected in the cytoplasmic fraction of either controls or HGPS cells, as it is typically imported into the nucleus upon activation or alternatively degraded via the proteasome in conjunction with its partner KEAP1. We observed a dramatic decrease in nuclear NRF2 in HGPS1 and HGPS3 (99% and 86% compared to the mean expression in controls, respectively), while NRF2

was detectable in HGPS2 **(Figure 2D)**. This heterogeneity regarding nuclear NRF2 distribution aligns with the observations made by immunofluorescence staining.

These findings collectively suggest a defect in the NRF2/KEAP1/HO-1 antioxidant pathway in HGPS fibroblasts, probably due to a loss of NRF2 expression that impairs its nuclear import.

2.3 Increased ROS levels in HGPS fibroblasts correlates with progerin accumulation and NRF2/KEAP1 pathway repression

Given that the NRF2/KEAP1 pathway is a primary antioxidant system that mitigates excessive ROS production and oxidative stress, we quantified basal ROS levels by DCF-DA using flow cytometry in HGPS (HGPS3) and control (C4) fibroblasts. We also assessed cellular responses to oxidative stress induced by tert-Butyl Hydroperoxide (tBHP). As previously reported, HGPS fibroblasts exhibited higher basal ROS levels compared to controls (mean FC=2.09, p=0.0411) **(Figures 3A and 3B)**. Both HGPS and control fibroblasts responded to tBHP induction (p=0.0022 for control; and p = 0.0122 for HGPS), but the response magnitude was lower in HGPS cells compared to controls (mean FC=2.37 and mean FC=4.08, respectively, p=0.0411) **(Figure 3B)**.

In order to independently study two HGPS fibroblast subpopulations exhibiting low (DCF-DA Dim) or high (DCF-DA Bright) ROS content, we sorted them by Fluorescence-Activated Cell Sorting (FACS), according to DCF-DA levels **(Figure 3C)**. We observed a positive association between ROS levels and progerin expression, as cells with high ROS levels (DCF-DA Bright) had a higher proportion of progerin-positive cells (73%) compared to cells with low ROS levels (DCF-DA Dim) (13%) (p<0.0001) **(Figure 3C)**. In contrast, a negative association was observed between ROS levels and nuclear NRF2 expression, as cells with high ROS levels (DCF-DA Bright) had a higher proportion of nuclear NRF2-negative cells (32%) compared to cells with low ROS levels (DCF-DA Dim) (9%) (p<0.0001). Quantification of miR-140-5p in each of the two HGPS fibroblast populations depending on ROS levels revealed a higher expression of miR-140-5p in DCF-DA Bright compared to DCF-DA Dim population (n=5, mean FC=1.462 +/- 0.099, p=0.0312) **(Figure 3D)**. Notably, a significantly higher expression of miR-140-3p was also observed in the DCF-DA Bright population compared to the DCF-DA Dim population (n=5, mean FC=1.391 +/- 0.081, p=0.0312) (data not shown).

These data suggest that the defective antioxidant NRF2 pathway in HGPS fibroblasts, likely associated with the presence of progerin, contributes to ROS accumulation.

2.4 miR-140-5p overexpression represses the NRF2/KEAP1/HO-1 pathway, leading to ROS accumulation in HGPS fibroblasts

To investigate the role of miR-140-5p overexpression in ROS accumulation through NRF2/KEAP1/HO-1 pathway repression, we transfected miR-140-5p mimic (miR-140-5p) and a control mimic (miR-CTL) into three different control fibroblast cell lines (C2, C4, and C6). We observed a significant decrease in NRF2 protein level after miR-140-5p transfection (p=0.0312)

with a similar effect 48 hours post-transfection (73% mean decrease; 66% decrease for C4) compared to 24 hours (70% mean decrease; 76% decrease for C4) **(Figure 4A** and **Figure S6A)**. As expected, this decrease in NRF2 is associated with a decrease in HO-1 (p=0.0312) at both time points (58% decrease at 24 hours and 55% decrease at 48 hours for C4) **(Figure 4A)**.

To confirm the impact of miR-140-5p-induced NRF2/KEAP1/HO-1 pathway inhibition on ROS accumulation, we assessed ROS levels by flow cytometry following transfection of miR-140-5p, miR-CTL, and miR-140-3p (which does not target NRF2 mRNA). As expected, miR-140-5p overexpression in control fibroblasts (C4) significantly increased ROS accumulation (mean=+36%, p=0.0252), while miR-140-3p had no effect (mean=-0.3%, p=0.9008) **(Figure 4B)**.

Next, we transfected antimiR-140-5p and antimiR control (antimiR-CTL) into 3 different HGPS cell lines (HGPS1, HGPS2 and HGPS5). As expected, antimiR-140-5p transfection increased NRF2 and HO-1 expression, although the timing and magnitude of the effect varied between the 3 cell lines (NRF2: mean=+44.5%, p=0.0312; HO-1: mean=+40.5%, p=0.0312) **(Figure 4C)**. In HGPS1, antimiR-140-5p transfection led to a high response for NRF2 (+120%) and a weaker response for HO-1 (+27%) as early as 24h post-transfection whereas we observed a marked effect on HO-1 level 48h post-transfection (+95% for NRF2 and +142% for HO-1) **(Figure S6B)**. In HGPS2 and HGPS5, the effect of antimiR-140-5p is delayed and weaker than in HGPS1 (NRF2: +21% and HO-1: +13% for HGPS2; NRF2: +29% for and HO-1: +25% for HGPS5, 48h post-transfection). At 72h post-transfection, the effect of antimiR-140-5p remained stable for HGP2 (+21% for NRF2 and +29% for HO-1) but was lost for HGPS5 (-19% for NRF2 and +6% for HO-1) **(Figure S6B)**. Finally, the inhibition of miR-140-5p in HGPS fibroblasts (HGPS3) led to a significant decrease in ROS accumulation 48h post-transfection (mean=-21% compared to antimiR-CTL, p=0.0404) **(Figure 4D)**. Notably, the inhibition of miR-140-3p in HGPS fibroblasts (HGPS3) also led to a significant decrease (mean=-15% compared to antimiR-CTL, p=0.0420) of ROS accumulation at 48h post-transfection **(Figure 4D)**.

These results demonstrate that miR-140-5p overexpression in HGPS fibroblasts leads the inhibition of the NRF2/KEAP1/HO-1 pathway, resulting in ROS accumulation that contributes to chronic oxidative stress.

2.5 miR-140-5p overexpression leads to mitochondrial dysfunction in HGPS fibroblasts

Previous studies described mitochondrial dysfunction in HGPS fibroblasts (Mateos et al. 2015; Xiong et al. 2016; Kang et al. 2017). To investigate the contribution of miR-140-5p to this dysfunction, we quantified the oxidative phosphorylation (OXPHOS) mitochondrial function by analyzing the oxygen consumption rate (OCR) which reflects mitochondrial respiration using a Seahorse assay. Simultaneously, the extracellular acidification rate (ECAR) that corresponds to protons excretion and reflects glycolysis, was measured.

We first analyzed OCR and ECAR in control and HGPS fibroblasts. Interestingly, basal respiration and ATP-linked respiration were significantly altered in HGPS cells (p=0.0056 and 0.0296, respectively) **(Figure 5A).** In parallel, glycolytic reserve capacity was significantly enhanced in HGPS cells (p=0.0039) **(**Figure S7A**)**. In contrast, no significant differences were

observed in maximal respiratory capacity, reserve capacity and basal ECAR (p=0.547, 0.6048, and 0.837) **(Figures 5A and S7A)**.

We then transfected antimiR-140-5p and an antimiR control (antimiR-CTL) into three different HGPS cell lines (HGPS1, HGPS3 and HGPS5). Inhibition of miR-140-5p overexpression led to improvement of basal and ATP-linked respiration (p=0.0262 and p=0.0379, respectively) **(Figure 5B)**, whereas no effect was observed on maximal respiratory capacity, reserve capacity, basal ECAR, and glycolytic reserve capacity (p>0.999, 0.3829, 0.9015 and 0.5350, respectively) **(Figures 5B and S7B)**.

The mirror experiment was carried out by ectopically overexpressing miR-140-5p in control fibroblasts. Overexpression of miR-140-5p in control cells (C6) mimicked, at least in part, the phenotype observed in HGPS cells by inducing a clear reduction of basal respiration and ATP-linked respiration (p=0.003 and 0.0015, respectively) **(Figures 5C and S7C)**. This overexpression had also a negative effect on maximal respiratory capacity and glycolytic reserve capacity (p=0.0360 and p=0.206, respectively), while no effect was observed on the reserve capacity and basal ECAR.

Our results demonstrate that basal and ATP-linked respiration are altered in HGPS cells, and suggest that, in our model, this compromised OXPHOS mitochondrial function, may be compensated by increased glycolysis reserve capacity. Moreover, we demonstrate that overexpression of miR-140-5p contribute to these mitochondrial alterations.

3. DISCUSSION

In this study, we investigated the role of miRNAs in the pathogenesis of Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome, a rare premature aging disorder caused by mutations in the *LMNA* gene. Our miRNA profiling analysis identified 10 significant DE miRNAs in HGPS fibroblasts compared to healthy controls. Among them, we identified the two overexpressed miRNAs miR-140-5p and miR-140-3p, produced from the same precursor, as good candidates based on their ability to target pathways described to be altered in HGPS and/or associated with the clinical phenotype **(Figure S8)**.

In this study, we focused on miR-140-5p, which has been implicated in various cellular processes relevant to HGPS, including oxidative stress, cell proliferation, senescence, and skeletal development (Toury et al. 2022). Notably, miR-140-5p directly targets the mRNAs of NRF2 and SIRT2, two key regulators of the antioxidant defense system, thereby increasing oxidative stress (Liu et al. 2019), which is a hallmark of aging (López-Otín et al. 2023), and a central factor in the HGPS pathogenesis (Cau et al. 2014). The critical role of the NRF2 pathway in HGPS pathophysiology has been previously highlighted by Kubben *et al* (Kubben et al. 2016). They demonstrated that progerin impairs NRF2 transcriptional activity by sequestering it at the nuclear *lamina*, thereby preventing the activation of the antioxidant response element. Our study provides new insights into the molecular regulation of the NRF2 pathway in HGPS. Indeed, we observed a downregulation of both NRF2 and its cytoplasmic partner KEAP1 leading to a decreased NRF2 activity in HGPS fibroblasts. We show that miR-140-5p

overexpression in HGPS fibroblasts represses the NRF2/KEAP1/HO-1 antioxidant pathway thus contributing to the disease phenotype. The repression of NRF2 by miR-140-5p occurs at the translational level as the transcript level of NRF2 *(NFE2L2)* is not decreased. Protein fractionation and immunofluorescence analyses confirmed reduced nuclear NRF2 levels in any but not all HGPS cell lines. Consequently, the expression of the NRF2-regulated antioxidant enzyme, HO-1, was significantly decreased at the transcript and protein levels, despite elevated cellular ROS levels. The observed downregulation of KEAP1 in HGPS fibroblasts may be a secondary consequence of reduced cellular NRF2 levels induced by miR-140-5p overexpression, potentially leading to KEAP1 degradation.

Our data also demonstrate the negative impact of miR-140-5p overexpression on mitochondrial function by affecting OXPHOS in HGPS fibroblasts. Mitochondrial dysfunction is a well-established feature of HGPS, characterized by aberrant morphology, reduced mobility, decreased ATP production, and impaired mitogenesis due to decreased peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1 alpha (PGC-1α) expression (Mateos et al. 2015; Xiong et al. 2016; Kang et al. 2017). This dysfunction is partially attributed to progerin-mediated ROS accumulation (Arnold et al. 2021). Our findings suggest that miR-140-5p contributes to this mitochondrial dysfunction, but the molecular mechanisms may be multifactorial. One potential mechanism involves the downregulation of NRF2, which is also a key regulator of mitochondrial function. NRF2 plays a crucial role in maintaining mitochondrial membrane potential, regulating substrate availability for respiration, and supporting mitochondrial biogenesis and integrity during inflammation and oxidative stress (Vomund et al. 2017).

The NRF2 decrease induced by miR-140-5p overexpression could significantly contribute to HGPS pathophysiology. As demonstrated by Kubben *et al* (Kubben et al. 2016), NRF2 knockdown in wild-type fibroblasts or mesenchymal stem cells derived from genetically corrected HGPS iPSCs (GC-iPSC-MSCs) mimics several HGPS defects even if the toxic progerin protein is absent, including increased ROS levels and reduced antioxidant gene expression. Notably, NRF2 knockdown in GC-iPSC-MSCs also resulted in increased stem cell attrition, mirroring the observed stem cell dysfunction in HGPS. Conversely, experimental elevation of NRF2 levels in HGPS cells restored NRF2 pathway activity and improved some HGPS phenotypes. *In vivo* studies further support the role of NRF2 in HGPS. *C. elegans* SKN-1 mutants (NRF2 homologue) display a shortened lifespan (An & Blackwell 2003). Nrf2-deficient mice also exhibit a shortened lifespan (Yoh et al. 2001), reduced bone mineral density (Ibáñez et al. 2014), and other aging-related phenotypes, such as decreased adipogenic differentiation and altered lipid profiles (Tanaka et al. 2008), which are also observed in HGPS. These findings, along with the observed effects of NRF2 knockdown *in vitro*, strongly suggest that NRF2 dysregulation plays a significant role in the pathogenesis of HGPS.

In our study, we did not observe sequestration of NRF2 at the nuclear *lamina* as previously described by Kubben *et al* (Kubben et al. 2016). This discrepancy might be attributed to the use of different cellular models. Our work focused exclusively on primary fibroblast cultures from HGPS patients and did not rely on induced progerin overexpression. We observed a

significant heterogeneity among HGPS cell lines, with variations in progerin accumulation and reduced NRF2 levels. Furthermore, the repression of the NRF2/KEAP1/HO-1 pathway varied between patients and across culture passages. Interestingly, miR-140-5p overexpression was detected at early passages, independent of the degree of senescence. We hypothesize that progerin may effectively sequester NRF2 at early stages when NRF2 expression is still high. Subsequently, miR-140-5p represses NRF2 expression, contributing to the overall downregulation of the NRF2 pathway.

MicroRNAs (miRNAs) are potent regulators of gene expression, capable of simultaneously targeting numerous mRNAs due to their small size. Beyond NRF2, miR-140-5p targets other key molecules relevant to HGPS pathophysiology. Firstly, miR-140-5p targets Peptidyl-prolyl isomerase 1 (Pin1), an enzyme crucial for various cellular processes including cell cycle regulation and growth. Pin1 deregulation contributes to aging, cancer, and neurodegenerative diseases (Li et al. 2021, p.1). Notably, Pin1 is essential for bone cell differentiation, regulating key signaling pathways like Wnt, BMP (bone morphogenetic protein), and FGF (fibroblast growth factor) (Islam et al. 2017). Furthermore, Pin1 downregulation promotes senescence in tendon stem/progenitor cells (Chen et al. 2015, p.1). Secondly, miR-140-5p targets Transforming Growth Factor-β receptor I (TGFBR1), a key component of the TGF-β and BMP signaling pathways crucial for skeletal development and maintenance (Wu et al. 2016; Zhang et al. 2015). TGF-β signaling inhibits adipogenesis and promotes osteoblast differentiation and TGFBR1 knockdown enhances adipogenesis and reduces osteoblast differentiation (Zhang et al. 2015). Finally, miR-140-5p targets transcripts of DNPEP (Aspartyl Aminopeptidase), BMP2 (Bone morphogenetic protein 2), and HDAC4 (Histone deacetylase 4), all critical regulators of chondroblastic and osteoblastic differentiation (Nakamura et al. 2011). In zebrafish embryos, microinjection of miR-140-5p disrupts bone development, inducing craniofacial and skeletal malformations by targeting BMP-2 (Gan et al. 2016).

The diverse functions of miR-140-5p target genes, encompassing roles in oxidative stress, cellular senescence, adipogenesis, and skeletal development, suggest that its overexpression in HGPS cells may contribute significantly to the multifaceted aging phenotype observed in these patients. This includes characteristic features such as adipose tissue alterations (lipoatrophy, lipodystrophy) and various skeletal abnormalities (growth retardation, low bone density, osteoporosis, osteolysis, clavicular resorption, acro-osteolysis, or arthritis). Therapeutic interventions aimed at modulating miR-140-5p could potentially address multiple dysfunctional molecular pathways contributing to the HGPS phenotype. As discussed by Kubben *et al* (Kubben et al. 2016), restoring NRF2 activity may offer a novel therapeutic strategy for HGPS, given their identification of NRF2 pathway repression as a key driver of the disease. Notably, modulating miR-140-5p overexpression could not only restore NRF2 expression and alleviate oxidative stress and its associated consequences but also potentially improve other aspects of the HGPS phenotype, including osteoarticular and cardiovascular diseases, by restoring the expression of multiple miR-140-5p target genes involved in these processes.

4. CONCLUSION

This study provides novel insights into the molecular mechanisms underlying Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome. Our findings demonstrate that miR-140-5p, upregulated in HGPS fibroblasts, contributes to the disease phenotype by repressing the NRF2 antioxidant pathway. By targeting NRF2, miR-140-5p exacerbates oxidative stress, a hallmark of HGPS. Furthermore, given the diverse functions of miR-140-5p target genes, including those involved in skeletal development, adipogenesis, and cellular senescence, its overexpression likely contributes to the multifaceted aging phenotype observed in HGPS patients. These findings highlight the potential of modulating miR-140-5p expression as a novel therapeutic strategy for HGPS, not only by restoring NRF2 activity and mitigating oxidative stress but also by potentially addressing other aspects of the disease, such as skeletal abnormalities and adipose tissue dysfunction.

5. MATERIAL AND METHODS

Cells

Dermal fibroblasts from HGPS patients and controls were sourced from skin biopsies, cultured, and stored either at the TAC Biological Resource Center (La Timone Hospital, Assistance Publique des Hôpitaux de Marseille, France) or obtained from the Coriell Institute for Medical Research and ATCC. All biological samples from the CRB TAC included signed informed consent for research use. In the manuscript, HGPS and control fibroblasts are referred to as detailed in **Table S1**. Culture conditions are described in Supplemental methods.

Mice

Knock-in mouse model *Lmna*$^{G609G/G609G}$ carrying the c.1827C>T (p.Gly609Gly) mutation (Osorio et al., 2011) and wild-type mice were used for the study. Animal experiments have been carried out in compliance with the ARRIVE (Animal Research: Reporting of *in vivo* Experiments) guidelines and the European guidelines for the care and use of laboratory animals (EU directive 2010/63/EU). All animal procedures were carried out under protocols approved by a local and national ethical committee for animal experimentation (Ministère de l'Education Nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche; Authorization Apafis N°7404–2016102816469761 v4). Isolation and primary culture of mouse VSMCs were prepared as previously described (Cardoso et al. 2024) (see Supplemental methods).

miRNA Expression Analysis by Next Generation Sequencing

Our previous studies have shown that miRNA expression is strongly influenced by progerin accumulation in HGPS cells and that, depending on the HGPS cell line, the number of passages does not clearly reflect the level of accumulation (Frankel et al. 2022). For this reason, we selected, for each HGPS cell line, a passage in which over 90% of the cells expressed progerin quantified by immunofluorescence analysis, and with progerin expression confirmed by western blot **(Figure S1)**. Total RNA extractions, quality controls and miRNA sequencing have been sub-contracted to Integragen (Evry, Paris, France) (see Supplemental methods). Data has been processed by statistical analysis comparing the control group (n=3) to the HGPS group (n=5).

Quantification of individual miRNAs by quantitative RT-PCR

cDNA was synthesized from extract RNA at a concentration of 5 ng/µL using the miRCURY LNA™ RT kit (Qiagen, Hilden, Germany), following the manufacturer's instructions. Expression levels of specific miRNAs were measured with the miRCURY LNA SYBR® Green PCR Kit (Qiagen, Hilden, Germany). Quantitative PCR amplifications were carried out in triplicate using the miRCURY LNA miRNA PCR Assay primers for *hsa*-miR-140-5p, *hsa*-miR-140-3p, *mmu*-miR-140-5p and *mmu*-miR-140-3p (Qiagen, Hilden, Germany) on a QuantStudio 5 Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). The threshold cycle (Cq) was used to

calculate relative miRNA expression using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method, normalized to *hsa*-SNORD49A or *hsa*-SNORD38B expression for human miRNAs or *mmu*-SNORD110 expression for mouse miRNAs (Qiagen, Hilden, Germany).

Quantification of individual mRNAs by quantitative RT-PCR

The extracted RNA was reverse transcribed using the SuperScript IV Reverse Transcriptase Kit (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). The cDNA was amplified with specific primers for 40 cycles at a hybridization temperature of 59 °C. Real-time PCR amplification was conducted using the TaqMan Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems) on a QuantStudio 5 Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) with predesigned primers for *NFE2L2* (Hs00975961_g1), *HMOX1* (Hs01110250_m1), *GAPDH* (Hs00266705_g1) and *RPS13* (Hs01011487_g1) (Thermo Fisher Scientific Scientific). All PCRs were performed in triplicate. Threshold cycle (Ct) values were used to determine relative mRNA expression using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method, normalized to GAPDH or RPS13 expression.

Transfection and treatment

Mimics (miRIDIAN microRNA Mimic: hsa-miR-140-5p, hsa-miR-140-3p, Mimic Negative Control) were purchased from Horizon Discovery LTD (Cambridge, UK). miRNA inhibitors ('antimiR') (miRCURY LNA™ miRNA Power Inhibitors hsa-miR-140-5p, has-miR-140-3p miRCURY LNA™ microRNA power inhibitor control) were purchased from Qiagen (Hilden, Germany). Mimics (50 nM) and antimiR (25 nM) were transfected using a Lipofectamine RNAiMAX kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) according to the manufacturer's instructions. Endogenous overexpression of miR-140-5p in HGPS fibroblasts was confirmed by RT-qPCR before antimiR transfection.

Senescence associated β-galactosidase staining

Senescence was assessed using the Senescence β-Galactosidase Staining Kit (Cell Signaling Technology, Leiden, The Netherlands) following the manufacturer's protocol. The percentage of stained cells was determined under a microscope (Leica, Wetzlar, Germany) by two independent observers through manual blind counting. For each condition, at least 100 fibroblasts were randomly selected. The results are presented graphically as the mean percentage of senescent cells.

Western blot analysis

Equal amounts of protein (40 µg) were reduced at 95°C for 5 minutes with NuPAGE Reducing Agent (NP0009, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and loaded into 8% Bis-Tris gels (NuPAGE™ precast gel, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) using NuPAGE™ MES SDS Running Buffer (NP0002, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). After electrophoresis, proteins were transferred to Immobilon-FL PVDF membranes (IPFL00010, Millipore, Burlington, MA, USA).

The primary antibodies used were: anti-lamin A/C (1:2,000, 10298-1-AP, Proteintech, Manchester, UK), anti-Progerin (1/50, sc-81611, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), anti-NRF2 (1:2000, 80593-1-RR, Proteintech, Manchester, UK), anti-HO-1 (1:1,000, 66743-1-Ig, Proteintech, Manchester, UK), anti-KEAP1 (1:2,000, 10503-2-AP, Proteintech, Manchester, UK), anti-α-tubulin (1:4,000, T6199, Sigma Aldrich) and anti-GAPDH (1:40,000, MAB374, Millipore Millipore, Burlington, MA, USA).
For revelation, ECL or fluorescence detection was used depending on the protein detected (see Supplemental methods).
All blots were imaged using a ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad), and bands were quantified using Image Lab Software (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). GAPDH or α-tubulin was used as a total cellular protein loading control.

Indirect immunofluorescence

Fibroblasts were seeded into 4-chamber well slides (SPL Lifesciences, Korea). Cells were fixed in 4% paraformaldehyde (PFA) for 15 minutes at room temperature, then permeabilized with 0.5% Triton X-100 permeabilization buffer for 10 minutes at room temperature. Subsequently, cells were incubated with primary antibodies overnight at 4°C: anti-progerin (1:50, sc-81611), anti-lamin A/C (1:100, sc-56137, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), and anti-NRF2 (1:100, GTX103322, GeneTex, Irvine, CA, USA). After washing, cells were incubated with secondary antibodies (A21203 Donkey anti-mouse AF594; A32754 Donkey anti-Rabbit AF488, 1:500, Life Technologies) for 1 hour at room temperature. Nuclei were stained with DAPI, and slides were mounted with Vectashield Antifade Mounting Medium (H-1000-10, Vector Laboratories, Newark, CA, USA), then observed using a fluorescence microscope (ApoTome.2, Zeiss, Oberkochen, Germany). After FACS based on DCF-DA intensity, sorted stained cells were analyzed using IMARIS (Oxford Instruments, Abingdon-on-Thames, UK). Nuclei were selected and then separated into positive or negative nuclei according to progerin or NRF2 intensity **(**see **Figure S9** for step-by-step process**)**.

ROS quantification

Intracellular ROS production was detected using the non-fluorescent compound DCF-DA (2', 7'-dichlorofluorescin diacetate). As it crosses plasmic membrane, the compound is deacetylated by intracellular esterases to form the non-fluorescent DCF, which oxidizes to a highly fluorescent compound. For the DCF-DA assay, cells were washed with PBS 1X (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and incubated for 30 minutes at 37°C in Dulbecco's modified Eagle's medium low glucose, pyruvate, no glutamine, no phenol red (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) with 10 µM DCF-DA (D6883-50MG, Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA). For positive controls of ROS production, 100 µM of Tert-Butyl hydroperoxide (tBHP) (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA) was added to the medium. The cells were then washed with PBS 1X and detached from the culture flask using trypsin (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) for 5 minutes and centrifuged at 250g for 5 minutes. The supernatant was

removed, and the pellet was washed twice with PBS 1X (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). The cells were resuspended in 500 µL PBS 1X and their fluorescence spectra were determined using a Cytoflex S (Beckman Coulter Life Sciences, Brea, CA, USA) or BD Accuri C6 PLUS (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France).

Fluorescence-activated Cell Sorting (FACS)

Cells were sorted using Cytoflex SRT (Beckman Coulter Life Sciences, Brea, CA, USA) after DCF-DA experiment, according to DCF-DA positivity. Two populations of cells were selected according to the level of ROS they contained, low ("dim" population) or high ("bright" population). Percentage of selected cells, number of cells and median fluorescence intensity were respectively 20.7% [range: 12.8-37.1]; 89,056 cells [range: 4,753-289,447] and 215,630 [range: 74,478-514,589] for the “dim” population and 27.5% [range: 22.4-38.1]; 130,700 cells [range: 7,494-414,438] and 1,114,255 [range: 509,468-3,001,244] for the “bright” population. The cells were subsequently prepared for immunofluorescence analysis or processed in QIAzol for RNA quantification.

Seahorse Assay

The oxygen consumption rate (OCR) and extracellular acidification rate (ECAR) were measured using the Agilent Seahorse XF Analyzer (Seahorse Bioscience, Inc, North Billerica, MA, USA), and the Cell Mito Stress Test Kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), following the manufacturer's protocol and as previously described (Mishra et al. 2019). Cells were seeded at a density of 10,000 cells per well. OCR and ECAR measurements were taken as cells were sequentially treated with 1.5 µM oligomycin, a complex V inhibitor, 2 µM carbonyl cyanide-p-trifluoromethoxyphenylhydrazone (FCCP), a protonophore which collapses the inner membrane gradient, and 0.5 µM rotenone/antimycin A (Rot/AA), inhibitors of complex III and I, leading to shut down electron transport chain (ETC) function, revealing the non-mitochondrial respiration.
OCR and ECAR were normalized to cell count. Basal respiration, ATP-linked respiration, maximal respiratory capacity and reserve capacity were calculated as described in Supplemental methods.

Quantification and statistical analysis

Statistical analysis was conducted using GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA). Normality tests were applied on the data to assess distributions, and we used the parametric or non-parametric test appropriate for our data. The test used and the number of replicates are detailed in the corresponding figure legend. A p-value ≤ 0.05 was considered significant, with significance levels indicated as follows: *p≤ 0.05, **p< 0.01, ***p< 0.001, and ****p< 0.0001.

Acknowledgments

The authors are grateful to Laurence Colleaux and Annachiara De Sandre-Giovannoli for critical discussions. We thank Aurélie Carabalona, Philippe Guigue, Aurore Merle and Marion Deconihout for technical support. We thank Karine Bertaux and Cécile Mouradian (TAC Biological Resource Center) for dermal fibroblasts culture and storage. We thank the GBiM platform (Valérie Delague, Alexandre Atkinson) and AMUTICYT Core Facility (Stéphane Robert, Léa Plantureux) for technical help. This work was supported by grants from Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Aix-Marseille University, and AFM-Téléthon (Association Française contre les Myopathies, TRIM-RD Grant 2016-2020 and MoThARD Grant 2021-2025). The project leading to this publication has received funding from the Excellence Initiative of Aix-Marseille University-A*Midex, a French “investissement d’avenir programme” AMX-19-IET-007, through the MarMaRa funding scheme.

Conflict of Interest statement

The authors have no conflicts of interest to declare.

Authors’ contributions

Conceptualization and supervision: PR and EK. Experimentation: LT, SN, CA, CB and EK. Data analyze: LT, DF, SN, EMN, MA, AB, EK and PR. Methodology: PR, EK, DF and FM. Writing: LT, DF, EK and PR.

Bibliography

An JH & Blackwell TK (2003) SKN-1 links C. elegans mesendodermal specification to a conserved oxidative stress response. *Genes Dev* 17, 1882–1893.

Arnold R, Vehns E, Randl H & Djabali K (2021) Baricitinib, a JAK-STAT Inhibitor, Reduces the Cellular Toxicity of the Farnesyltransferase Inhibitor Lonafarnib in Progeria Cells. *Int J Mol Sci* 22, 7474.

Barthélémy F, Navarro C, Fayek R, Da Silva N, Roll P, Sigaudy S, Oshima J, Bonne G, Papadopoulou-Legbelou K, Evangeliou AE, Spilioti M, Lemerrer M, Wevers RA, Morava E, Robaglia-Schlupp A, Lévy N, Bartoli M & De Sandre-Giovannoli A (2015) Truncated prelamin A expression in HGPS-like patients: a transcriptional study. *Eur. J. Hum. Genet.* 23, 1051–1061.

Cardoso D, Guilbert S, Guigue P, Carabalona A, Harhouri K, Peccate C, Tournois J, Guesmia Z, Ferreira L, Bartoli C, Levy N, Colleaux L, Nissan X & Muchir A (2024) Inhibition of poly(ADP-Ribosyl)ation reduced vascular smooth muscle cells loss and improves aortic disease in a mouse model of human accelerated aging syndrome. *Cell Death Dis* 15, 723.

Cau P, Navarro C, Harhouri K, Roll P, Sigaudy S, Kaspi E, Perrin S, De Sandre-Giovannoli A & Lévy N (2014) Nuclear matrix, nuclear envelope and premature aging syndromes in a translational research perspective. *Semin. Cell Dev. Biol.* 29, 125–147.

Chen L, Liu J, Tao X, Wang G, Wang Q & Liu X (2015) The role of Pin1 protein in aging of human tendon stem/progenitor cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 464, 487–492.

Dai X, Yan X, Wintergerst KA, Cai L, Keller BB & Tan Y (2020) Nrf2: Redox and Metabolic Regulator of Stem Cell State and Function. *Trends Mol Med* 26, 185–200.

De Sandre-Giovannoli A, Bernard R, Cau P, Navarro C, Amiel J, Boccaccio I, Lyonnet S, Stewart CL, Munnich A, Le Merrer M & Lévy N (2003) Lamin a truncation in Hutchinson-Gilford progeria. *Science* 300, 2055.

Eriksson M, Brown WT, Gordon LB, Glynn MW, Singer J, Scott L, Erdos MR, Robbins CM, Moses TY, Berglund P, Dutra A, Pak E, Durkin S, Csoka AB, Boehnke M, Glover TW & Collins FS (2003) Recurrent de novo point mutations in lamin A cause Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Nature* 423, 293–298.

Frankel D, Delecourt V, Harhouri 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* 17, e12766.

Frankel D, Delecourt V, Novoa-Del-Toro E-M, Robin JD, Airault C, Bartoli C, Carabalona A, Perrin S, Mazaleyrat K, De Sandre-Giovannoli A, Magdinier F, Baudot A, Lévy N, Kaspi E & Roll P (2022) miR-376a-3p and miR-376b-3p overexpression in Hutchinson-Gilford progeria fibroblasts inhibits cell proliferation and induces premature senescence. *iScience* 25, 103757.

Gan S, Huang Z, Liu N, Su R, Xie G, Zhong B, Zhang K, Wang S, Hu X, Zhang J & Xiang S (2016) MicroRNA-140-5p impairs zebrafish embryonic bone development via targeting BMP-2. *FEBS Lett* 590, 1438–1446.

Gonzalo S, Kreienkamp R & Askjaer P (2017) Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome: A premature aging disease caused by LMNA gene mutations. *Ageing Res. Rev.* 33, 18–29.

Gordon LB, Brown WT & Collins FS (1993) Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome. In M. P. Adam, H. H. Ardinger, R. A. Pagon, S. E. Wallace, L. J. Bean, K. Stephens, & A. Amemiya, eds. *GeneReviews®*. Seattle (WA): University of Washington, Seattle. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1121/ [Accessed February 11, 2020].

Hamczyk MR, Villa-Bellosta R, Gonzalo P, Andrés-Manzano MJ, Nogales P, Bentzon JF, López-Otín C & Andrés V (2018) Vascular Smooth Muscle-Specific Progerin Expression Accelerates Atherosclerosis and Death in a Mouse Model of Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome. *Circulation* 138, 266–282.

Harhouri K, Navarro C, Depetris D, Mattei M-G, Nissan X, Cau P, De Sandre-Giovannoli A & Lévy N (2017) MG132-induced progerin clearance is mediated by autophagy activation and splicing regulation. *EMBO Mol Med* 9, 1294–1313.

Hu Q, Zhang N, Sui T, Li G, Wang Z, Liu M, Zhu X, Huang B, Lu J, Li Z & Zhang Y (2023) Anti-hsa-miR-59 alleviates premature senescence associated with Hutchinson-Gilford progeria syndrome in mice. *EMBO J* 42, e110937.

Ibáñez L, Ferrándiz ML, Brines R, Guede D, Cuadrado A & Alcaraz MJ (2014) Effects of Nrf2 deficiency on bone microarchitecture in an experimental model of osteoporosis. *Oxid Med Cell Longev* 2014, 726590.

Islam R, Yoon W-J & Ryoo H-M (2017) Pin1, the Master Orchestrator of Bone Cell Differentiation. *J Cell Physiol* 232, 2339–2347.

Jung H-J, Coffinier C, Choe Y, Beigneux AP, Davies BSJ, Yang SH, Barnes RH, Hong J, Sun T, Pleasure SJ, Young SG & Fong LG (2012) Regulation of prelamin A but not lamin C by miR-9, a brain-specific microRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, E423-431.

Kang HT, Park JT, Choi K, Choi HJC, Jung CW, Kim GR, Lee Y-S & Park SC (2017) Chemical screening identifies ROCK as a target for recovering mitochondrial function in Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Aging Cell* 16, 541–550.

Kristiani L & Kim Y (2023) The Interplay between Oxidative Stress and the Nuclear Lamina Contributes to Laminopathies and Age-Related Diseases. *Cells* 12, 1234.

Kubben N, Zhang W, Wang L, Voss TC, Yang J, Qu J, Liu G-H & Misteli T (2016) Repression of the Antioxidant NRF2 Pathway in Premature Aging. *Cell* 165, 1361–1374.

Li J, Mo C, Guo Y, Zhang B, Feng X, Si Q, Wu X, Zhao Z, Gong L, He D & Shao J (2021) Roles of peptidyl-prolyl isomerase Pin1 in disease pathogenesis. *Theranostics* 11, 3348–3358.

Liu Q-Q, Ren K, Liu S-H, Li W-M, Huang C-J & Yang X-H (2019) MicroRNA-140-5p aggravates hypertension and oxidative stress of atherosclerosis via targeting Nrf2 and Sirt2. *Int J Mol Med* 43, 839–849.

López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M & Kroemer G (2023) Hallmarks of aging: An expanding universe. *Cell* 186, 243–278.

Manakanatas C, Ghadge SK, Agic A, Sarigol F, Fichtinger P, Fischer I, Foisner R & Osmanagic-Myers S (2022) Endothelial and systemic upregulation of miR-34a-5p fine-tunes senescence in progeria. *Aging (Albany NY)* 14, 195–224.

Mateos J, Landeira-Abia A, Fafián-Labora JA, Fernández-Pernas P, Lesende-Rodríguez I, Fernández-Puente P, Fernández-Moreno M, Delmiro A, Martín MA, Blanco FJ & Arufe MC (2015) iTRAQ-based analysis of progerin expression reveals mitochondrial dysfunction, reactive oxygen species accumulation and altered proteostasis. *Stem Cell Res Ther* 6, 119.

Mishra P, Zhang T, Guo M & Chan D (2019) Mitochondrial Respiratory Measurements in Patient-derived Fibroblasts. *BIO-PROTOCOL* 9. Available at: https://bio-protocol.org/e3446 [Accessed January 10, 2025].

Nakamura Y, Inloes JB, Katagiri T & Kobayashi T (2011) Chondrocyte-specific microRNA-140 regulates endochondral bone development and targets Dnpep to modulate bone morphogenetic protein signaling. *Mol Cell Biol* 31, 3019–3028.

Navarro CL, De Sandre-Giovannoli A, Bernard R, Boccaccio I, Boyer A, Geneviève D, Hadj-Rabia S, Gaudy-Marqueste C, Smitt HS, Vabres P, Faivre L, Verloes A, Van Essen T, Flori E, Hennekam R, Beemer FA, Laurent N, Le Merrer M, Cau P & Lévy N (2004) Lamin A and ZMPSTE24 (FACE-1) defects cause nuclear disorganization and identify restrictive dermopathy as a lethal neonatal laminopathy. *Hum. Mol. Genet.* 13, 2493–2503.

Ngo V & Duennwald ML (2022) Nrf2 and Oxidative Stress: A General Overview of Mechanisms and Implications in Human Disease. *Antioxidants (Basel)* 11, 2345.

Nissan X, Blondel S, Navarro C, Maury Y, Denis C, Girard M, Martinat C, De Sandre-Giovannoli A, Levy N & 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 Rep* 2, 1–9.

Tanaka Y, Aleksunes LM, Yeager RL, Gyamfi MA, Esterly N, Guo GL & Klaassen CD (2008) NF-E2-related factor 2 inhibits lipid accumulation and oxidative stress in mice fed a high-fat diet. *J Pharmacol Exp Ther* 325, 655–664.

Toury L, Frankel D, Airault C, Magdinier F, Roll P & Kaspi E (2022) miR-140-5p and miR-140-3p: Key Actors in Aging-Related Diseases? *Int J Mol Sci* 23, 11439.

Trigueros-Motos L, Gonzalez JM, Rivera J & Andres V (2011) Hutchinson-Gilford progeria syndrome, cardiovascular disease and oxidative stress. *Front Biosci (Schol Ed)* 3, 1285–1297.

Ugalde AP, Mariño G & López-Otín C (2010) Rejuvenating somatotropic signaling: a therapeutical opportunity for premature aging? *Aging (Albany NY)* 2, 1017–1022.

Ugalde AP, Ramsay AJ, de la Rosa J, Varela I, Mariño G, Cadiñanos J, Lu J, Freije JM & López-Otín C (2011) Aging and chronic DNA damage response activate a regulatory pathway involving miR-29 and p53. *EMBO J.* 30, 2219–2232.

Viteri G, Chung YW & Stadtman ER (2010) Effect of progerin on the accumulation of oxidized proteins in fibroblasts from Hutchinson Gilford progeria patients. *Mech Ageing Dev* 131, 2–8.

Vomund S, Schäfer A, Parnham MJ, Brüne B & von Knethen A (2017) Nrf2, the Master Regulator of Anti-Oxidative Responses. *Int J Mol Sci* 18, 2772.

Wahid F, Shehzad A, Khan T & Kim YY (2010) MicroRNAs: Synthesis, mechanism, function, and recent clinical trials. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1803, 1231–1243.

Wu M, Chen G & Li Y-P (2016) TGF-β and BMP signaling in osteoblast, skeletal development, and bone formation, homeostasis and disease. *Bone Res* 4, 16009.

Xiong Z-M, Choi JY, Wang K, Zhang H, Tariq Z, Wu D, Ko E, LaDana C, Sesaki H & Cao K (2016) Methylene blue alleviates nuclear and mitochondrial abnormalities in progeria. *Aging Cell* 15, 279–290.

Yoh K, Itoh K, Enomoto A, Hirayama A, Yamaguchi N, Kobayashi M, Morito N, Koyama A, Yamamoto M & Takahashi S (2001) Nrf2-deficient female mice develop lupus-like autoimmune nephritis. *Kidney Int* 60, 1343–1353.

Zhang X, Chang A, Li Y, Gao Y, Wang H, Ma Z, Li X & Wang B (2015) miR-140-5p regulates adipocyte differentiation by targeting transforming growth factor-β signaling. *Sci Rep* 5, 18118.

Figures

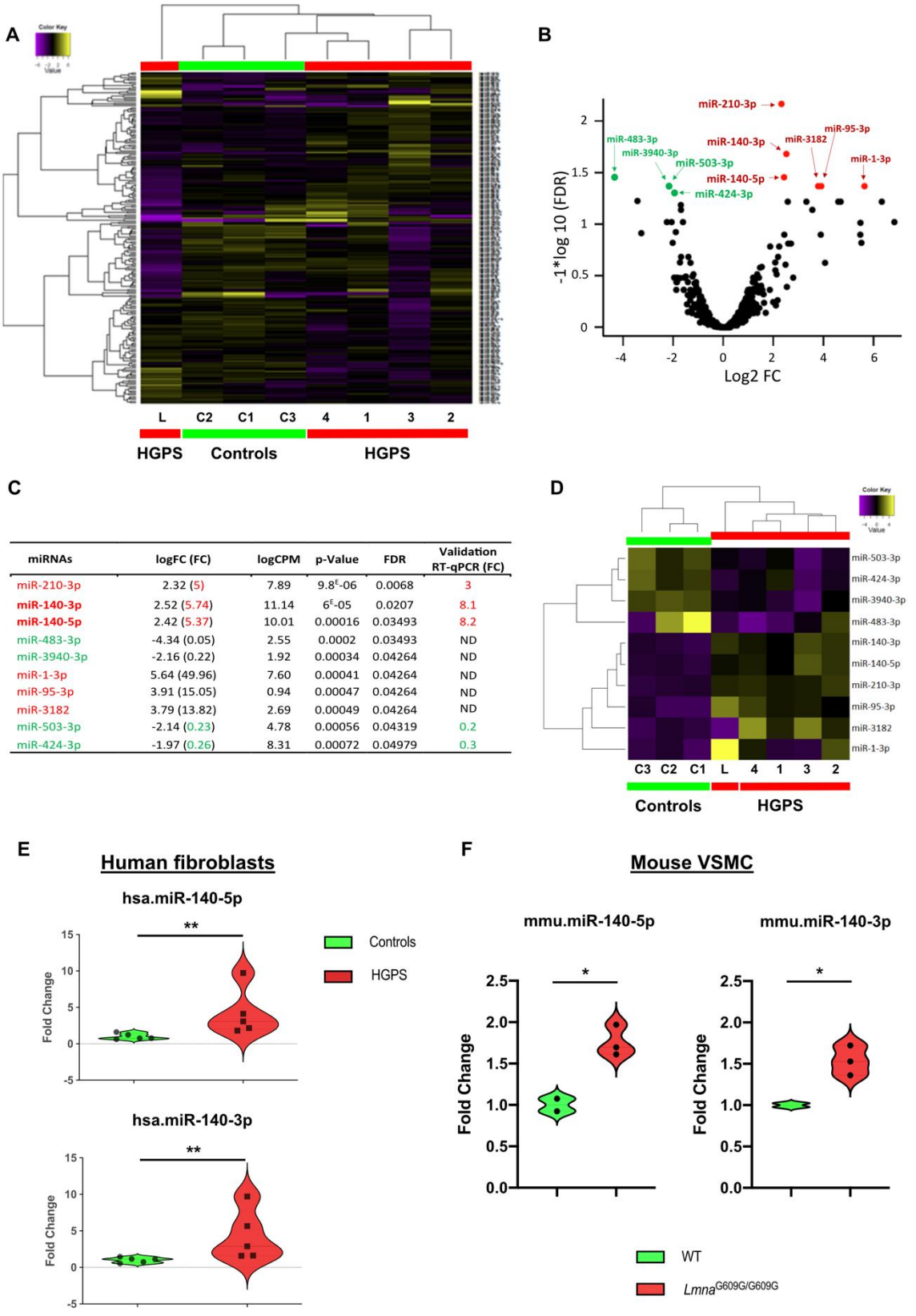
Figure 1: miRNA expression profile in HGPS fibroblasts.

Figure 2: Downregulation of the NRF2/KEAP1/HO-1 antioxidant pathway in HGPS fibroblasts.

Figure 3: Increased ROS levels in HGPS fibroblasts resulting from NRF2/KEAP1 pathway repression.

Figure 4: miR-140-5p overexpression represses the NRF2/KEAP1/HO-1 pathway.

Figure 5: miR-140-5p overexpression leads to mitochondrial dysfunction in HGPS fibroblasts.



miRNAs	logFC (FC)	logCPM	p-Value	FDR	Validation RT-qPCR (FC)
miR-210-3p	2.32 (5)	7.89	9.8^{E}-06	0.0068	3
miR-140-3p	2.52 (5.74)	11.14	6^{E}-05	0.0207	8.1
miR-140-5p	2.42 (5.37)	10.01	0.00016	0.03493	8.2
miR-483-3p	-4.34 (0.05)	2.55	0.0002	0.03493	ND
miR-3940-3p	-2.16 (0.22)	1.92	0.00034	0.04264	ND
miR-1-3p	5.64 (49.96)	7.60	0.00041	0.04264	ND
miR-95-3p	3.91 (15.05)	0.94	0.00047	0.04264	ND
miR-3182	3.79 (13.82)	2.69	0.00049	0.04264	ND
miR-503-3p	-2.14 (0.23)	4.78	0.00056	0.04319	0.2
miR-424-3p	-1.97 (0.26)	8.31	0.00072	0.04979	0.3

Figure 1: miRNA expression profile in HGPS fibroblasts. (A) Unsupervised hierarchical clustering of all expressed miRNAs in HGPS (red) and control (green) fibroblasts. Color intensity indicates miRNA expression level (purple = lower, yellow = higher). **(B)** Volcano plot

showing the relationship between unadjusted p-value (y-axis, -log10 transformed) and fold change (x-axis, log2 transformed) for miRNAs in HGPS/HGPS-like vs. controls. Green dots represent under-expressed and red dots represent overexpressed miRNAs (p-value < 0.05, unpaired t-test). **(C)** Table showing the 10 differentially expressed miRNAs in HGPS/HGPS-like patients vs. controls. LogFC (log fold change), fold change (FC), False discovery rate (FDR) correction for 693 comparisons, and counts per million (CPM) are shown. Under-expressed miRNAs in patients are colored in green and overexpressed miRNAs are in red. Statistical results (p-value and FDR) and individual RT-qPCR validation results are included. ND = not determined. **(D)** Unsupervised hierarchical clustering of the 10 differentially expressed miRNAs in HGPS (red) and control (green) fibroblasts. Color intensity indicates miRNA expression level (purple = lower, yellow = higher). **(E)** Expression of hsa-miR-140-5p and hsa-miR-140-3p quantified by RT-qPCR in HGPS fibroblasts (n = 5) as compared with the control fibroblasts (n = 5). Violin plots show the frequency distribution of the data. All individual data points are shown. $**p< 0.01$, Mann-Whitney test. **(F)** Expression of mmu-miR-140-5p and mmu-miR-140-3p quantified by RT-qPCR in cultured VSMC from two aorta of *Lmna*$^{G609G/G609G}$ mice (n = 6) as compared with wild-type mice (n = 4). Violin plots show the frequency distribution of the data. All individual data points are shown. $*p\leq 0.05$, unpaired Welch's t-test.

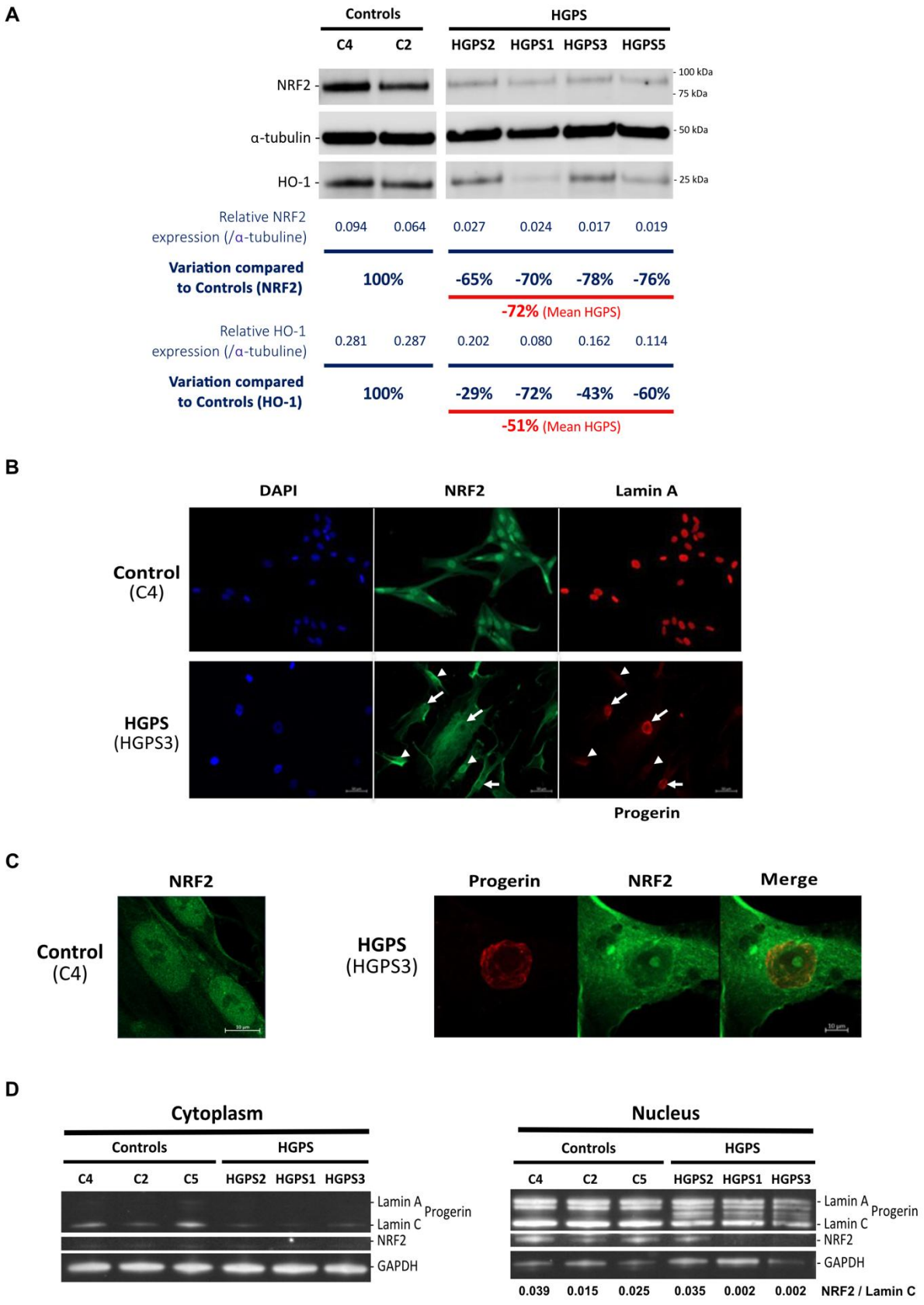


Figure 2: Downregulation of the NRF2/KEAP1/HO-1 antioxidant pathway in HGPS fibroblasts. (A) Western blot analysis of whole-cell lysates from controls and HGPS fibroblasts

(2 cell lines for controls and 4 cell lines for HGPS). Detection of lamin A/C, progerin, NRF2, HO-1, and α-tubulin. Individual data points are shown. Relative expression, corresponding to the ratio of NRF2 or HO-1 expression to α-tubulin expression, are shown. Variation of NRF2 or HO-1 expression compared to the mean expression of Controls is shown for each HGPS cell line **(B)** Representative immunofluorescence images of control and HGPS fibroblasts stained for NRF2 and lamin A (control) or progerin (HGPS) and counterstained with DAPI. Arrowheads indicate nuclei expressing NRF2 but not progerin. Arrows indicate nuclei expressing progerin but not NRF2. Scale bar=50 μm. **(C)** Representative confocal immunofluorescence images. Scale bar=10 μm. **(D)** Western blot analysis of cytoplasmic and nuclear protein fractions from controls and HGPS fibroblasts (3 cell lines per group). Detection of lamin A/C, progerin, NRF2, and GAPDH.

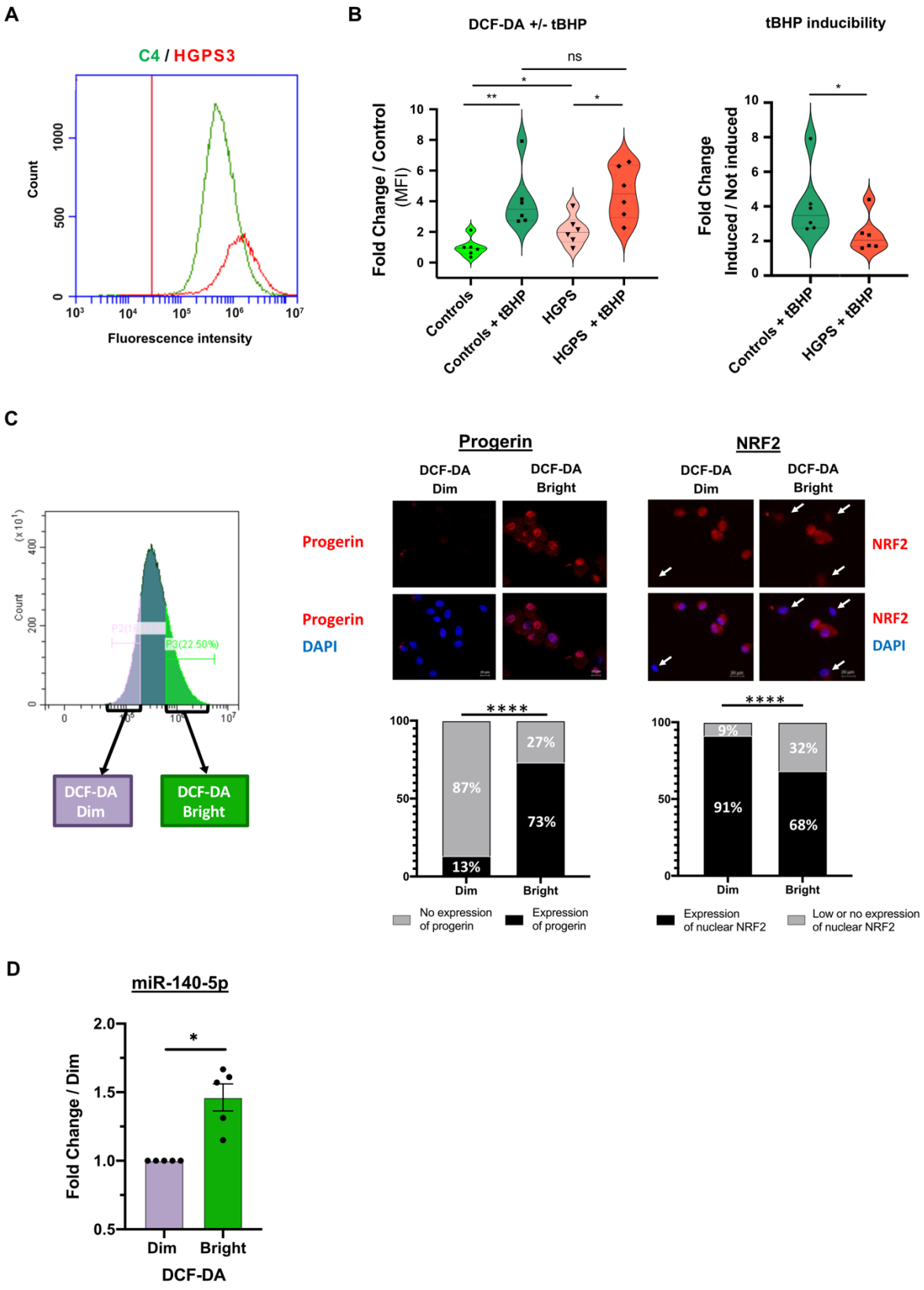


Figure 3: Increased ROS levels in HGPS fibroblasts resulting from NRF2/KEAP1 pathway repression. (A) Representative flow cytometry graph showing ROS levels in HGPS (HGPS3, red) and control (C4, green) fibroblasts using DCF-DA. Positivity threshold was established using

non stained cells. Histograms show cell count (y-axis) and fluorescent intensity (x-axis). **(B)** Statistical analysis comparing median fluorescent intensity (MFI). Violin plots show the distribution of MFI relative fold change for each condition (with or without tBHP-induced oxidative stress) compared to control without tBHP. Right plots show the capacity of control and HGPS cells to respond to induced stress. All data points are shown. (ns: not significant, ∗p≤ 0.05, **p<0.01, Mann-Whitney test). **(C)** Representative flow cytometry graph showing two sorted cell populations (DCF-DA Dim =low ROS, DCF-DA Bright =high ROS) using FACS. Immunofluorescence images of sorted HGPS fibroblasts stained for progerin and counterstained with DAPI. Scale bar = 20 µm. Arrows indicate nuclei with low or no expression of NRF2. Graphs under images show percentages of cells with or without nuclear expression of progerin (left) and NRF2 (right). (****p < 0.0001, chi-squared test). **(D)** Expression of miR-140-5p quantified by RT-qPCR in low ROS fibroblasts (DCF-DA Dim) as compared with high ROS fibroblasts (DCF-DA Bright) (n = 5 for each). Values are expressed as fold change compared to DCF-DA Dim normalized to SNORD38B. Plots show the frequency distribution of the data. All individual data points are shown (p=0.0312, Wilcoxon test).

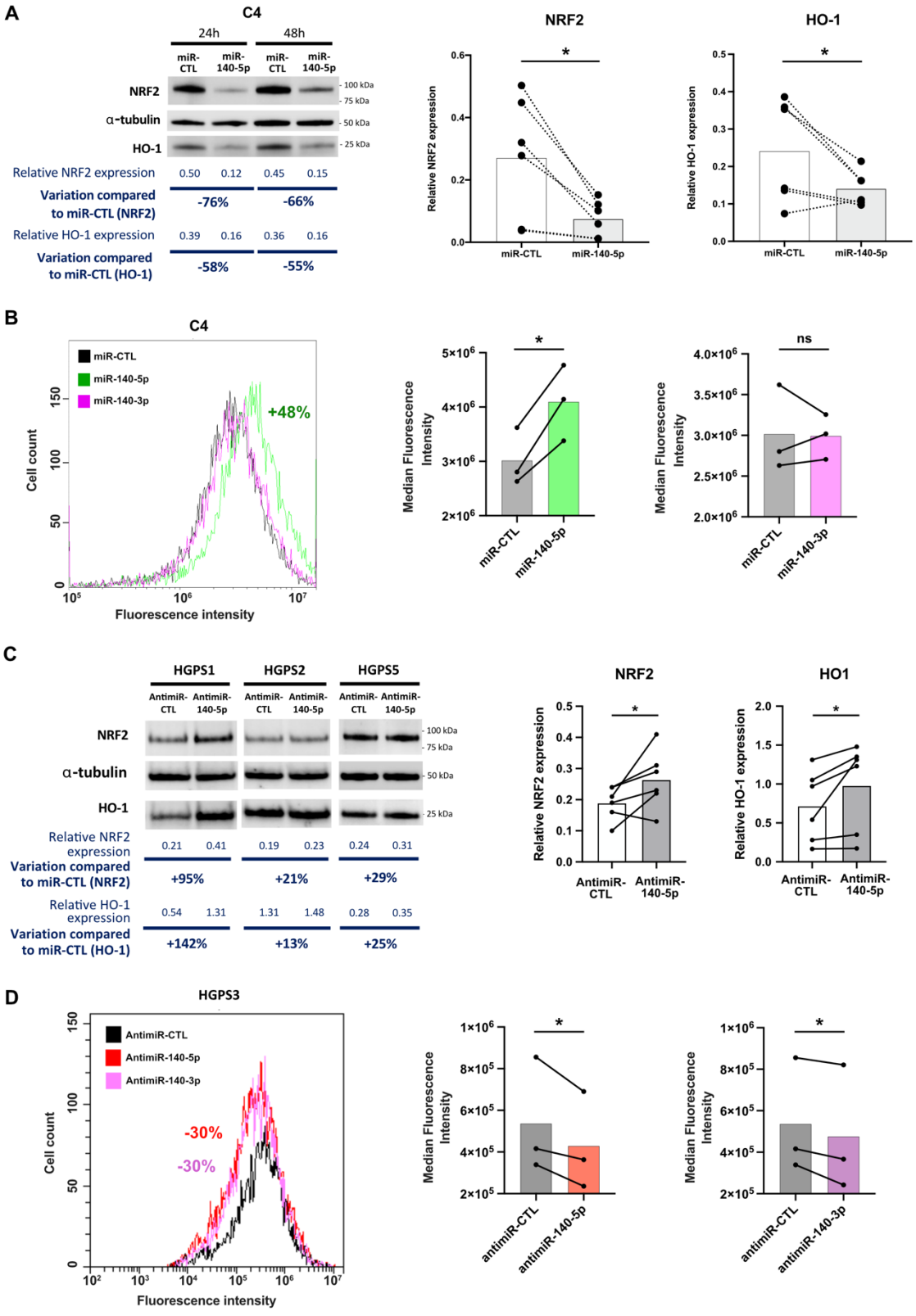


Figure 4: miR-140-5p overexpression represses the NRF2/KEAP1/HO-1 pathway. (A) Representative Western blot of whole-cell lysates from control (C4) fibroblasts after miR-140-5p transfection compared to miR-control (miR-CTL) at 24 and 48 hours. Immunodetection of NRF2, HO-1, and α-tubulin. Relative expression, corresponding to the ratio of NRF2 or HO-1

expression to α-tubulin expression, are shown. The first graph at right summarizes relative NRF2 protein levels for each condition (miR-140-5p or miR-CTL) at 24h and 48h post transfection, with the average indicated by the bars (Wilcoxon test, n=6, *p≤ 0.05)**.** The second graph at right represents relative HO-1 protein levels with or without miR-140-5p transfection, with the average indicated by the bars (one-tailed Wilcoxon test, n=6, *p≤ 0.05). **(B)** Representative flow cytometry graph showing the effect of miR-140-5p, miR-140-3p, or miR-CTL transfection on ROS levels in control (C4) fibroblasts, measured using DCF-DA. Histograms show cell count (y-axis) and fluorescence intensity (x-axis). The graph on the right compares the median fluorescence intensity (MFI) for each condition. Violin plots show the distribution of MFI across samples (paired t-test, ns: not significant, *p≤ 0.05, n = 3 per condition)**. (C)** Western blot analysis shows NRF2, HO-1, and α-tubulin protein levels in HGPS (HGPS1, HGPS2 and HGPS5) fibroblasts after transfection with antimiR-140-5p (inhibits miR-140-5p) or antimiR-control (antimiR-CTL) at 48 hours. The graphs summarize relative protein levels (NRF2 and HO-1) for each condition (antimiR-140-5p or antimiR-CTL), with the average indicated by the bars (n = 3 cell lines with 2 times post-transfection, Wilcoxon test). **(D)** Representative flow cytometry graph showing the effect of antimiR-140-5p, antimiR-140-3p or antimiR-CTL transfection on ROS levels in HGPS (HGPS3) fibroblasts, measured using DCF-DA. Histograms show cell count (y-axis) and fluorescence intensity (x-axis). The graph on the right compares the median fluorescence intensity (MFI) for each condition. Violin plots show the distribution of MFI across samples (*p≤ 0.05, paired t-test, one tailed, n = 3 per condition).

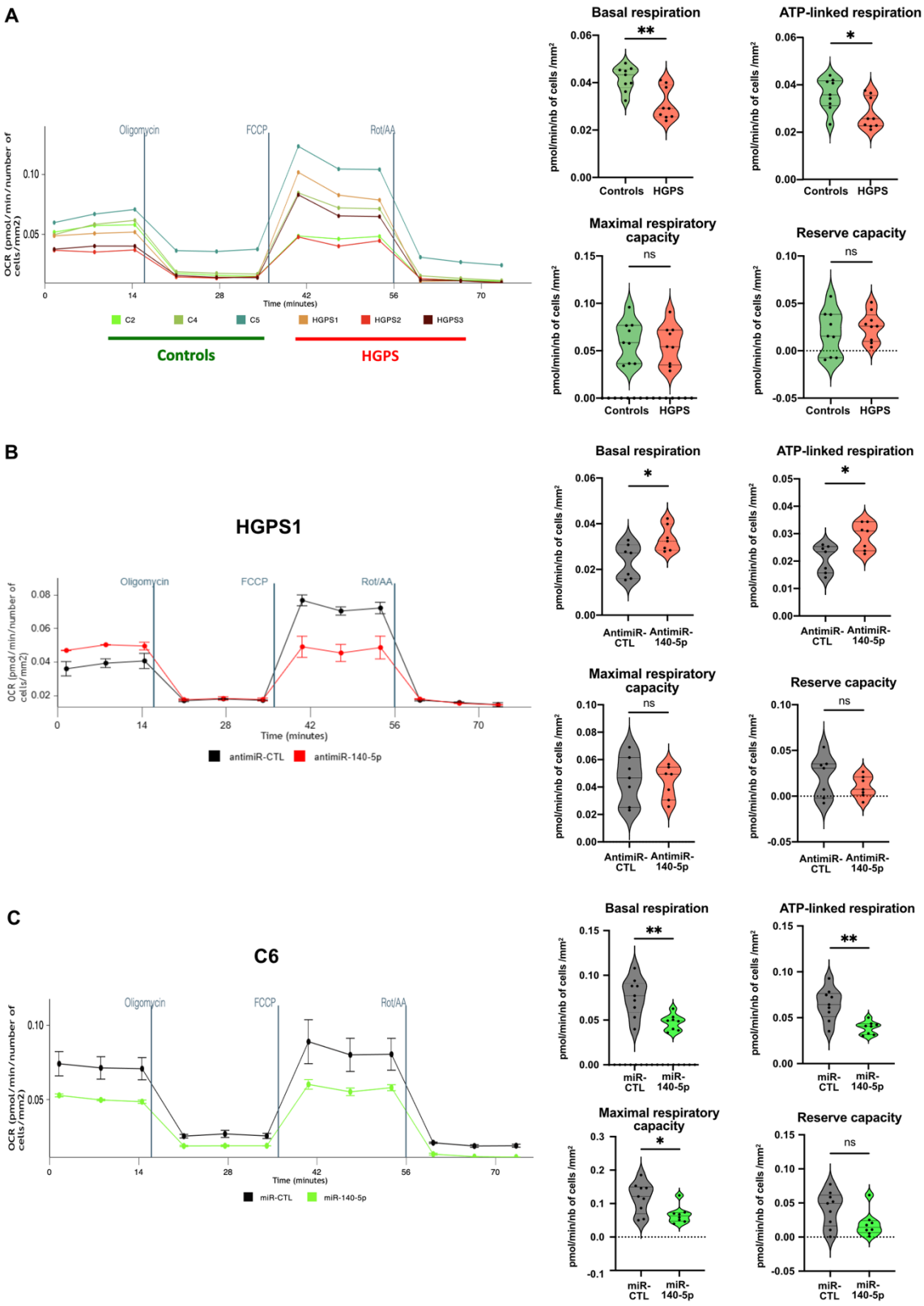


Figure 5: miR-140-5p overexpression leads to mitochondrial dysfunction in HGPS fibroblasts. **(A)** Seahorse assay comparing OCR levels between control (C2, C4 and C5) and HGPS (HGPS1, HGPS2 and HGPS3) fibroblasts. The graphs on the right compare basal respiration, ATP-linked respiration, maximal respiratory capacity and reserve capacity. Violin plots show the

distribution of OCR across samples (unpaired t-test and Mann-Whitney test, ns: not significant, *p≤ 0.05, **p< 0.01, 3 repeated OCR were measured per condition)**. (B)** Representative Seahorse assay showing the effect of antimiR-140-5p transfection at 48 hours on OCR measurement in HGPS fibroblasts (HGPS1). The graphs on the right compare basal respiration, ATP-liked respiration, maximal respiratory capacity and reserve capacity. Violin plots show the distribution of OCR across samples (Mann-Whitney test, ns: not significant, *p≤ 0.05, n=3 cell lines (HGPS1, HGPS3 and HGPS5), n=2 or 3 experiments per condition)**. (C)** Representative Seahorse assay showing the effect of miR-140-5p transfection at 48 hours on OCR measurement in control fibroblasts (C6). The graphs on the right compare basal respiration, ATP-liked respiration, maximal respiratory capacity and reserve capacity. Violin plots show the distribution of OCR across samples (unpaired t-test or Mann-Whitney test, ns: not significant, *p≤ 0.05, **p< 0.01, n= 3 experiments per condition).

miR-140-5p overexpression contributes to oxidative stress and mitochondrial dysfunction in Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome fibroblasts through NRF2 pathway

Léa Toury, Diane Frankel, Sara Nael, Coraline Airault, Elva-María Novoa-del-Toro, Catherine Bartoli, Mario Abaji, Anaïs Baudot, Frederique Magdinier, Elise Kaspi¶, Patrice Roll¶

Supplementary data

Supplemental Methods

Supplemental Table and Figures

Supplemental Methods

Culture of human fibroblasts

Fibroblasts were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium low glucose (VWR, Radnor, Pennsylvania, USA) with the addition of 15% fetal bovine serum (FBS) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), 2 mM L-glutamine (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), and a mixture of 100 U/mL penicillin, streptomycin (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO_2. For western blot experiments to study NRF2 pathway, fibroblasts were incubated with 10 µM MG132 for 6 hours before protein extraction. Fibroblast pellets selected for miRNA expression studies were stored at −80 °C until analyses.

Primary culture of mouse VSMCs

Knock-in mouse model *Lmna*$^{G609G/G609G}$ carrying the c.1827C>T (p.Gly609Gly) mutation (Osorio et al., 2011) and wild-type mice were used for the study.

Isolation and primary culture of mouse VSMCs were prepared as previously described (Cardoso et al. 2024). Briefly, VSMCs were extracted from thoracic aorta of one-month *Lmna*$^{G609G/G609G}$ mice (n=6) and wild-type mice (n=4). To have enough VSMC to start the culture, 2 aortas from 2 mice of the same littermate were pooled into the HBSS in 15 ml conical in a cool place. After incubation at 37°C for 8-10 minutes with enzyme solution containing collagenase, soybean trypsin inhibitor, elastase, 1% penicillin/streptomycin and HBSS, aortas were washed with DMEM/F12 (Gibco) media before removing endothelial cell layer. Aortas were opened longitudinally to remove any blood clots and endothelial cell layer and incubated at 37°C in 5% CO_2 for about an hour within enzyme solution. After digestion, the digested tissue was triturate by shredding, wash with DMEM/F12 media and centrifuge 3 times. After centrifugation, VSMCs were cultured on 2 wells of a 24 wells dish DMEM/F12 media supplemented with FBS (10%) and penicillin/streptomycin (1%). Primary VSMC pellets of each cell line were prepared at passage 8 were stored at −80 °C until miRNA expression studies.

RNA extraction for quantitative RT-PCR

Total RNA was extracted from dermal fibroblasts or murine VSMCs using the miRNeasy kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. As low amounts of RNAs were expected after cells selection by FACS, MS2 RNA bacteriophage (Sigma) was added as an RNA carrier in order to avoid miRNAs loss during RNA isolation (Ramón-Núñez et al. 2017).

Samples were quantified by absorbance using a NanoDrop DN-1000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

Protein extraction and quantification for Western blot analysis

Total fibroblast proteins were extracted using a lysis buffer containing 62.5 mM Tris-HCl, 2.3% SDS, 10% glycerol, and 1 mM PMSF, followed by sonication three times for 30 seconds each. Nuclear and cytoplasmic fractions of proteins were obtained using NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Kit according to the manufacturer protocol (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). After collection of each fraction, extracts were rapidly store at -80°C until use.

Protein concentration was determined using the Pierce™ BCA Protein Assay Kit according to the manufacturer's instructions (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Absorbance was measured with a UV-Visible Absorbance Module (540–590 nm bandpass) on a GloMax® Microplate Reader (Promega, Madison, WI, USA).

miRNA Expression Analysis by Next Generation Sequencing

Total RNA extractions, quality controls and miRNA sequencing have been sub-contracted to Integragen (Evry, Paris, France). Briefly, cell pellets containing 4 to 5 million fibroblasts were shipped to Integragen on dry ice. Total RNAs were extracted using the miRNeasy mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. RNA integrity was assessed using an Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technology, Santa Clara, CA, USA). All samples showed a high quality and integrity (RNA integrity number (RIN) > 7) and were selected for NGS. Library was next prepared for sequencing. NGS was performed on Illumina HiSeq™4000, with one flow cell per pooled library and with a read length of 42 base pairs per read, including a 6 base pair index sequence, and a data yield of approximately 8-12 million reads per sample. The raw sequencing data were processed to remove adapter sequences and demultiplexed to separate individual samples. Raw reads were checked for potential sequencing issues and contaminants using FastQC. The clean reads were aligned against the mature miRNA in miRBase20.0 (http://www.mirbase.org/) to identify known miRNAs. The read counts of each known miRNA were then normalized to the total counts of sequence reads mapped to the miRBase version 20.0 database to obtain reads per million mapped reads (RPM). This data has been processed by statistical analysis comparing the control group (n=3) to the HGPS group (n=5).

Western blot analysis

Total fibroblast proteins were extracted using a lysis buffer containing 62.5 mM Tris-HCl, 2.3% SDS, 10% glycerol, and 1 mM PMSF, followed by sonication three times for 30 seconds each. Nuclear and cytoplasmic fractions of proteins were obtained using NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Kit according to the manufacturer protocol (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). After collection of each fraction, extracts were rapidly store at -80°C until use.

Protein concentration was determined using the Pierce™ BCA Protein Assay Kit according to the manufacturer's instructions (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Absorbance was measured with a UV-Visible Absorbance Module (540–590 nm bandpass) on a GloMax® Microplate Reader (Promega, Madison, WI, USA).

Equal amounts of protein (40 µg) were reduced at 95°C for 5 minutes with NuPAGE Reducing Agent (NP0009, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and loaded into 8% Bis-Tris gels (NuPAGE™ precast gel, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) using NuPAGE™ MES SDS Running Buffer (NP0002, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). After electrophoresis, proteins were transferred to Immobilon-FL PVDF membranes (IPFL00010, Millipore, Burlington, MA, USA).

ECL revelation: Membranes were blocked in 5% nonfat dry milk diluted 1:1 in PBS for 1 hour at room temperature, then incubated overnight at 4°C with primary antibodies diluted in TBS (50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7.6) with 0.1% Tween 20 (Bio-Rad) (TBS-T buffer).

Blots were washed with TBS-T buffer and incubated with secondary antibodies: anti-Mouse IgG HRP-linked Antibody (7076S, Cell Signaling Technology, Leiden, The Netherlands) or anti-Rabbit IgG HRP-linked Antibody (7074S, Cell Signaling Technology, Leiden, The Netherlands) at 1:3,000 dilution and Precision Protein™ StrepTactin-HRP Conjugate at 1:10,000 dilution in TBS-T buffer for 1 hour at room temperature.

Fluorescence revelation: Membranes were blocked for one hour in 1:2 blocking buffer for near-infrared fluorescent Western blotting (Rockland, Limerick, PA, USA). The blocked membranes were incubated overnight at 4°C with primary antibodies and then washed and incubated with IR-Dye®800CW-conjugated or IR-Dye®680RD-conjugated secondary donkey anti-rabbit or anti-mouse antibodies (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, USA) diluted 1:15,000 in blocking buffer with 0.05% Tween 20 and 0.01% SDS.

The primary antibodies used were: anti-lamin A/C (1:2,000, 10298-1-AP, Proteintech, Manchester, UK), anti-Progerin (1/50, sc-81611, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), anti-NRF2 (1:2000, 80593-1-RR, Proteintech, Manchester, UK), anti-HO-1 (1:1,000, 66743-1-Ig, Proteintech, Manchester, UK), anti-KEAP1 (1:2,000, 10503-2-AP, Proteintech, Manchester, UK), anti-α-tubulin (1:4,000, T6199, Sigma Aldrich) and anti-GAPDH (1:40,000, MAB374, Millipore Millipore, Burlington, MA, USA).

All blots were imaged using a ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad), and bands were quantified using Image Lab Software (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). GAPDH or α-tubulin was used as a total cellular protein loading control.

Seahorse Assay

Oxygen consumption rate (OCR) was measured to assess mitochondrial function. By sequentially adding specific inhibitors, we determined following respiratory parameters:

Basal respiration was derived by subtracting non-mitochondrial respiration (OCR measured after Rot/AA addition) to basal OCR. ATP-linked respiration was calculated by subtracting OCR following oligomycin from basal OCR. The maximal respiratory capacity corresponded to OCR following FCCP injection with the deduction of non-mitochondrial respiration. At last, reserve

capacity, also called mitochondrial spare respiratory capacity was calculated by subtracting basal OCR to OCR post FCCP injection (Rose et al. 2014).

ECAR is the reflect of glycolysis and was concomitantly measured with OCR. ECAR rate before oligomycin injection corresponds to basal ECAR, and glycolytic reserve capacity was evaluated by subtracting basal ECAR to ECAR following oligomycin injection (Rose et al. 2014).

In order to normalize OCR and ECAR according to cell counts, cells were immediately fixed with 4% PFA after Seahorse measurements and cell nuclei stained by Hoechst dye (final concentration 150 ng/mL, diluted in PBS (Phosphate Buffer Saline). Images of whole wells were acquired by Zeiss Axio Observer.Z1/7 inverted microscope (Oberkochen, Germany). Nuclei were segmented using StarDist algorithm, and the resulting segmentations were analyzed in QuPath to quantify cell counts for each well.

Supplemental Table and Figures

Table S1: Identification and source of primary fibroblasts.

Figure S1: Selection of HGPS fibroblasts for miRNA-seq based on progerin expression.

Figure S2: miRNA candidate selection pipeline.

Figure S3: Selection of miR-140-5p and miR-140-3p and correlation of their expression with senescence.

Figure S4: Potential impact of miR-140-5p overexpression on KEAP1, NRF2, and HO-1.

Figure S5: Nuclear NRF2 loss in HGPS fibroblasts with high progerin accumulation.

Figure S6: miR-140-5p modulation induces NRF2 variations in control (mimics) and HGPS (antimiR-140-5p) fibroblasts.

Figure S7: miR-140-5p overexpression leads to glycolysis modification in HGPS fibroblasts.

Figure S8: A schematic representation of miR-140-5p and miR-140-3p target genes and their potential involvement in cellular processes relevant to the HGPS phenotype.

Figure S9: Illustration of the different analysis steps of sorted fibroblasts for progerin and NRF2 expression using IMARIS software.

	Patients								Controls							
Phenotype	**HGPS**							**HGPS-like**	**Wild-type**							
ID	**HGPS1**	**HGPS2**	**HGPS3**	**HGPS4**	**HGPS5**	**HGPS6**	**HGPS7**	**HGPS-L**	**C1**	**C2**	**C3**	**C4**	**C5**	**C6**	**C7**	**C8**
Corresponding name	13-8243	13-5968	AG 11498	AG 01972	AG 11513	AG 03199	13-13622	13-15288	HFF-1	AG 08498	13-10742	AG 07095	13-13090	AG 05966	GM 08398	AG 08471
***LMNA* genotype**	c.1824C>T p.G608G	c.1824C>T p.G608G	c.1824C>T p.G608G	c.1824C>T p.G608G	c.1824C>T p.G608G	c.1824C>T p.G608G	c.1824C>T p.G608G	c.1968+1 G>A	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
miRNA-Seq (passage)	Yes *(P10)*	Yes *(P13)*	Yes *(P17)*	Yes *(P20)*	No	No	No	Yes *(P13)*	Yes *(P12)*	Yes *(P17)*	Yes *(P7)*	No	No	No	No	No
Age at collection (years)	2	5	14	14	8	10	2	6	< 1	1	82	2	7	12	8	NA
Sex	Female	Female	Male	Female	Female	Female	Male	Female	Male	Male	Female	Male	Male	Male	Male	Male
Source	CRB	CRB	Coriell	Coriell	Coriell	Coriell	Coriell	CRB	ATCC	Coriell	CRB	Coriell	CRB	Coriell	Coriell	Coriell

WT: wild-type

Table S1: Identification and source of primary fibroblasts. This table provides details about the origin of the fibroblast cells used in the study. All HGPS patients carry a specific mutation in the *LMNA* gene (c.1824C>T, p.Gly608Gly), while the HGPS-like patient has a different mutation (c.1968+1G>A) that also leads to progerin production. RefSeq: NM_170707.4. *Homo sapiens* lamin A/C *(LMNA)*, transcript variant 1, mRNA. Coriell: Coriell Institute for Medical Research (https://www.coriell.org/). NA: not available.

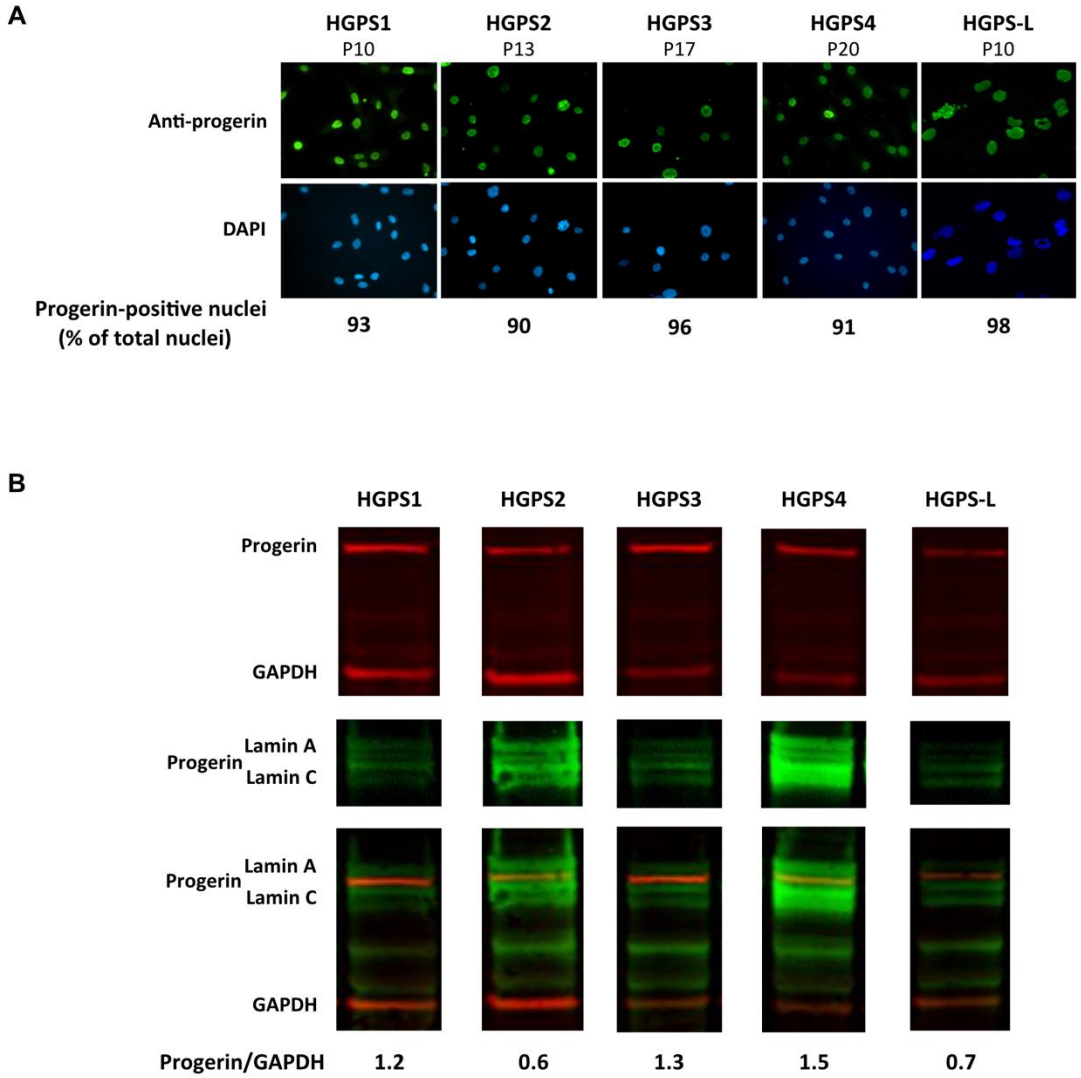


Figure S1: Selection of HGPS fibroblasts for miRNA-seq based on progerin expression. (A) Representative immunofluorescence images of HGPS (n=4, HGPS1, HGPS2, HGPS3 and HGPS4) and HGPS-like (HGPS-L) fibroblasts stained with progerin antibody (green) and counterstained with DAPI (blue). Corresponding passages are indicated for each cell line. Percentage of progerin-positive nuclei compared to total nuclei are indicated for each cell line. **(B)** Western blot analysis of whole-cell lysates from HGPS/HGPS-like fibroblasts. Detection of lamin A/C, progerin, and GAPDH. Relative progerin expression is indicated for each cell line.

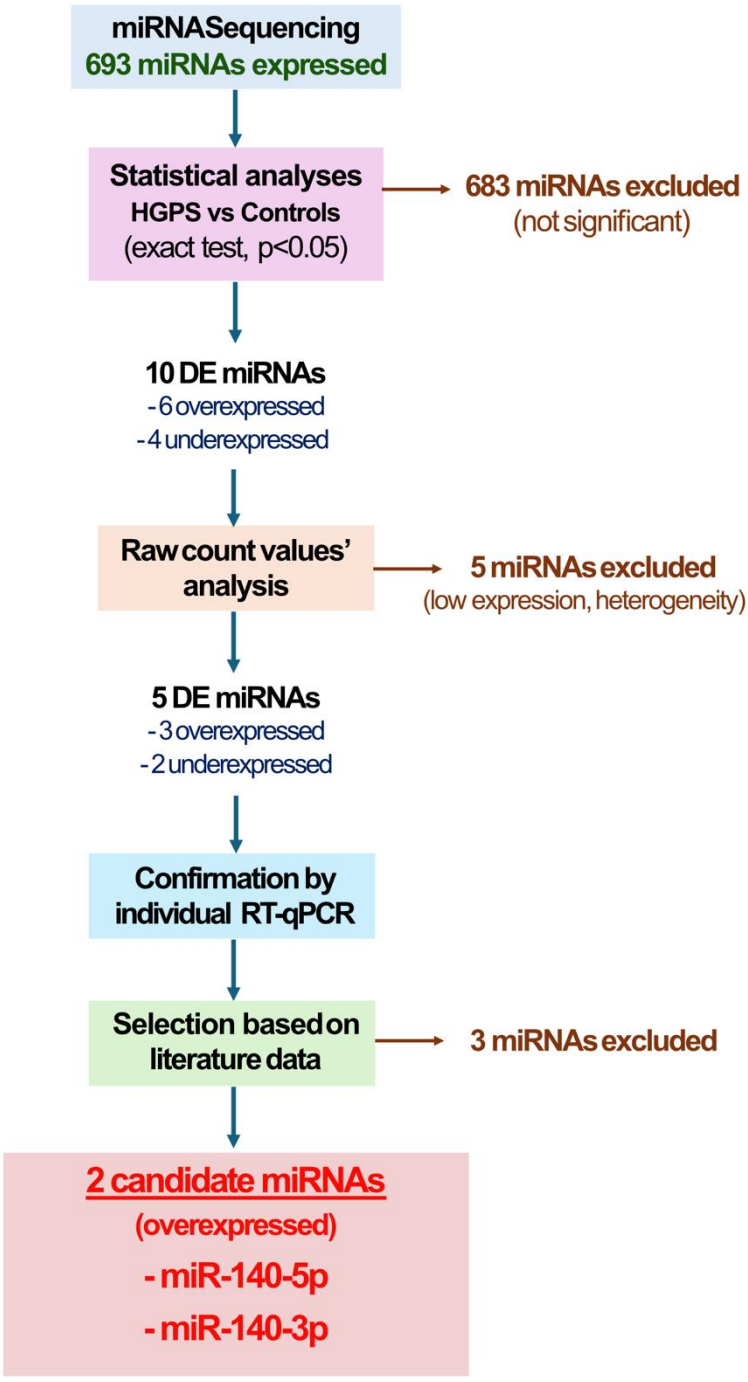


Figure S2: miRNA candidate selection pipeline. A flowchart illustrating the steps involved in selecting candidate miRNAs. Key steps include: 1) Statistical analysis to identify differentially expressed (DE) miRNAs; 2) Filtering based on expression level and homogeneity; 3) RT-qPCR validation; 4) Final selection based on literature and relevance to HGPS. miR-140-5p and miR-140-3p were finally selected after these 4 steps.

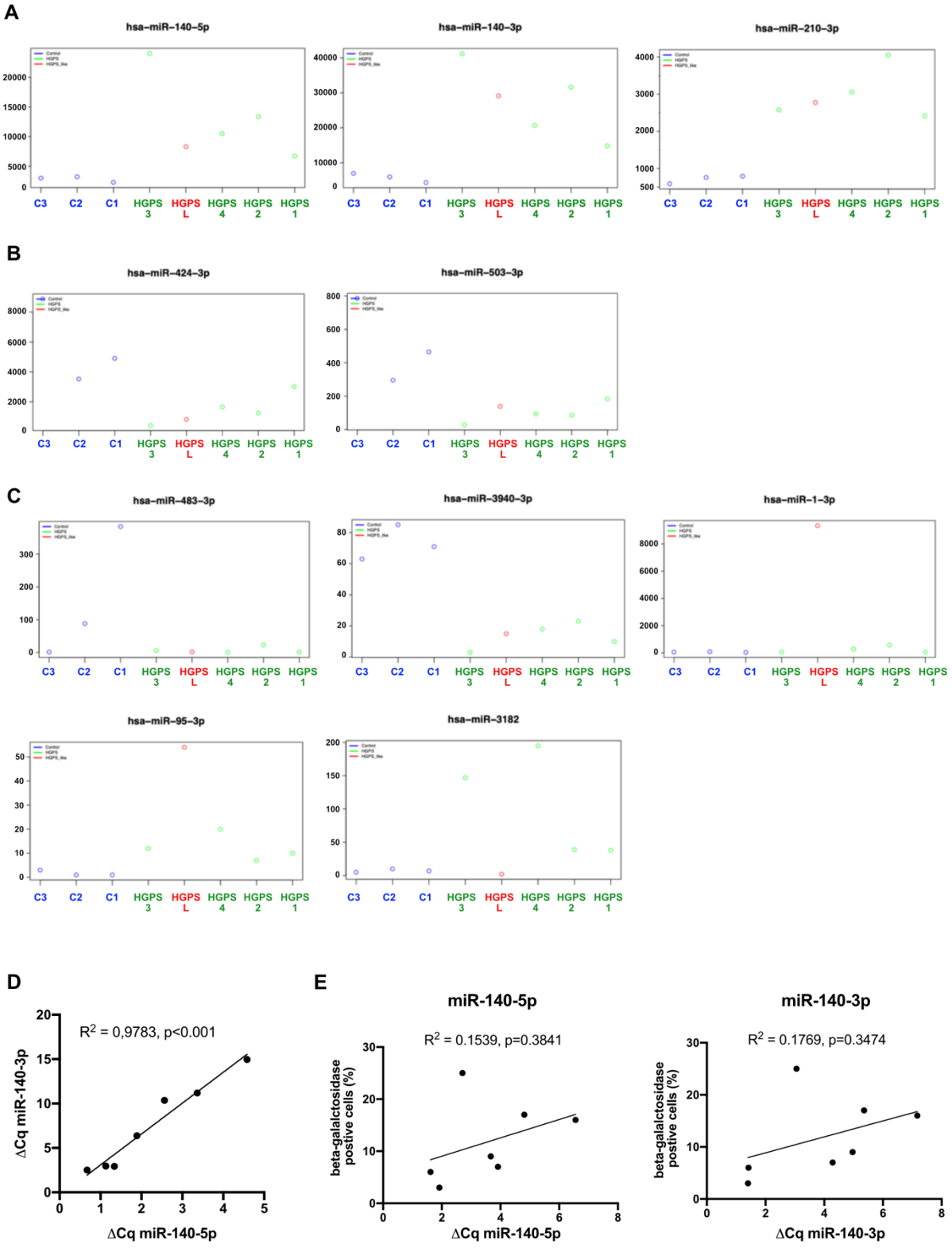


Figure S3: Selection of miR-140-5p and miR-140-3p and correlation of their expression with senescence. (A-C) Raw count plots of differentially expressed miRNAs. miRNAs were selected based on expression level (>200 counts) and homogeneity within groups (control and HGPS/HGPS-like). **(A)** Selected upregulated miRNAs in HGPS fibroblasts (n=3). **(B)** Selected downregulated miRNAs in HGPS fibroblasts (n=2). **(C)** miRNAs excluded for the next step. **(D)**

Correlation graph between miR-140-5p and miR-140-3p expression (ΔCq values) (n=7). Pearson correlation coefficient (R^2) and p-value are shown. **(E)** Correlation graphs between miR-140-5p or miR-140-3p expression (ΔCq values) and senescence (percentage of β-galactosidase-positive cells). Pearson correlation coefficient (R^2) and p-value are shown.

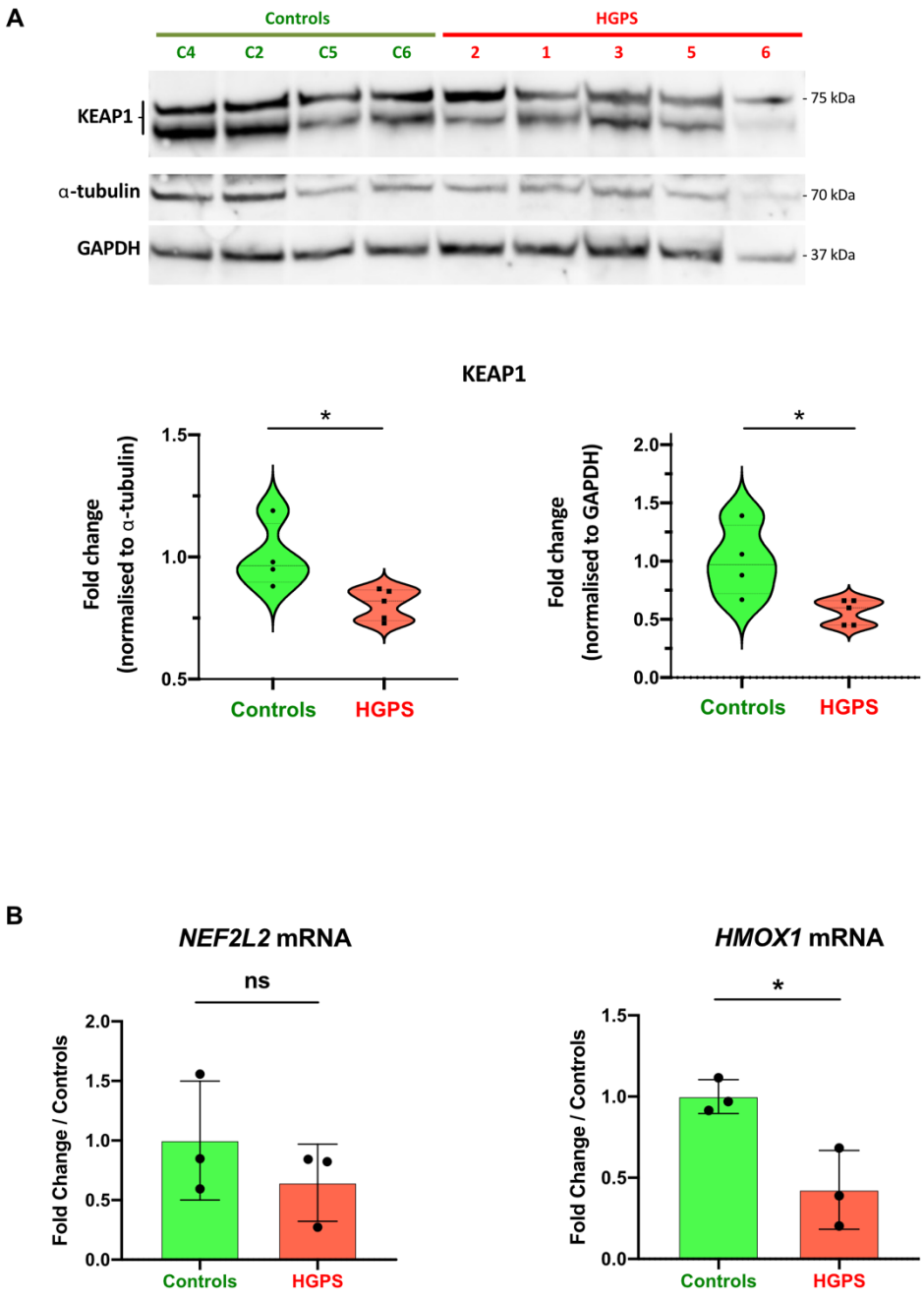


Figure S4: Potential impact of miR-140-5p overexpression on KEAP1, NRF2, and HO-1. (A) Western blot analysis of whole-cell lysates from controls and HGPS fibroblasts. Detection of KEAP1, α-tubulin, and GAPDH. Statistical analysis shows the fold change of KEAP1 expression in HGPS (n=5) compared to controls (n=4) after normalization (Mann-Whitney test, ∗p≤ 0.05). **(B)** *NEFL2* mRNA and *HMOX1* mRNA expression quantified by RT-qPCR in HGPS (n=3) compared to controls (n=3) (Mann-Whitney test, one-tailed; ns: not significant, ∗p≤0.05).

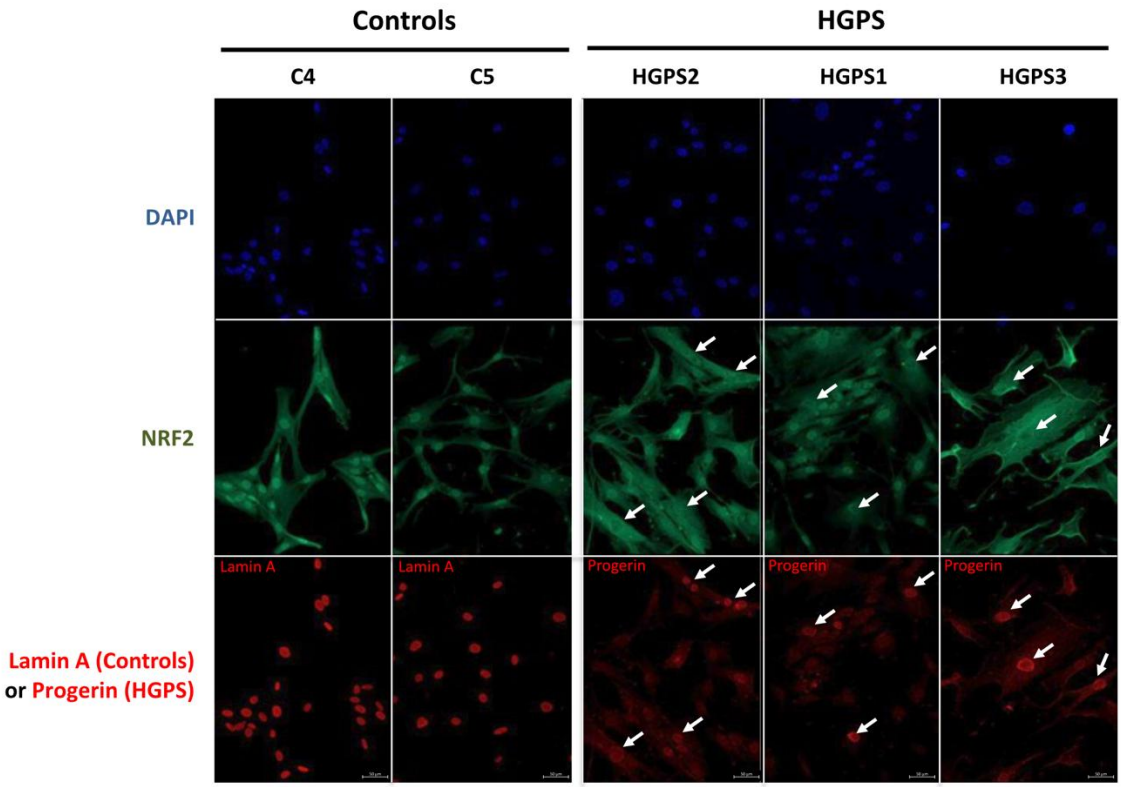


Figure S5: Nuclear NRF2 loss in HGPS fibroblasts with high progerin accumulation. Representative immunofluorescence images of control (C4 and C5) and HGPS fibroblasts (HGPS1, HGPS2 and HGPS3) stained for NRF2 and lamin A/C (control) or progerin (HGPS) and DAPI. Arrows indicate nuclei expressing progerin but not NRF2. Scale bar = 50 µm.

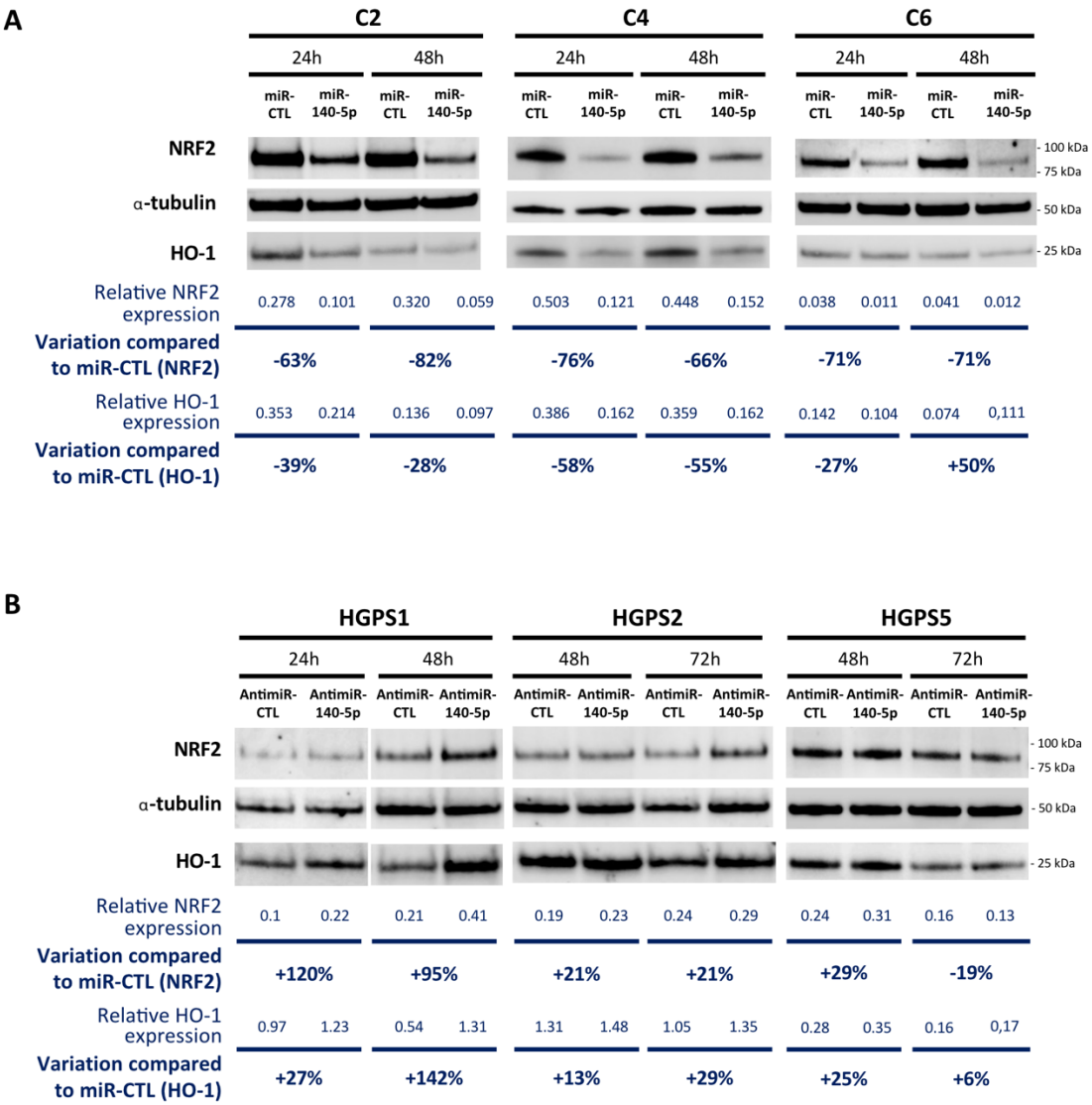


Figure S6: miR-140-5p modulation induces NRF2 variations in control (mimics) and HGPS (antimiR-140-5p) fibroblasts. (A) Western blot analysis of whole-cell lysates from 3 control cell lines (C2, C4, C6) after miR-140-5p or miR-CTL transfection at 24 and 48 hours. Detection of NRF2, HO-1, and α-tubulin protein levels. **(B)** Western blot analysis of whole-cell lysates from fibroblasts of 3 HGPS patients (HGPS1, HGPS2, HGPS5) after antimiR-140-5p or antimiR-CTL transfection at 24, 48 or 72 hours. Detection of NRF2, HO-1, and α-tubulin protein levels.

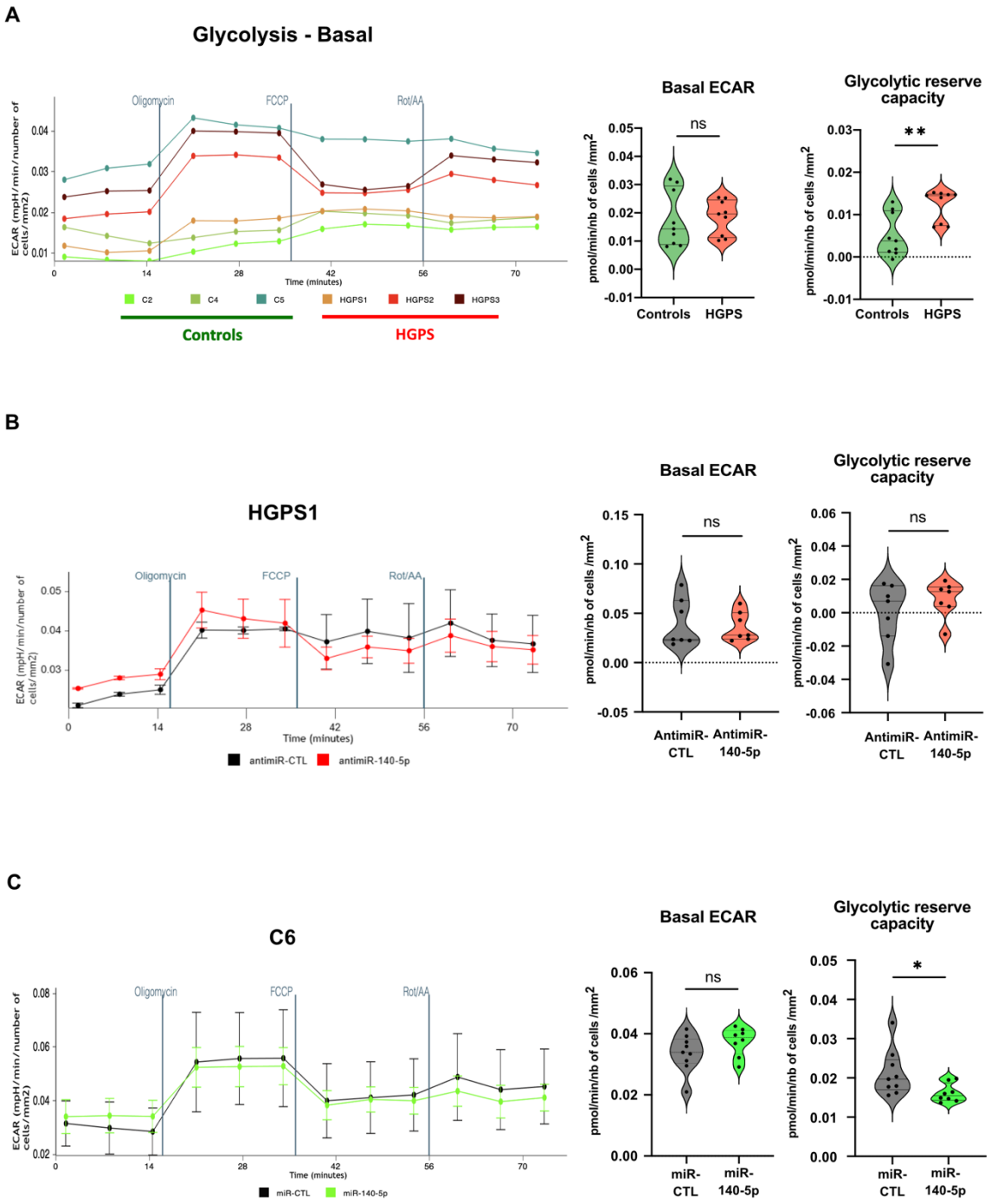


Figure S7: miR-140-5p overexpression leads to glycolysis modification in HGPS fibroblasts. **(A)** Seahorse assay comparing ECAR levels between control (C2, C4 and C5) and HGPS (HGPS1, HGPS2 and HGPS3) fibroblasts. The graphs on the right compare basal ECAR and glycolytic reserve capacity. Violin plots show the distribution of ECAR across samples (unpaired t-test or Mann-Whitney test; ns: not significant, ∗p≤ 0.05, **p < 0.01, 3 repeated ECAR were measured per condition)**. (B)** Representative Seahorse assay showing the effect antimiR-140-5p transfection on ECAR measurement in HGPS cells (HGPS1). The graphs on the right compare basal ECAR and glycolytic reserve capacity. Violin plots show the distribution of ECAR across

samples (Mann-Whitney test; ns: not significant, n=3 cell lines (HGPS1, HGPS3 and HGPS5), n=2 or 3 experiments per condition)**. (C)** Representative Seahorse assay showing the effect of antimiR-140-5p transfection on ECAR measurement in control cells (C6). The graphs on the right compare basal ECAR and glycolytic reserve capacity. Violin plots show the distribution of ECAR across samples (unpaired t-test or Mann-Whitney test, ns: not significant, *$p \leq 0.05$, n= 3 experiments per condition)**.**

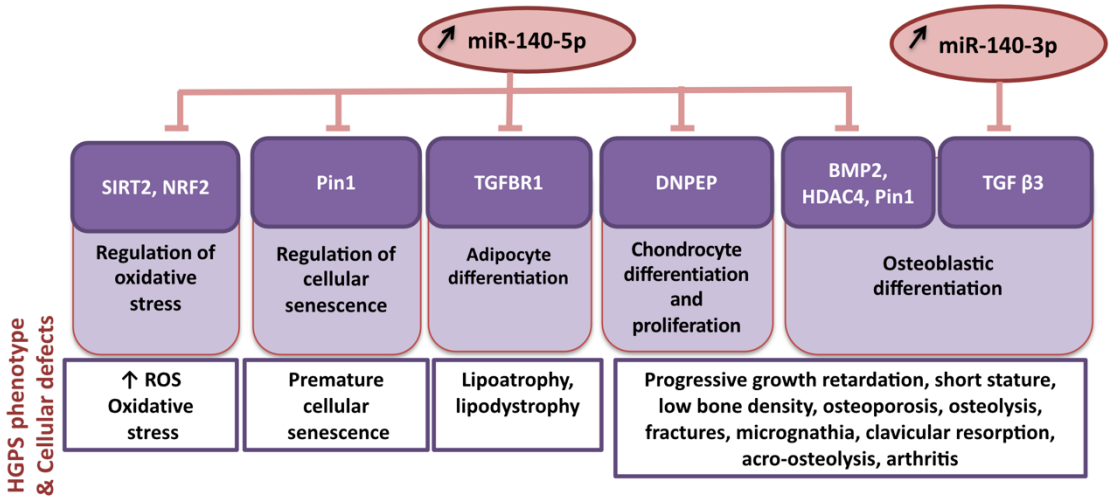


Figure S8: A schematic representation of miR-140-5p and miR-140-3p target genes and their potential involvement in cellular processes relevant to the HGPS phenotype. Proteins corresponding to mRNA targets (top), potentially affected cellular mechanisms and relation with phenotype (bottom) are indicated.

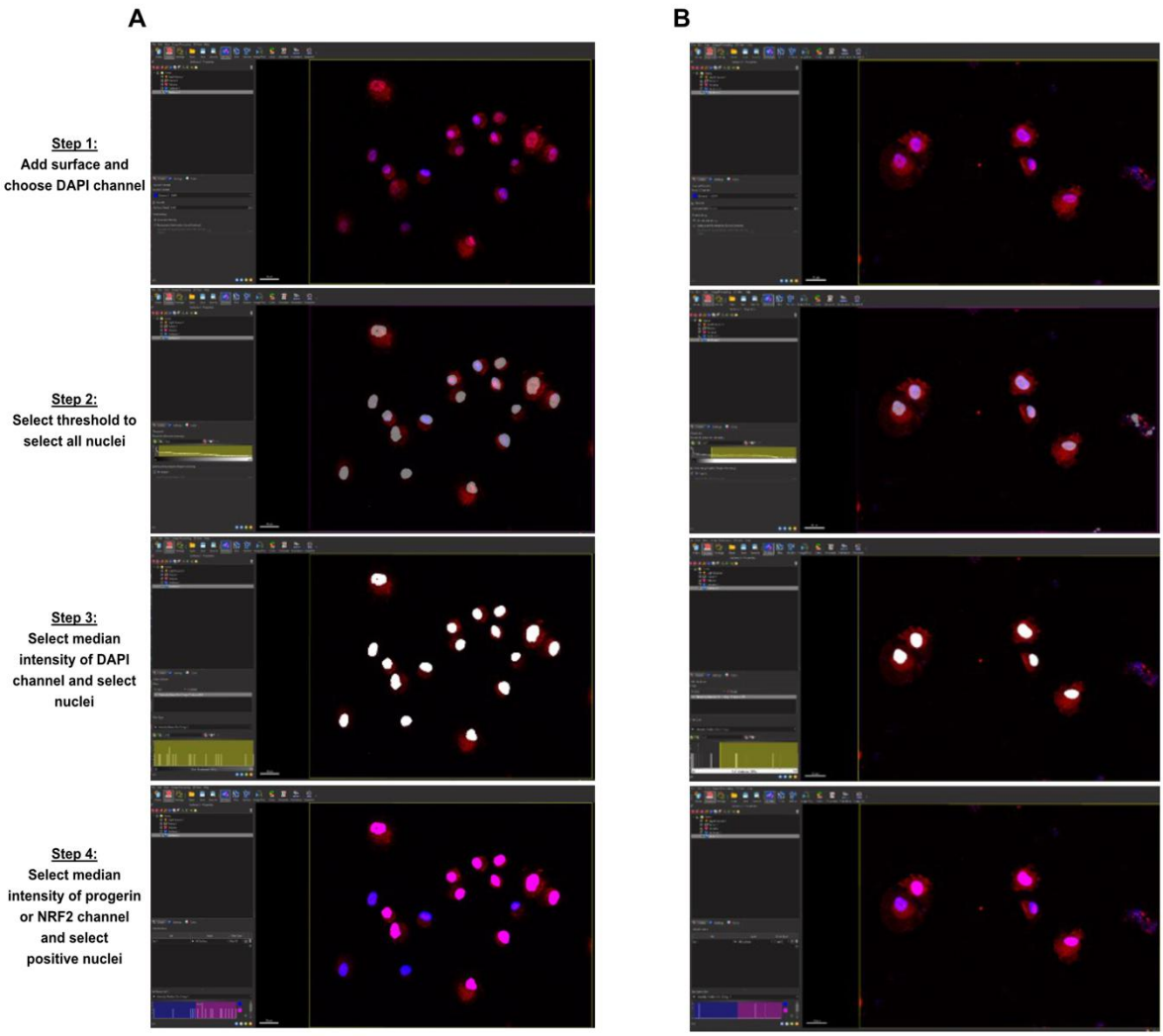


Figure S9: Illustration of the different analysis steps of sorted fibroblasts for progerin and NRF2 expression using IMARIS software. Nuclei were selected using the DAPI channel. Positive or negative nuclei for progerin or NRF2 were determined according to their median intensity.

3.2. Mise en place de modèles cellulaires à partir d'hiPSc de patients pour l'étude des altérations osseuses dans la Progeria de Hutchinson-Gilford

Comme mentionné précédemment **(voir Article 1. miR-140 et vieillissement)** , les miR-140 sont impliqués dans la différenciation ostéoblastique et chondrogénique en ciblant des ARNm de protéines clés impliquées dans ces processus, tels que BMP2 (Gan et al., 2016), HDAC4 (Papaioannou et al., 2015; Yao et al., 2023), DNPEP (Nakamura et al., 2011) et TGF-β3 (Mahboudi, Soleimani, Enderami, et al., 2018; Mahboudi, Soleimani, Hanaee-Ahvaz, et al., 2018). Ces voies moléculaires étant perturbées dans la Progeria, nous avons développé des modèles cellulaires d'ostéoblastes et de chondrocytes à partir d'hiPSc de patients HGPS afin d'étudier la contribution des miR-140 dans ces processus.

Matériel et méthodes (différenciation des iPSc en MSCs)

Les hiPSc de patients ont été générées par la plateforme de l'unité MMG (plateforme MaSC, Marseille Stem Cell), ou ont été obtenues via le Coriell Institute for Medical Research ou transmises par l'équipe du Dr Xavier Nissan (I-Stem, Evry). Ces cellules ont été cultivées sur du matrigel dans du milieu mTeSR1 changé tous les jours (Stemcell Technologies, Vancouver, Canada) pendant 3 passages à 37°C en atmosphère humide avec 5% de CO_2, avant d'être différenciée en MSCs. La différenciation en MSCs a été réalisée sur poly-D-lysine (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA) et sur fibronectine (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA). Le premier jour, les cellules ont été cultivées en mTeSR1 et le deuxième jour dans 50% de mTeSR1 et 50% de milieu MSC (KO-DMEM [Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA], 10% SVF [Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA], 1% Glutamax [Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA], 1% NEAA [Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA], 1% Pénicilline/Streptomycine [Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA], 0,01% β-Mercapto-Ethanol [Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA], 5µM final de Thiazovivin [Merck Chemicals, Darmstadt, Germany], 10 ng/mL de FGF2 [Peprotech, Cranbury, NJ, USA] et 1mM d'Acide ascorbisque-2-phosphate [Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA]). Le troisième jour, les cellules ont été cultivées dans 100% de milieu MSC, puis le milieu a été changé 3 fois par semaine. Les cellules ont été cultivées à 37°C dans une atmosphère humide avec 5% de CO_2 jusqu'à leur caractérisation. Celle-ci a été réalisée par cytométrie en flux sur un cytomètre BD Accuri™ C6 (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA). Nous avons vérifié le profil suivant confirmant la différenciation en MSCs : CD73+ (eBiosciences, San Diego, CA, USA), CD105+ (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), CD90+ (BD Pharmigen, San Diego, CA, USA), CD34- (BD Pharmigen, San Diego, CA, USA) et CD45- (BD Pharmigen, San Diego, CA, USA) **(Figure 24)**. Ces MSCs ont été par la suite utilisées pour la différenciation en chondrocytes ou en ostéoblastes.

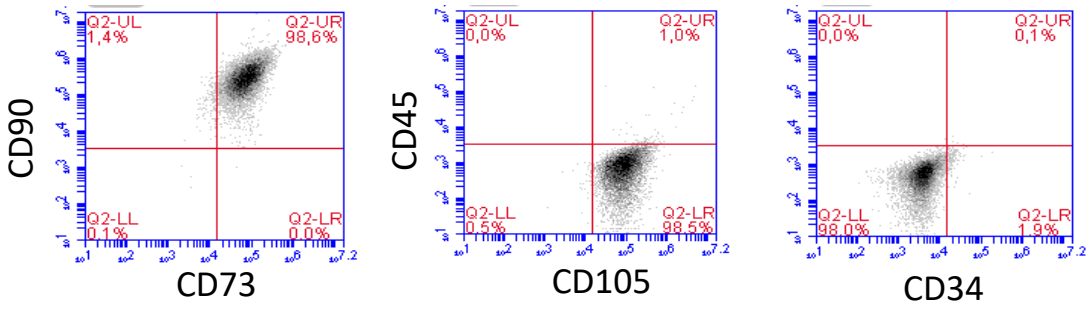


Figure 24 : Confirmation du phénotype des MSCs (CD70+, CD90+, CD105 +, CD45-, CD34-) par cytométrie en flux

3.2.1. Différenciation chondrocytaire

Matériel et méthodes

La différenciation chondrocytaire a été effectuée en suspension dans des tubes à fond conique de 15 mL pour permettre la formation d'agrégats.

Les MSCs ont été détachées à l'aide d'accutase et 5 millions de MSCs ont transférées dans un tube de 15 mL à fond conique. Le tube a été centrifugé 3 minutes à 250g, le surnageant a été retiré et les cellules ont été cultivées à 37°C en atmosphère humide avec 5% de CO_2 en milieu de différenciation : DMEM low glucose (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), 0,1 µM de Dexamethasone (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA), 0,17mM d'Acide ascorbisque-2-phosphate (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA), 1% de ITS+sélénium (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) et 100 ng/mL de BMP2 (Peprotech, Cranbury, NJ, USA). Le bouchon du tube de 15 mL a été laissé desserré pour que l'air puisse circuler. Le milieu a été changé 3 fois par semaine. Les cellules ont été recueillies au jour 0 et 21 de la différenciation pour coloration et analyses par Western Blot et RT-qPCR afin d'analyser l'évolution les marqueurs d'expression chondroblastiques et les cibles d'intérêt des miR-140.

Ce travail m'a permis de différencier des MSCs en chondrocytes de 3 témoins et 3 patients HGPS : 4603 P7, AG08498 P9 et AG10813 P6 (témoins), AG8243 P12, AG28340B P6 et AG01972 P3 (HGPS). D'autres lignées cellulaires sont en cours de différenciation en MSCs afin d'obtenir un n=4 pour chaque groupe.

Nous avons quantifié par RT-qPCR les miR-140-5p et miR-140-5p dans 1 lignée HGPS (AG08243) et 1 lignée témoin (4603), soit à partir d'un agrégat de 5 millions de cellules (5M), soit à partir d'un agrégat de 3 millions (3M). La synthèse de cDNA à partir de 5 ng/µL d'ARN a été réalisée à l'aide du kit miRCURY LNA™ RT (Qiagen, Hilden, Germany), conformément aux instructions du fabricant. Les niveaux d'expression de miARN spécifiques ont été quantifiés à l'aide du kit miRCURY LNA SYBR® Green PCR (Qiagen, Hilden, Germany). Les amplifications en PCR quantitative ont été effectuées en triplicat en utilisant les amorces de l'essai miRCURY LNA miRNA PCR pour hsa-miR-140-5p et hsa-miR-140-3p (Qiagen, Hilden, Germany) sur un système QuantStudio 5 Real-Time PCR (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Le cycle seuil (Cq) a été utilisé pour calculer l'expression relative des miARN à l'aide de la méthode $2^{-\Delta\Delta CT}$, normalisée par rapport à l'expression de hsa-SNORD49A ou hsa-SNORD38B (Qiagen, Hilden, Germany).

Résultats

À 21 jours, nous avons constaté que les agrégats HGPS étaient plus fragiles que ceux des témoins, se désintégrant au moindre contact, tandis que les agrégats des témoins demeuraient intacts. Cela pourrait indiquer des altérations moléculaires dans la Progeria survenant durant la différenciation chondrocytaire.

Nos expériences préliminaires (une lignée HGPS comparée à une lignée témoin) ont montré que l'expression des miR-140 évolue au cours de la différenciation chondrocytaire, que ce soit chez le témoin ou chez le patient. Alors que cette augmentation est modeste pour le miR-140-5p (FC = 1,5 pour le témoin 5M, 1,9 pour le témoin 3M et 2 pour le patient), elle est beaucoup plus marquée pour le miR-140-3p, notamment chez le patient HGPS (FC = 4 pour le témoin 5M, 4,4 pour le témoin 3M et 39,4 pour le patient) **(Figure 25)**.

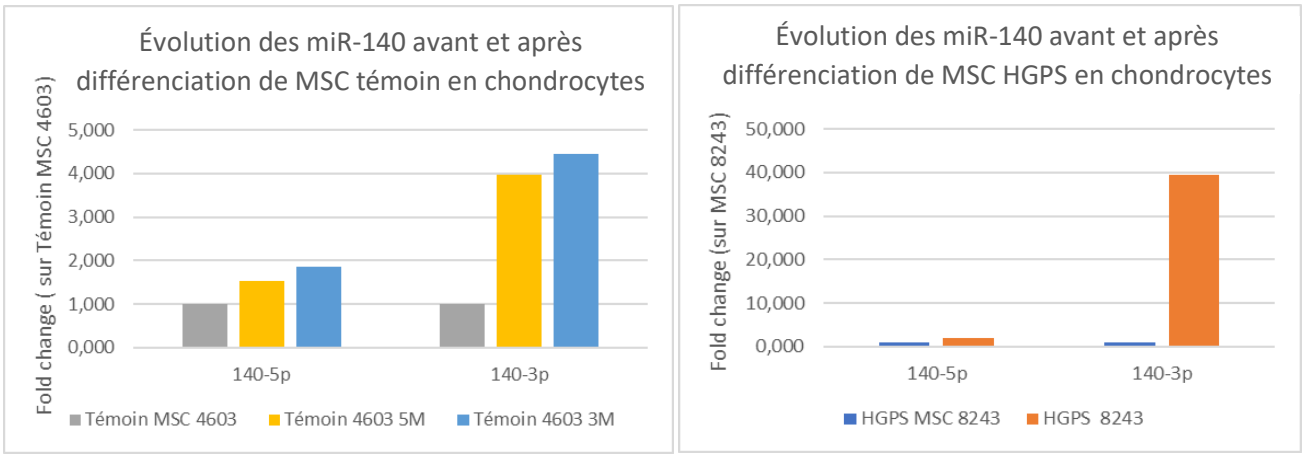


Figure 25 : Évolution de l'expression des miR-140 avant et après différenciation des lignées MSCs témoin (4603) ou MSC HGPS (AG08243) en chondrocytes.
Données normalisées sur hsa-SNORD38B

Nos résultats montrent également une discrète augmentation d'expression des miR-140 dans les MSCs de patients par rapport au témoin avant leur différenciation (J0) (FC : 1,8 pour miR-140-5p et 1,7 pour miR-140-3p). Après différenciation en chondrocytes, on observe une surexpression des miR-140 qui est beaucoup plus marquée pour le miR-140-3p (FC : 2,42 pour miR-140-5p et 17,1 pour miR-140-3p) **(Figure 26)**.

Par ailleurs, nous avons tenté de caractériser ces échantillons, afin de valider le protocole de différenciation en chondrocytes. Les expériences de western blot se sont montré infructueuses en raison de difficultés d'extraction de protéines à partir de ces échantillons. L'analyse de l'expression des marqueurs chondrocytaires de type COL2A1, Aggrecan et SOX9 sera à réaliser par d'autres méthodes (RTq-PCR, immunohistochimie sur coupes du cytoblock, réalisé à partir du matériel inclus en paraffine).

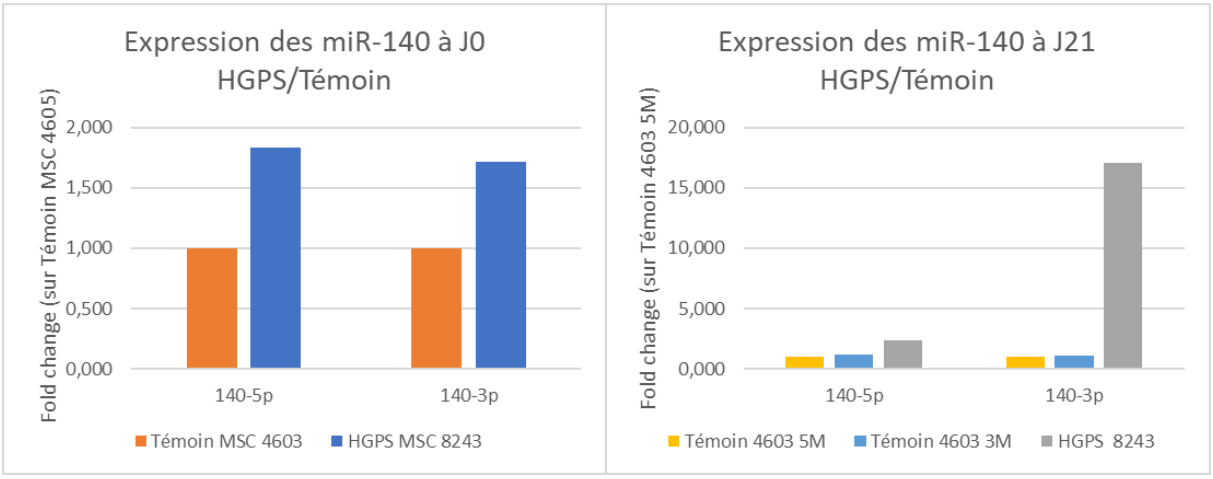


Figure 26 : Comparaison de l'expression des miR-140 entre les lignées témoins (4603) et HGPS (AG08243) à J0 et J21 de différenciation
Données normalisées sur hsa-SNORD38B

Ces résultats, bien que préliminaires et réalisés sur une seule lignée HGPS et contrôle, semblent montrer des différences à la fois de qualité du cartilage généré (friable chez HGPS) et les profils d'expression des miR-140 qui pourraient perturber le processus de différenciation chondrocytaire. Les prochaines expériences devront ainsi s'attacher à étudier les marqueurs de différenciation chondrocytaire pour en évaluer le niveau et mettre en évidence d'éventuels défauts, et d'étudier plus en détail la contribution des miR-140 dans ces processus.

3.2.2. Différenciation ostéoblastique

J'ai également validé deux protocoles de différenciation ostéoblastique sur une lignée témoin. Le premier protocole a été fourni par la plateforme MaSC et le second protocole est commercialisé par ThermoFisher Scientific.

Matériel et méthodes - Résultats

Pour le premier protocole, j'ai ensemencé les MSCs sur gélatine (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA) et les ai cultivées dans du milieu de différenciation : DMEM 4,5 g/L glucose + glutamax (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), 10 % SVF (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), 0,1 µM final de Dexaméthasone (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA), 3 mM final de NaH_2PO_4 (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA) et 50 µg/mL final d'acide ascorbique (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA). Les cellules ont été cultivées dans ce milieu pendant 28 jours et ont été récupérées à différents temps de différenciation : J0, J4, J7, J11, J14, J20 et J28 pour analyse par RT-qPCR et J0, J7, J14, J20 et J28 pour coloration et Western Blot.

J'ai d'abord appliqué ce protocole sur la lignée MSC témoin (AG08498 P10), puis j'ai effectué une coloration au rouge alizarine qui a confirmé la différenciation en ostéoblastes **(Figure 27)**.

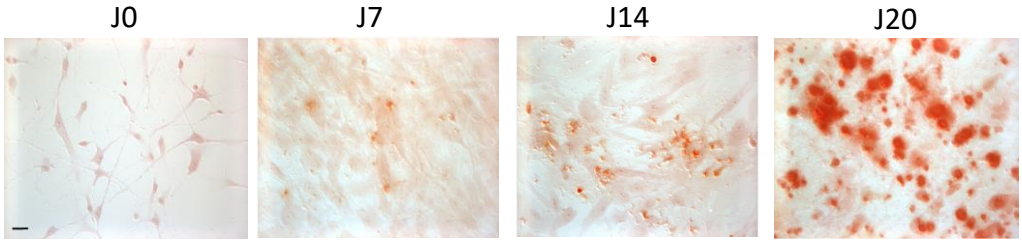


Figure 27 : Coloration en rouge alizarine des cellules témoins (AG08498 P10) différenciées à l'aide du premier protocole.
Photo en champs clair, grossissement x20

Le deuxième protocole a utilisé le kit de différenciation de l'ostéogenèse StemPro™ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) : 90mL de milieu StemPro™, 10 mL de supplément StemPro™ et 50 µL de gentamycine. Les cellules ont également été cultivées pendant 28 jours et récupérées à J0, J4, J7, J11, J14, J20 et J28 pour analyse par RT-qPCR et à J0, J7, J14, J20 et J28 pour coloration et Western Blot. Les colorations rouge alizarine et phosphatase alcaline ont confirmé la différenciation en ostéoblastes **(Figure 28)**.

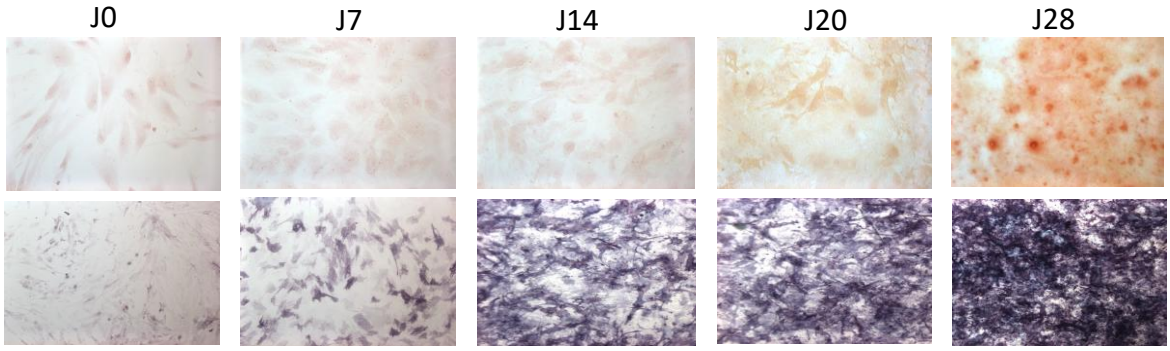


Figure 28 : Coloration au rouge alizarine (panel du haut) et à la phosphatase alcaline (Panel du bas) des cellules témoins AG08498 P11 différenciées avec le deuxième protocole.
Photo en brightfield, grossissement x20

L'étape suivante consistera à différencier d'autres lignées témoins et HGPS, puis à analyser, à partir du matériel collecté aux différents temps, les marqueurs de différenciation ostéoblastique, l'expression des miR-140-5p et miR-140-3p et de leurs cibles d'intérêt pouvant être impliquée dans des altérations de cette différenciation (BMP2, HDAC4, Pin1 ou TGFβ3).

3.2.3. Cinétique d'expression tissulaire des miR-140

Nous avons également exploré *in vivo* sur un modèle murin, le rôle du miR-140 dans la physiopathologie et les altérations tissulaires associées à la Progeria.

Matériel et méthodes

Dans cette étude utilisant le modèle murin *Lmna*$^{G609G/G609G}$ (souris HGPS), disponible dans notre équipe, nous avons voulu réaliser une analyse de la cinétique d'expression des miR-140-5p et miR-140-3p dans divers tissus, pour la plupart très altérés dans la pathologie (crosse aortique, aorte thoracique, os, tissus adipeux, cœur) à différents stades de leur développement : 5 jours, 15 jours, 1 mois, 2 mois, 3 mois et 4 mois, en comparaison à des souris sauvages (souris WT). Il est à noter que les souris HGPS de 4 mois sont à considérer dans ce modèle KI homozygote comme très âgées, les animaux ayant une espérance de vie d'environ 4 mois.

Nous avons utilisé la même méthode d'extraction et de quantification que précédemment, avec des amorces murines mmu-miR-140-5p et mmu-miR-140-3p. La normalisation est effectuée par rapport à l'expression de mmu-Snord68 ou mmu-Snord110 (Qiagen, Hilden, Germany).

Résultats

De manière inattendue, nous avons observé une diminution de l'expression de miR-140-5p et miR-140-3p dans l'aorte thoracique, la crosse aortique, le tissu adipeux et les os, mais pas dans le cœur, chez les souris âgées *Lmna*$^{G609G/G609G}$, proches du décès (3-4 mois) **(Figure 29)**. Le détail du nombre d'animaux utilisés pour chaque quantification est indiqué en **Annexe 1**.

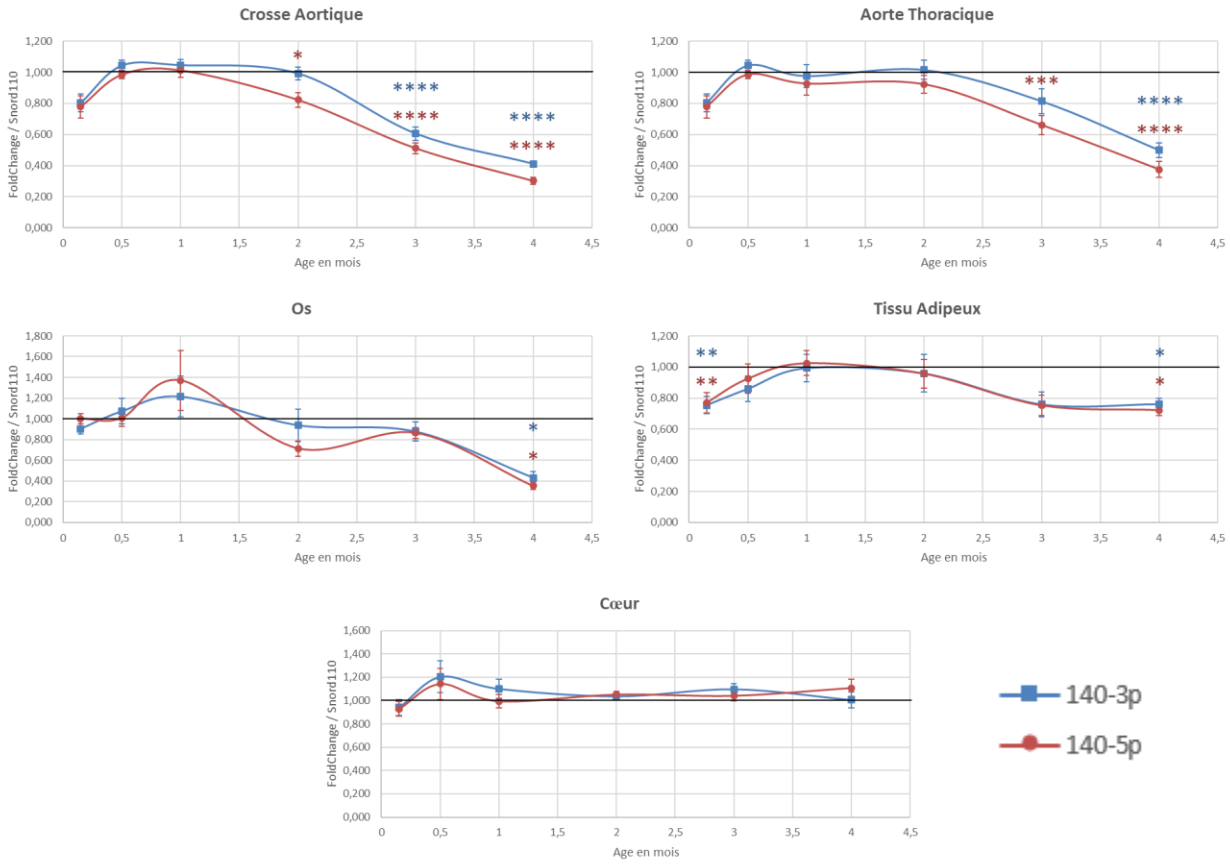


Figure 29 : Expression des miARN-140-5p et 140-3p dans les tissus des souris *Lmna* $^{G609G/G609G}$ à différents âges comparés à celle de souris WT.
Normalisé sur SNORD-110

3.2.4. Cultures primaires de chondrocytes et d'ostéoblastes murins

Nous avons également mis en place et étudié des cultures primaires d'ostéoblastes et de chondrocytes isolés à partir de souris HGPS et WT, afin de rechercher une dérégulation des miR-140 et des défauts potentiels induits.

3.2.4.1. Chondrocytes

Nous avons mis en place deux protocoles différents, permettant de recueillir des chondrocytes issus des côtes (chondrocytes costaux) ou issus des articulations des membres inférieurs (chondrocytes articulaires immatures ou iMACs).

3.2.4.1.1. Chondrocytes articulaires murins immatures (iMACs)

Matériel et méthodes

Les têtes fémorales, les condyles fémoraux et les plateaux tibiaux de 10 souris nouveau-nées (6 WT et 4 HGPS) ont été placés pendant 45 minutes à 37°C dans une solution de digestion : 3 mg/mL de Collagénase D (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA) dans du milieu de culture [DMEM D-glucose 1g/L (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA,

USA), 1%de L-Glutamine (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) et 1% Pénicilline/Streptomycine (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Le cartilage a ensuite été dissocié à l'aide d'une pipette (aspiration/refoulement) et de nouveau incubé à 37°C pendant 45 minutes. Le cartilage a été dissocié une nouvelle fois et incubé sur la nuit à 37°C dans une solution de collagénase D à 0,5 mg/mL. Le lendemain, le tissu a été dissocié à l'aide de pipettes et filtré avec un filtre 48 µM. La solution a été centrifugée pendant 10 minutes à 200 g à température ambiante. Le culot a été lavé avec du PBS et suspendu dans du milieu contenant 10% de SVF. Les cellules ont été comptées et ensemencées à une densité de 8 000 cellules viables par cm^2. L'expression de Col2A1, marqueur de différenciation chondrocytaire, a été confirmée par Western Blot et PCR **(Annexe 2)**.

Ce protocole a permis de collecter des échantillons, mais leur rendement s'est avéré insuffisant pour des analyses ultérieures. Un autre protocole d'isolement à partir du cartilage costal a été testé et s'est avéré plus efficace.

3.2.4.1.2. Chondrocytes costaux

Matériel et méthodes

Les côtes de 10 souris nouveau-nées (6 WT et 4 HGPS) ont été incubées pendant 45 minutes à 37 °C dans une solution de digestion composée de 3 mg/mL de collagénase D (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA) dans un milieu de culture [DMEM D-glucose 1 g/L (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), 1 % de L-glutamine (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) et 1% de pénicilline/streptomycine (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)]. Le cartilage a ensuite été dissocié et incubé toute la nuit à 37°C dans une solution de collagénase D à une concentration de 0,5 mg/mL. Le lendemain, le tissu a été dissocié à l'aide de pipettes, puis filtré à travers un tamis de 48 µm. La suspension a été centrifugée pendant 10 minutes à 200 g à température ambiante. Le culot cellulaire obtenu a été lavé avec du PBS, puis suspendu dans un milieu de culture contenant 10 % de SVF. Les cellules ont été ensuite comptées et ensemencées à une densité de 25 000 cellules viables par cm^2. L'expression de Col2A1 a été confirmée par Western Blot et PCR, validant l'isolement de cellules chondrocytaires **(Annexe 2)**.

Nous avons ensuite quantifié les miR-140 **(Figure 30)** sur ces chondrocytes primaires, ainsi que Dnpep **(Figure 31)**, une cible directe du miR-140-5p impliquée dans la différenciation et la prolifération chondrocytaire. L'ARN extrait a été rétrotranscrit à l'aide du kit de transcriptase inverse SuperScript IV (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, États-Unis). L'ADNc a été amplifié avec des amorces spécifiques pendant 40 cycles à une température d'hybridation de 59°C. L'amplification par PCR en temps réel a été réalisée à l'aide du TaqMan Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems) sur un système PCR en temps réel QuantStudio 5 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) avec des amorces prédéfinies pour DNPEP (Mm00497488_m1), GAPDH (Mm99999915_g1) et RPS13 (Mm01731324_g1) (Thermo Fisher Scientific). Les valeurs de cycle seuil (Ct) ont été utilisées pour déterminer l'expression relative de l'ARNm à l'aide de la méthode $2^{-\Delta\Delta CT}$, normalisée par rapport à l'expression de la GAPDH ou de la RPS13. La méthode de quantification des miR-140 a été décrite précédemment.

Résultats

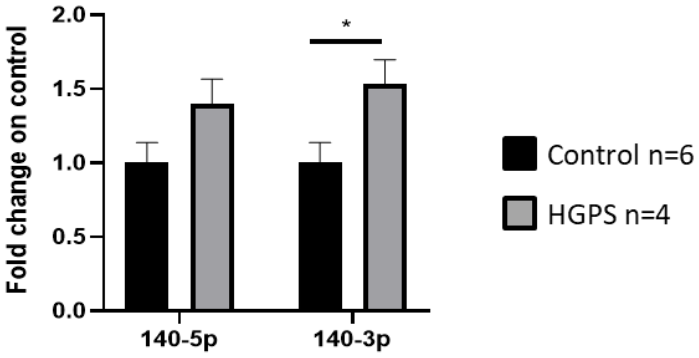


Figure 30 : Expression des miR-140 dans des chondrocytes primaires costaux.
Données normalisées sur SNORD-110

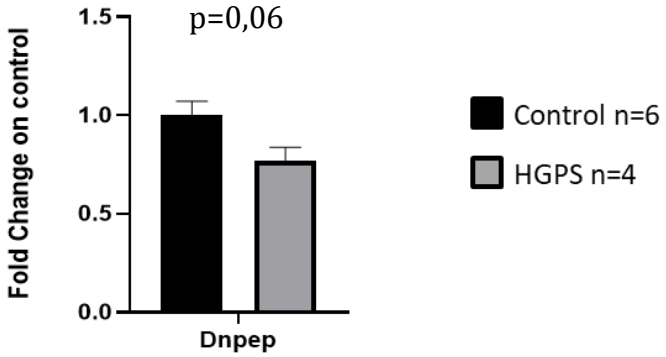


Figure 31 : Expression de *Dnpep* dans des chondrocytes primaires costaux.
Données normalisées sur GAPDH

L'analyse de 4 échantillons HGPS et de 6 WT (control) a montré une discrète surexpression de miR-140-3p et une tendance à la surexpression de miR-140-5p, associée à une discrète sous-expression de sa cible *Dnpep.* Malheureusement, la puissance statistique n'a pas été suffisante pour tirer des conclusions, nous conduisant à envisager d'augmenter le nombre d'expériences.

3.2.4.2. Ostéoblastes

Matériel et méthodes

Le protocole utilisé a été adapté de Bakker et Klein-Nulend, *« Osteoblast isolation from murine calvaria and long bones »*. Methods in Molecular Biology, 2012.

Les calvaria de trois souris nouveau-nées sont regroupés et sont placés dans 2 mL d'une solution de digestion composée de 8 mL de PBS (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), 2 mL de trypsine à 0,25% (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) et 10 mg de collagénase A (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA), puis disséqués à l'aide de deux scalpels. Les échantillons ont ensuite été incubés pendant 20 minutes à 37°C sous agitation. Le surnageant a été recueilli dans un tube de 15 mL, et 350 µL de SVF y ont été ajoutés. Les calvaria restants ont été rincés avec 3 mL de DMEM sans SVF, la solution a été bien agitée, et le surnageant obtenu a été ajouté au tube contenant la suspension cellulaire, constituant ainsi la population 1. Les morceaux de calvaria ont à nouveau été incubés dans la solution de digestion pendant 20 minutes, et les étapes précédentes ont

été répétées pour isoler la population 2. Pendant ce temps, la population 1 a été centrifugée pendant 5 minutes à 300g. Le surnageant a été éliminé, et les cellules ont été resuspendues et ensemencées dans un milieu composé de DMEM (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), 1% de streptomycine (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), 100 µg/mL d'acide ascorbique (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA) et 10% de SVF (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Ce processus a été répété pour obtenir quatre populations cellulaires. Les populations 1 et 2 ont été regroupées, tout comme les populations 3 et 4. L'expression de *BGLAP* (ostéocalcine, marqueur de différenciation ostéoblastique) a été confirmée par RT-PCR **(Annexe 2)**.

Bien que ce protocole ait permis de collecter des échantillons, leur quantité s'est révélée pour l'instant insuffisante pour mener des analyses ultérieures (6 groupes de calvaria isolés à partir de souris HGPS et 3 groupes de calvaria isolés à partir de souris WT).

3.3. Identifications de lncARNs candidats potentiellement impliqués dans la physiopathologie de la Progeria de Hutchinson-Gilford – Altérations de la région 14q3.2 (Homme) et 10q (souris)

En 2022, notre équipe a publié une étude mettant en évidence un remodelage de la chromatine de la région 14q32 dans les fibroblastes HGPS. Ce remodelage entraîne la surexpression d'un large cluster de miARNs de cette région, connue comme soumise à l'empreinte parentale (Frankel et al., 2022) **(Figure 32)**.

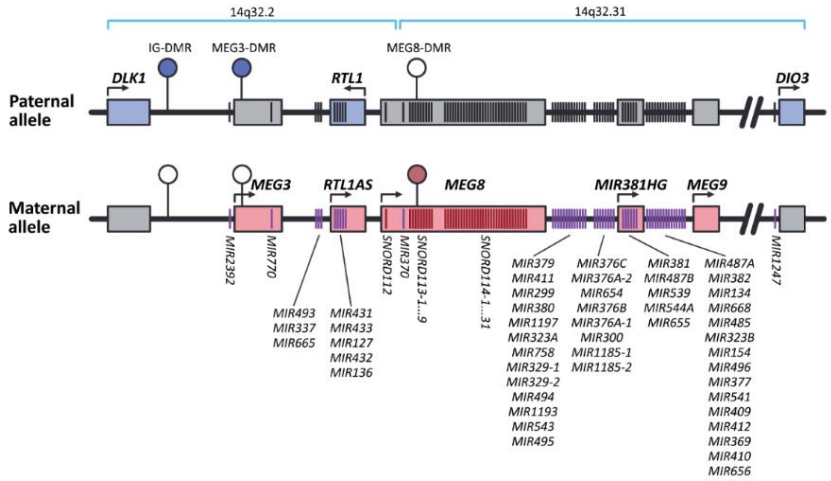


Figure 32 : Schéma de la région 14q3.2.
À partir de Baulina *et al.* « *Imprinted Genes and Multiple Sclerosis: What Do We Know?* ». Internal Journal of Molecular Science, 2021.

Résultats

Dans le cadre de nos travaux récents, nous avons mené une analyse transcriptomique sur des cultures primaires de VSMCs provenant de l'aorte de souris *Lmna*$^{G609G/G609G}$ âgées de 1 mois. L'analyse bio-informatique des données issues du NGS, réalisée en collaboration avec le Dr Anaïs Baudot et Nadine Ben Boina au sein du MMG, nous a permis d'identifier 207 miARN dérégulés, dont 146 surexprimés et 61 sous-exprimés, dans les VSMCs des souris HGPS. De manière notable, nous avons observé que 88 % des 50 miARNs les plus surexprimés appartiennent à un cluster localisé sur le chromosome 12q, correspondant à la région orthologue 14q32 chez l'Homme **(Figure 33)**. Ces résultats montrent donc une modification de ces régions orthologues entre les deux espèces HGPS à l'origine de ces surexpressions. Ces observations suggèrent l'existence d'un mécanisme de dérégulation épigénétique commun impliquant un remodelage de la chromatine déjà démontré dans nos travaux antérieurs (Frankel et al., 2022).

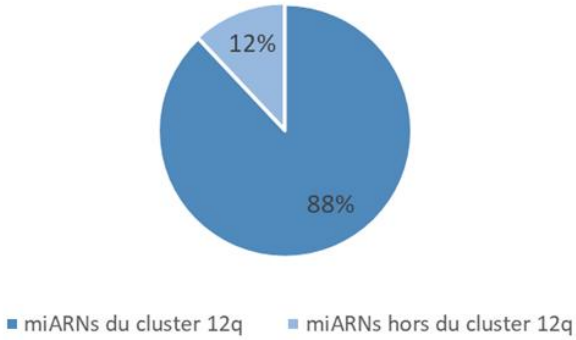


Figure 33 : Localisation des 50 premiers miARNs surexprimés dans le transcriptome des VSMCs de souris *Lmna* $^{G609G/G609G}$.

L'analyse des données OMIC obtenues dans les VSMCs du modèle de souris *Lmna*$^{G609G/G609G}$ a conduit également à l'identification de trois lncRNAs, Meg3, Rian (Meg8) et Mirg (Meg9), qui sont fortement surexprimés chez les souris *Lmna*$^{G609G/G609G}$ (log2 Fold Change proche de 10), comme de nouveaux candidats potentiellement impliqués dans la physiopathologique de la Progeria **(Tableau 2)**. En effet, il est intéressant de noter que MEG3 et MEG8 sont connus pour réguler plusieurs voies moléculaires liées au phénotype HGPS. Selon la littérature, MEG3 intervient dans divers processus biologiques, notamment la différenciation ostéogénique (Z. Li et al., 2017; C. Liu et al., 2023; H. Sun et al., 2020), l'adipogénèse (Z. Li et al., 2017), l'autophagie et la prolifération cellulaire (Ying et al., 2013). En outre, MEG3, comme d'autres lncARNs, est un ARN endogène « compétitif » (ceRNA), fonctionnant comme un bloqueur de miARNs (« sponge »), et il a été décrit qu'il inhibait directement le miR-140-5p (Z. Li et al., 2017). Quant à MEG8, il est impliqué dans la prolifération et l'apoptose des chondrocytes (Xie et al., 2021) et dans la migration et l'apoptose des VSMCs (B. Zhang et al., 2019). Ainsi, nous prévoyons d'étudier le rôle de ces lncARNs dans la Progeria sur des cellules HGPS et des tissus murins *Lmna*$^{G609G/G609G}$.

Gene	Log2FoldChange	p-value adj
Meg3	10,01	2,77 e-15
Rian/Meg8	10,54	1,90 e-17
Mirg/Meg9	9,15	9,33 e-10

Tableau 2 : Surexpression des lncARNs candidats de la région 12q du transcriptome VSMC murin.
N= 3 cultures de VSMCs HGPS passage 8 et n=3 cultures de VSMCs WT passage 8.

4. Discussion et perspectives

Mon travail de Thèse a permis de clarifier le rôle des ARN non codants, en particulier des miR-140-5p et miR-140-3p, dans la physiopathologie de la Progeria.

Cette étude, prolongement de travaux précédents, approfondit le rôle des ARN non codants dans la Progeria (Frankel et al., 2022). À l'aide de l'analyse transcriptomique par NGS, nous avons exploré les voies de dérégulation communes entre de patients HGPS et HGPS-like. Parmi les dix miARNs identifiés comme étant dérégulés, nous nous sommes concentrés sur les miR-140-5p et miR-140-3p, deux miARNs produits à partir du même précurseur et surexprimés dans les fibroblastes HGPS par rapport aux témoins sains.

Les objectifs de ce projet de thèse ont été **1/** de mener des études fonctionnelles sur les miR-140 à partir de modèles *in vitro* afin de comprendre leur implication dans la physiopathologie de la Progeria et des syndromes apparentés ; **2/** de mettre en place et d'utiliser des modèles *in vitro* de différenciation cellulaire à partir d'iPSCs, afin de comprendre la contribution des miR-140 dans les altérations ostéo-articulaires de cette maladie ; **3/** d'étudier le rôle des miR-140 dans la physiopathologie de la Progeria à l'aide de modèles *in vivo* issus du modèle murin KI de la Progeria ; et **4/** d'analyser les données du transcriptome issues du NGS sur fibroblastes humains et VSMCs murines pour identifier des lncARNs d'intérêt.

Le premier axe de ma thèse, focalisé sur les études *in vitro*, constitue la partie la plus aboutie de mes travaux et a conduit à la rédaction d'un article scientifique. Ces travaux ont révélé que la surexpression du miR-140-5p dans les fibroblastes HGPS entraîne une inhibition de NRF2 et de son activité, ce qui accroit le stress oxydatif et perturbe les fonctions mitochondriales. Par ailleurs, la surexpression du miR-140-5p dans des cellules contrôles entraîne une réduction de l'expression de NRF2 et une augmentation de l'accumulation des ROS. Enfin, la diminution de l'expression du miR-140-5p augmente l'expression de NRF2 et permet de restaurer la respiration basale dans les cellules HGPS **(voir Article 3)**. Kubben et al. (Kubben et al., 2016) ont déjà rapporté le rôle de l'altération de la fonction de NRF2 dans la physiopathologie de la Progeria. Ils ont démontré que la progérine séquestre NRF2 au niveau de la *lamina* nucléaire, entraînant une altération de l'activité transcriptionnelle de NRF2 et, par conséquent, une augmentation du stress oxydant chronique. Nous n'avons pas retrouvé cette délocalisation dans le noyau des cellules HGPS. Cependant, nous avons constaté que les lignées HGPS utilisées par Kubben *et al*. (AG01972 et AG06297) faisaient partie des rares lignées ne surexprimant pas le miR-140-5p **(Annexe 3)**. Cette différence peut donc expliquer la divergence de nos résultats.

Dans le cadre du deuxième objectif, nous avons voulu étudier l'expression des miR-140 et de leurs cibles lors de la différenciation chondrocytaire et ostéoblastique, des processus particulièrement affectés dans la Progeria (Cabral et al., 2023; Mateos et al., 2013). Ces tissus ont été sélectionnés en raison de leur pertinence physiopathologique : le miR-140-5p cible directement BMP2, Pin1, HDAC4 et Dnpep, des régulateurs clés de la différenciation des ostéoblastes et des chondrocytes (Gao et al., 2021; Hwang et al., 2014;

Islam et al., 2017; Nakamura et al., 2011; Yao et al., 2023). De plus, le miR-140-3p cible TGF-β3, un acteur majeur de la différenciation ostéoblastique. La différenciation de trois lignées témoins et de trois lignées HGPS en chondrocytes nous a permis de mener des analyses préliminaires des miR-140 dans ces cellules. Ces travaux montrent une augmentation de l'expression des miR-140 au cours de la différenciation en chondrocytes, en particulier pour le miR-140-3p, ce qui est conforme à la littérature (Miyaki et al., 2009). De manière intéressante, l'expression des miR-140 reste significativement plus élevée dans les cellules HGPS, aussi bien avant qu'après différenciation. Ces résultats, montrant une surexpression des deux miR-140, sont cohérents avec les données précédemment obtenues sur les fibroblastes HGPS. Notre étude préliminaire sur ces modèles nous a permis de constater que les Western Blot ne fonctionnent pas sur ces échantillons, ce qui nous a conduits à planifier la récupération des prochains culots sous forme de cytoblocs inclus en paraffine afin de réaliser des immunomarquages permettant de valider le protocole de différenciation de MSCs en chondrocytes. Pour renforcer ces conclusions, nous poursuivons actuellement la différenciation de nouvelles lignées cellulaires, visant à atteindre un échantillon de n=4 ou 5. L'objectif est par ailleurs de quantifier les cibles des miR-140 au cours de cette différentiation pour en identifier des altérations. En fonction des résultats obtenus, nous pourrons moduler expérimentalement les miR-140 avec des mimics et des antimiRs pour en évaluer l'impact, dans ce modèle *in vitro*, sur l'expression des cibles d'intérêt et les processus de différenciation chondrocytaire et ostéoblastique.

J'ai également réalisé une étude de l'expression des miR-140 dans divers tissus à différents âges chez des souris HGPS (modèle murin KI) et sauvages. Le modèle utilisé, *Lmna*$^{G609G/G609G}$, que notre équipe a contribué à créer, constitue le modèle *in vivo* le plus pertinent disponible pour l'étude de la maladie, car il reproduit à la fois le mécanisme moléculaire (avec la production et l'accumulation de progérine), ainsi qu'une grande partie du phénotype humain. Nos résultats montrent, de manière inattendue, une diminution de l'expression de miR-140-5p et miR-140-3p dans l'aorte thoracique, la crosse aortique, le tissu adipeux et les os, mais pas dans le cœur, chez des souris âgées portant la mutation *Lmna*$^{G609G/G609G}$. La survenue de cette sous-expression semble coïncider avec la progression et l'aggravation de la maladie dans chacun de ces tissus. Dans la crosse aortique, où une sous-expression du miR-140-5p est détectée dès l'âge de 2 mois, les cellules subissent un renouvellement fréquent en raison de la forte pression sanguine, ce qui entraîne une apparition précoce des symptômes de la maladie. Cette sous-expression apparaît ensuite à 3 mois dans l'aorte thoracique, un autre tissu particulièrement affecté soumis à de hautes pressions. À 4 mois, elle se manifeste dans les os et le tissu adipeux.

Ces observations semblent en contradiction avec les données obtenues dans les fibroblastes humains HGPS et les VSMCs issues de l'aorte de souris âgées de 1 mois. Cette divergence pourrait s'expliquer par une perte des VSMCs au niveau de l'aorte aux stades avancés de la maladie, comme cela a été rapporté dans ce modèle murin (Osorio et al., 2011b). Nous avons montré la surexpression des miR-140 **(voir Article 3)** dans les cultures primaires de VSMCs issues de l'aorte de souris *Lmna*$^{G609G/G609G}$ jeunes (1 mois) comparées aux souris WT. Nous n'avons pas retrouvé cette surexpression dans les extraits aortiques de ces souris au même âge. Cela pourrait être dû au « masquage » de cette surexpression par les autres types cellulaires dans un tissu aortique hétérogène (VSMCs, cellules endothéliales, fibroblastes, cellules nerveuses…). Nous pensons que la

perte progressive des VSMCs dans l'aorte au cours du vieillissement de ces souris pourrait s'accompagner de la diminution également progressive de l'expression des miR-140, jusqu'aux stades les plus tardifs (3-4 mois) où la perte massive des VSMCs aortiques se manifesterait par la sous-expression des miR-140. Le cœur n'est pas un organe directement et particulièrement affecté dans la maladie, les patients présentant principalement une pathologie vasculaire (athérosclérose précoce) plutôt qu'une atteinte directe du myocarde. Au stade avancé de la maladie, l'atteinte cardiaque va généralement entraîner le décès des patients par infarctus du myocarde dont l'origine est coronarienne.

Concernant le tissu adipeux et osseux, cette observation est influencée là aussi par la diversité des types cellulaires présents dans ces tissus. Pour approfondir ces hypothèses, nous avons commencé à étudier plus en détail ces tissus par l'établissement de cultures primaires d'ostéoblastes et de chondrocytes murins isolés en postnatal précoce (avant P5). Les chondrocytes isolés à partir des côtes ont montré une tendance à la surexpression des miR-140 dans ce type cellulaire chez les souris HGPS cependant non significative, accompagnée, de manière cohérente, d'une sous-expression de Dnpep. Bien que nos résultats présentent une nette tendance, nous devons augmenter le nombre d'échantillons pour renforcer nos conclusions en atteignant la significativité.

L'analyse des données OMIC obtenues dans les VSMCs du modèle de souris *Lmna*$^{G609G/G609G}$, nous a permis d'identifier des dérégulations communes entre la région chromosomique murine 12q et son homologue humaine 14q3.2. Nous approfondissons ces résultats en analysant actuellement la région 14q3.2 et d'autres régions grâce à la technologie de séquençage *long read Oxford Nanopore*. Notre objectif initial est de comparer les profils de méthylation de l'ADN et d'hydroxyméthylation (5hmC) entre les fibroblastes dermiques HGPS et les échantillons témoins, en lien avec l'accumulation de progérine. Les données obtenues chez l'humain serviront de base pour explorer les altérations de méthylation de l'ADN dans les VSMCs de souris, dans le but d'identifier des motifs communs d'altérations épigénétiques.

De plus, l'identification de la surexpression du lncARN MEG3 pourrait contribuer à élucider les mécanismes régulant l'expression de miR-140-5p au cours du développement. Dans un article précédent, nous avons démontré que la dérégulation de la région 14q32 dans les fibroblastes HGPS humains est induite par l'accumulation de progérine et se manifeste à des passages tardifs (Frankel et al., 2022). Si la région homologue murine, 12q, est régie par des mécanismes de régulation similaires, la surexpression tardive de MEG3 pourrait inhiber l'expression de miR-140-5p, ce qui pourrait aussi expliquer la sous-expression de ce dernier chez les souris *Lmna*$^{G609G/G609G}$ âgées, d'abord dans les tissus les plus touchés par la maladie (aorte thoracique et crosse aortique), puis dans autres tissus affectés (os et tissus adipeux).

L'un des principaux défis de cette étude réside dans l'hétérogénéité des lignées cellulaires HGPS, en particulier en ce qui concerne les variations dans l'accumulation de progérine. Par ailleurs, la taille restreinte des échantillons limite la robustesse des analyses statistiques. Une approche pertinente serait de générer des lignées isogéniques en corrigeant la mutation *LMNA* (c.1824C>T; p.G608G) dans nos lignées cellulaires à l'aide de la technologie CRISPR-Cas9, afin de les inclure comme complément aux cellules témoins dans nos analyses. Un objectif complémentaire de cette étude est également de

transfecter les cellules témoins avec le précurseur du miR-140, dans le but d'évaluer l'effet d'une surexpression combinée des deux miARNs.

Mes résultats, ainsi que les études futures, pourraient également ouvrir la voie à de nouvelles approches thérapeutiques encore non explorées. Une intervention thérapeutique ciblant le miR-140-5p pourrait en effet corriger plusieurs voies moléculaires dysfonctionnelles impliquées dans la Progeria. La modulation de la surexpression de miR-140-5p permettrait non seulement de rétablir l'expression de NRF2 et d'atténuer le stress oxydatif et ses conséquences désastreuses, mais également d'améliorer les atteintes ostéoarticulaires et cardiovasculaires en restaurant l'expression des gènes cibles du miR-140-5p. Par ailleurs, l'identification de lncARNs candidats pourrait permettre d'évaluer de nouvelles voies thérapeutiques. Ces travaux visent à découvrir des voies de signalisation dérégulées communes aux syndromes progéroïdes et à développer des approches thérapeutiques innovantes pour ces maladies graves.

Conclusion générale

Dans le cadre de ce projet, nous avons mis en évidence des microARNs dérégulés dans la Progeria de Hutchinson-Gilford, en particulier les miR-140-5p et miR-140-3p. Ces miARNs sont surexprimés dans les fibroblastes des patients HGPS et HGPS-like, ainsi que dans les VSMCs de jeunes souris *Lmna*$^{G609G/G609G}$. Les expériences menées *in vitro* dans les fibroblastes, induisant la surexpression du miR-140-5p chez les témoins ou l'inhibant chez les HGPS, ont révélé son rôle en tant que régulateur négatif du stress oxydant et de la respiration mitochondriale, deux mécanismes moléculaires clés impliqués dans le vieillissement. Nous avons également développé des protocoles de différenciation en chondrocytes et en ostéoblastes à partir de MSCs dérivées d'hiPSCs. Ces modèles nous permettront, dans un second temps, d'étudier le rôle des miR-140 dans la régulation de ces processus.

Par ailleurs, certains ARN non codants (ARNnc) identifiés comme dérégulés dans les VSMCs de souris *Lmna*$^{G609G/G609G}$ ont également été identifiés comme dérégulés dans les fibroblastes de patients HGPS. Ces observations suggèrent l'existence d'une régulation conservée au niveau de cette région chromosomique entre l'Homme et la souris. Parmi ces ARN non codants, les lncARNs MEG3 et MEG8 pourraient jouer un rôle dans la migration et l'apoptose des VSMCs, ainsi que dans la régulation de l'expression de miR-140-5p. L'étude de ces lncARNs et du locus auquel ils appartiennent est déjà au centre d'un autre travail de Thèse en cours et de nouveaux axes de recherche de notre équipe.

Nos travaux contribuent à une meilleure compréhension des mécanismes physiopathologiques de la Progeria de Hutchinson-Gilford et de l'implication des ARNnc dans cette pathologie, tout en ouvrant la voie à de futures études, y compris dans le champ du vieillissement physiologique que nos travaux peuvent permettre de mieux comprendre. Comprendre les dérégulations de ces acteurs est essentiel et pourrait, à terme, ouvrir la voie à de nouvelles approches thérapeutiques dans cette maladie au pronostic très sombre.

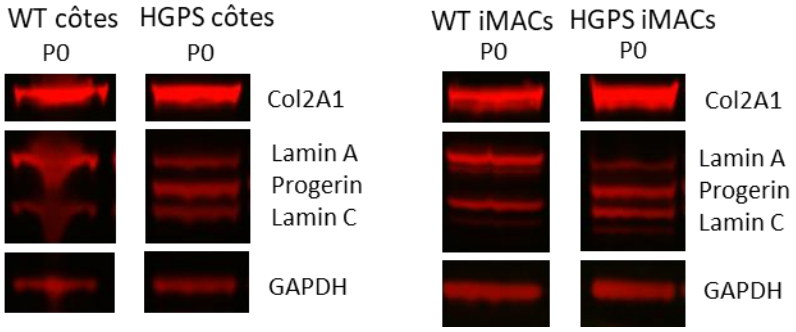
Annexes

Annexe 1

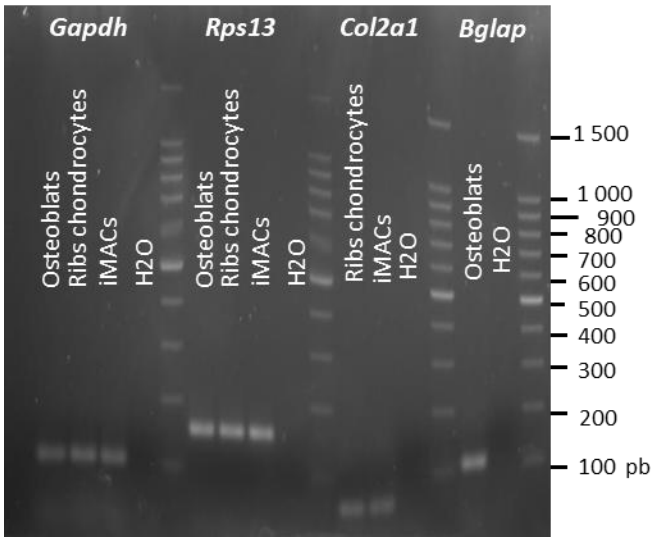
n	HGPS	WT
5 days	8	8
15 days	8	8
1 month	10	8
2 months	8	10
3 months	8	7
4 months	8	8

Nombre d'animaux utilisés pour chaque condition pour établir la cinétique des miR-140 *in vivo* chez les souris sauvages (WT) et *Lmna*$^{G609G/G609G}$ (HGPS)

Annexe 2



Expression de Col2A1 et de la progérine dans les chondrocytes primaires par Western Bolt



Expression de l'ARNm Col2a1 dans les chondrocytes et de Bglap dans les ostéoblastes et migration des produits qPCR

Annexe 3

	miR-140-5p	miR-140-3p
AG01972 P19	1,600	1,938
AG06297 P18	0,570	0,634

Expression des miR-140 dans les lignées AG01972 et AG06297 par RT-qPCR ciblée.
Données normalisées sur hsa-SNORD38B et par rapport à 5 lignées contrôles

Article 2

Trani JP, Chevalier R, Caron L, El Yazidi C, Broucqsault N, **Toury L**, Thomas M, Annab K, Binetruy B, De Sandre-Giovannoli A, Levy N, Magdinier F, Robin JD. *Mesenchymal stem cells derived from patients with premature aging syndromes display hallmarks of physiological aging.* Life Sci Alliance. 2022 Sep 14;5(12):e202201501. doi: 10.26508/lsa.202201501. PMID: 36104080; PMCID: PMC9475049.

Published Online: 14 September, 2022 | Supp Info: http://doi.org/10.26508/lsa.202201501
Downloaded from life-science-alliance.org on 13 January, 2025

Research Article

TRANSPARENT PROCESS OPEN ACCESS Life Science Alliance

Check for updates

Mesenchymal stem cells derived from patients with premature aging syndromes display hallmarks of physiological aging

Jean Philippe Trani[1], Raphaël Chevalier[1], Leslie Caron[1], Claire El Yazidi[1], Natacha Broucqsault[1], Léa Toury[1], Morgane Thomas[1], Karima Annab[1], Bernard Binetruy[1], Annachiara De Sandre-Giovannoli[1,2,3], Nicolas Levy[1,2,3], Frédérique Magdinier[1], Jérôme D Robin[1]

Progeroid syndromes are rare genetic diseases with most of autosomal dominant transmission, the prevalence of which is less than 1/10,000,000. These syndromes caused by mutations in the *LMNA* gene encoding A-type lamins belong to a group of disorders called laminopathies. Lamins are implicated in the architecture and function of the nucleus and chromatin. Patients affected with progeroid laminopathies display accelerated aging of mesenchymal stem cells (MSCs)–derived tissues associated with nuclear morphological abnormalities. To identify pathways altered in progeroid patients' MSCs, we used induced pluripotent stem cells (hiPSCs) from patients affected with classical Hutchinson–Gilford progeria syndrome (HGPS, c.1824C>T—p.G608G), HGPS-like syndrome (HGPS-L; c.1868C>G—p.T623S) associated with farnesylated prelamin A accumulation, or atypical progeroid syndromes (APS; homozygous c.1583C> T—p.T528M; heterozygous c.1762T>C—p.C588R; compound heterozygous c.1583C>T and c.1619T>C—p.T528M and p.M540T) without progerin accumulation. By comparative analysis of the transcriptome and methylome of hiPSC-derived MSCs, we found that patient's MSCs display specific DNA methylation patterns and modulated transcription at early stages of differentiation. We further explored selected biological processes deregulated in the presence of *LMNA* variants and confirmed alterations of age-related pathways during MSC differentiation. In particular, we report the presence of an altered mitochondrial pattern; an increased response to double-strand DNA damage; and telomere erosion in HGPS, HGPS-L, and APS MSCs, suggesting converging pathways, independent of progerin accumulation, but a distinct DNA methylation profile in HGPS and HGPS-L compared with APS cells.

DOI 10.26508/lsa.202201501 | Received 25 April 2022 | Revised 31 August 2022 | Accepted 31 August 2022 | Published online 14 September 2022

Introduction

Laminopathies define a heterogeneous group of diseases linked to mutations in the *LMNA* gene. Among these, Hutchinson–Gilford progeria syndrome (HGPS) characterized by premature aging in early childhood represents the most striking clinical condition (1, 2, 3, 4). Symptoms associated with this extremely serious rare congenital disease include growth retardation, alopecia, lipodystrophy, osteoporosis, osteolysis, thin skin, and loss of subcutaneous fat. The disease is also characterized by atherosclerosis and myocardial infarction, which is the leading cause of death in HGPS patients who die in early adolescence (5). This disease is caused by an autosomal dominant mutation in the *LMNA* gene encoding A-type lamins (6, 7). The mutation (NM_170707.4: c.1824C>T; p.G608G) consists in a C-T transition at position 1824 in exon 11. This transition activates an alternative splice donor site, leading to the production of a truncated prelamin A protein called progerin with a deletion of 50 amino acids in its globular C-terminal domain. Thus, in HGPS patients, progerin retains a C-terminal farnesyl tail, which is normally cleaved during posttranslational maturation of wild-type prelamin A.

At the cellular level, HGPS pathogenesis has been linked to a variety of causes, associated with the accumulation of progerin, which is toxic to cells, but also the fragility and disruption of the nuclear *lamina* resulting in nuclear blebbings, chromatin reorganization, premature cell senescence, increased sensibility to mechanical stress, and defects in autophagy (8, 9, 10). HGPS has also been associated to the depletion of the stem cell pool (11) and defects in the terminal differentiation of cells derived from the mesenchymal stem cells (MSC) lineage (12, 13, 14), such as adipocytes, chondrocytes, and osteocytes along with the loss of vascular smooth muscle cells contributing to atherosclerosis.

[1]Aix Marseille Univ, MMG, Marseille Medical Genetics U1251, Marseille, France [2] Assistance Publique Hôpitaux de Marseille (APHM), Département de Génétique Médicale, Hôpital d'Enfants de la Timone, Marseille, France [3]Biological Resource Center (CRB-TAC), APHM, La Timone Children's Hospital, Marseille, France

Correspondence: Frederique.Magdinier@univ-amu.fr; Jerome.robin@univ-amu.fr

© 2022 *Trani et al.*

Since the identification of the recurrent p.G608G HGPS-causing mutation, additional mutations in the *LMNA* gene have been associated with other segmental premature aging syndromes, with patients harboring symptoms closely related to classical HGPS. In 2007, a heterozygous mutation in the *LMNA* gene (p.T623S) was found in an 11-yr-old girl presenting with a phenotype similar to HGPS (15), including facial dysmorphism, alopecia, low bone mass, cardiovascular defects, increased triglyceride, LDL, and cholesterol levels. A patient previously described, who died at the age of 45 years from myocardial infarction, carried the same mutation (c.1868C>G) in exon 11 of the *LMNA* gene as the typical HGPS mutation (16). As in HGPS, this mutation creates a donor splice site or alternatively leads to modification of the protein sequence (p.T623S). After maturation of the protein, this cryptic splice site results in the deletion of 105 nucleotides from the messenger RNA and loss of 35 amino acids (lamin Δ35), including the excision site of the farnesyl group. The consequence is the same as in HGPS, with persistence of a toxic farnesyl group at the truncated prelamin A C-terminal tail (16, 17).

In addition, different syndromes called atypical progeroid syndromes (APS) because of lamin A/C missense mutations and characterized by a clinical phenotype similar to that of HGPS have been described. Hence, from a molecular point of view, the mutation spectrum in APS is different from classical HGPS with different variants reported, including a homozygous *LMNA* mutation (c.1583C>T; p.T528M) found in three boys presenting a mandibuloacral dysplasia (MAD) phenotype (A De Sandre-Giovannoli, personal communication); a composite heterozygous mutation (c.1583C>T and c.1619T>C; p.T528M and p.M540T, respectively) (18) and a heterozygous mutation c.1762T>C (p.C588R) (19, 20). Contrary to HGPS or HGPS-like, all these mutations neither modify the mechanism of protein maturation nor lead to progerin/prelamin A accumulation. In addition to signs of classical progeria, the patient developed a myopathy and MAD, both associated with other *LMNA* mutations (e.g., homozygous missense mutation c.1579C > T, p.R527C) (21).

Because mutations in A-type lamins associated with premature aging syndromes mainly affect tissues derived from MSCs, we sought to identify pathways that are dysregulated at early differentiation stages. To this aim, we produced induced pluripotent stem cells (hiPSCs) from patients affected with premature aging syndromes linked to different *LMNA* mutations (HGPS, n = 3; HGPS-L, n = 1; and APS, n = 3), established a differentiation protocol to obtain MSCs, and analyzed their transcriptome and methylome in comparison to cells from a healthy young donor and a healthy aged donor, used as controls. Importantly, hiPSCs hold the potential to produce standardized cell preparation (22) with large capacity of culture expansion. Thus, we produced hiPSC-derived MSCs and focused on events associated with early *LMNA* expression (e.g., lamins and progerin), including transcription, DNA methylation, and major cellular hallmark of aging (DNA damage and mitochondrial network). HIPSCs derived from these three laminopathy subgroups were indistinguishable from one another and from controls. However, upon MSCs differentiation, all cells displayed signs associated with cellular aging. We found that APS MSCs displayed differences in methylated DNA and transcription profiles when compared with HGPS and HGPS-L cells, indicating specific molecular mechanisms depending on the presence or absence of farnesylated prelamin A/progerin but leading to a similar premature aging phenotype.

Results

MSC differentiation is not impaired in cells from patients affected with premature aging

HGPS and associated syndromes (HGPS-L and APS) are characterized by defects in specific tissues, especially those derived from the mesenchymal cell lineage (adipose tissue, bones, cartilage). To uncover genes and pathways associated with MSCs premature aging in patients with mutation in the *LMNA* gene, we generated hiPSCs from different patients and healthy donors. HiPSCs were derived from three patients affected with HGPS (c.1824C>T, p.G608G); one patient with a progeria-like syndrome, HGPS-L (c.1868C>G—p.T623S) and three patients affected with APS (homozygous c.1583C>T, p.T528M; heterozygous c.1762T>C p.C588R; compound heterozygous p.T528M and p.M540T, respectively) (Fig 1A and Table S1). As controls, we used hiPSCs derived from a young healthy donor (matched in age with the different patients) and hiPSCs derived from an 82-yr-old healthy donor. All hiPSCs were characterized following standard procedures (23, 24). Upon reprogramming, hiPSCs expressed the classical pluripotency markers (*SOX2*, *NANOG*, *OCT4*; Fig S1A), form embryonic bodies expressing markers of the different embryonic layers (Fig S1B), and displayed a normal karyotype (data not shown). To note, although HGPS-hiPSC lines expressed lower levels of pluripotency markers, we did not observe any differentiation defects in these lines. As expected, A-type lamins and progerin were not produced in stem cells (12, 25) (Fig S1C).

After optimization of the mesenchymal cell lineage differentiation from hiPSCs, hiPSC-derived MSCs, dubbed thereafter MSCs (26) (Fig 1B), we determined the percentage of cells expressing MSCs markers at different passages by flow cytometry using the CD73 (ecto 5′ nucleotidase), CD90 (Thy1), and CD105 (Endoglin) cellular markers (Fig S2A). Throughout differentiation and passages (P2-P7), MSCs markers were expressed in all hiPSC-derived MSCs (>80%) with minimal differences between conditions except for the HGPS-L line (Fig S2A). HGPS-L clones displayed a steady medium percentage of positive cells (50%) for the CD73 and CD105 markers, whereas no differences were observed for CD90 (>95% of positive cells), without inducing detectable defects in MSCs properties. This intriguing result should be explored in additional hIPSCs from HGPS-L individuals. The absence of differentiation toward the hematopoietic lineage was confirmed by the low percentage of cells positive for hematopoietic markers (e.g., <1.2% of CD34- or CD45-positive cells; Fig S2B).

At each passage, we also determined the rate of proliferation by analyzing the percentage of cells expressing the Ki67 proliferation marker in cells at 80% of confluency (Fig S2C and D). We observed a tendency toward a faster, but not significant, rate of proliferation for HGPS cells compared with young healthy donor cells with 5.14 ±1 versus 6.14 ±1 (Mean ± SD) days between passages, respectively

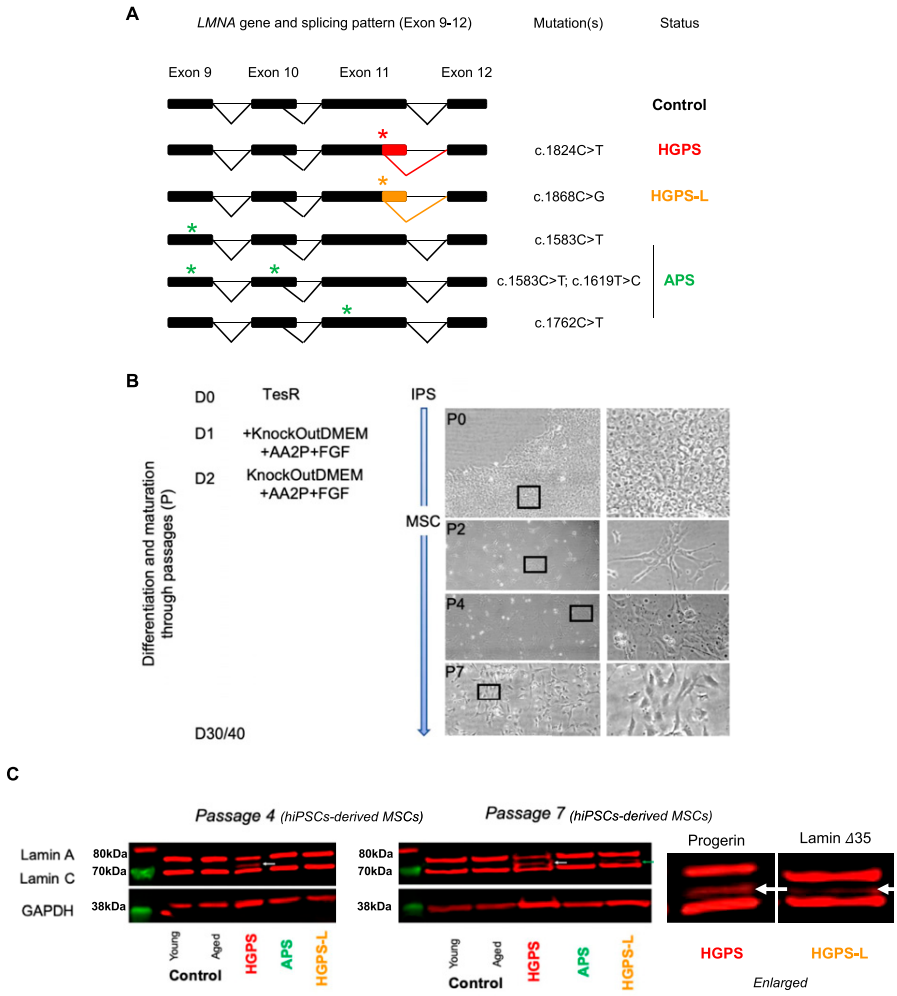


Figure 1. hiPSCs-derived mesenchymal stem cells (MSCs) from patients with premature aging syndrome (recapitulate the cellular features observed in primary cells).
(A) Schematic representation of different splicing patterns described for the *LMNA* gene and position of LMNA gene variants in Hutchinson–Gilford progeria syndrome (HGPS) (1,972, 8,243 and 5,968), HGPS-L (PC054) and atypical progeroid syndrome (OM2, 13,621, and 10,770) cells, leading to the production of pathogenic A-type lamin isoforms. **(B)** MSCs differentiation strategy. After dissociation with accutase, hiPSCs were plated on fibronectin-coated plates in the presence of ROCK inhibitor (thiazovivin). Cells are grown in TeSR, which is progressively removed upon differentiation and replaced with knockout-DMEM supplemented with ascorbic acid and FGF2. TeSR medium is removed at day 2, and cells are grown in knockout-DMEM supplemented with ascorbic acid and FGF2 until they reached 80% of confluency with medium replacement every 2 d. For the different passages, cells were dissociated with trypsin and plated in the same conditions. **(C)** Immunoblotting of A-type lamins proteins in whole-cell extracts of hiPSC-derived mesenchymal stem cells derived from young and aged healthy donors (CT-Y, CT-A); patients affected with either HGPS, atypical progeroid syndrome, or HGPS-L. MSCs were extracted at the fourth and seventh passage post-differentiation (left or right panels; respectively). Progerin is detectable in HGPS cells (Δ50 intermediate band between lamins A and C). Antibodies also detect the Δ35 isoform produced in HGPS-like cells as indicated by a white arrow and presented in the blots and their enlarged adjacent version for progerin (HGPS, passage 4) and Δ35 isoform (HGPS-L, passage 7); respectively.

(P = 0.79; n = 7 per condition) (Fig S2C). Next, we analyzed the production of progerin and lamins A/C at two different passages (P4 and P7) by Western blotting (Fig 1C). At P4 and P7, the level of lamin-A and -C was similar between cells, with the detection of progerin restricted to HGPS MSCs. The lamin Δ35, isoform present in HGPS-L, was detectable at P7. As expected, no progerin or truncated prelamin A could be detected in APS and Control MSCs (Fig 1C).

Hence, *LMNA* mutations and accumulation of progerin (HGPS) or truncated prelamin A (HGPS-L) did not affect the efficiency of differentiation but slightly delayed the MSCs differentiation of HGPS-L cells (Fig 1C). Accordingly, regardless of their genotype, >90% of cells expressed MSC markers at P7. For further experiments, cells were collected at the seventh passage, that is, 40 d post-differentiation for HGPS-L cells and 47 d for the healthy aged donor.

Expression profiles differ between progeroid patients

To identify pathways dysregulated in MSCs from patients with different *LMNA* mutations, we performed RNA Sequencing in hiPSCs and hiPSC-derived MSCs (MSCs) at P7 for the different clones. Unsupervised hierarchical clustering separated two groups, corresponding either to hiPSCs or MSCs confirming the efficient MSCs differentiation (Fig 2A). In hiPSCs, we noted only a small proportion of differentially expressed genes (DEGs) compared with controls (comparison to the young healthy donor: HGPS: 115; HGPS-L: 286; APS: 95 DEGs; comparison to the aged healthy donor: HGPS: 98; HGPS-L: 233; APS: 91 DEGs, Fig S3A). In hiPSCs, we did not identify any specifically dysregulated pathways in disease samples, even when considering DEGs that are shared between conditions. As anticipated in the absence of *LMNA* expression in pluripotent cells, this confirms that cell reprogramming erases differences between samples carrying or not *LMNA* mutations, as previously reported (22, 27, 28).

In MSCs, HGPS and HGPS-L are clustered with the aged healthy donor, whereas APS cells are clustered with the young control (Fig 2A). Compared with hiPSCs, we found a higher number of DEGs in MSCs with a 4.8-fold increase in the number of DEGs between hiPSCs and MSCs (comparison to the young healthy donor: HGPS: 452; HGPS-L: 1192; APS: 297 DEGs; comparison to the aged healthy donor: HGPS: 587; HGPS-L: 1999; APS: 324 DEGs; Fig S3B). As expected, this increase in DEGs proportions is likely stemming from the

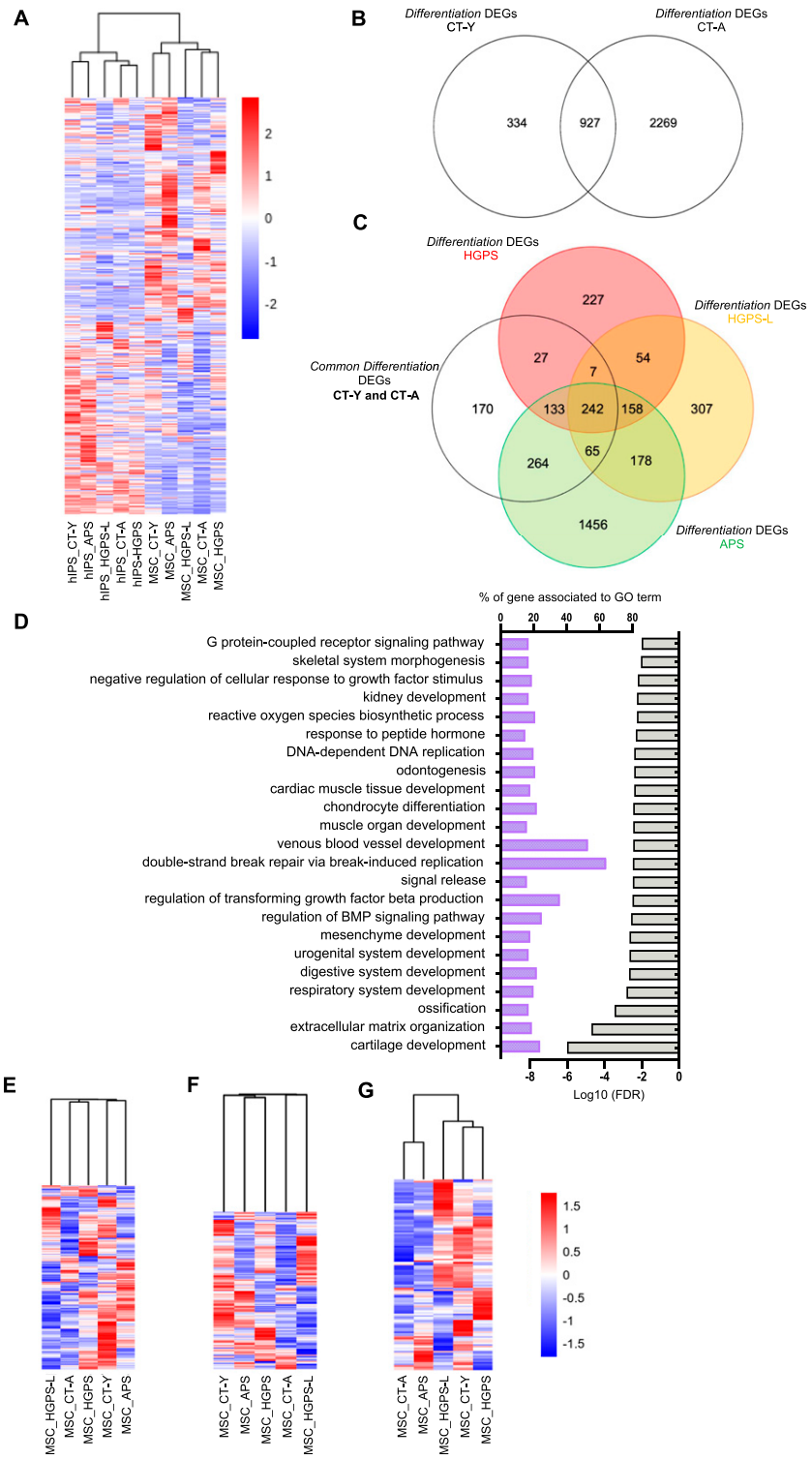


Figure 2. Transcriptome analysis of hiPSCs and differentiated mesenchymal stem cells (MSCs) from individuals carrying *LMNA* mutations.
(A) Heatmap representing the transcriptome of hiPSCs and hiPSCs-derived MSCs from progeroid patients. Analysis was performed in triplicate for most samples (CT-Y; CT-A; Hutchinson–Gilford progeria syndrome [HGPS] and atypical progeroid syndrome [APS]) and quadruplicate for HGPS-L cells. Unsupervised hierarchical clustering separates hiPSCs from MSCs. **(B)** Venn diagram between control individuals (CT-Y; CT-A). List of the differentially expressed genes during differentiation (dDEGs) were generated by comparing the transcriptome of hiPSCs to MSCs to their respective controls. We report 334 and 2269 dDEGs restricted to either control (CT-Y, CT-A; respectively) and 927 dDEGs shared between both controls. **(C)** Venn diagram of the overlap between dDEGs generated by comparing transcriptome of hiPSCs to MSCs in each pathological condition (HGPS, HGPS-L, and APS) and the dDEGs shared in controls (found in B). **(D)** Biological processes (BP) associated with dDEGs and common to all laminopathies determined using Gene Ontology (GO). dDEGs were determined as reported in respective panels (CT-Y versus pathology). Bar plots are shown with GO terms and associated percentage of genes along with the *P*-value adjusted FDR. **(E, F, G)** Unsupervised hierarchical clustering heatmap for mitochondrial (E), DNA damages (F) and telomeric (G) genes in MSCs. Analysis was performed in triplicate for most samples (CT-Y; CT-A; HGPS and APS) and quadruplicate for HGPS-L cells.

accumulation of defects caused by *LMNA* mutations during the differentiation process. At P7, comparison between conditions failed to identify any relevant pathway, probably because of the high ratio of housekeeping genes and accumulation of unspecific defects caused by the expression of *LMNA* mutants among the DEGs.

To focus on alterations occurring at early differentiation stages, concomitant with the expression of pathogenic lamin isoforms

(progerin, lamin Δ35), we compared MSCs to their respective hiPSCs and retrieved DEGs specific to each line dubbed thereafter *differentiation* DEGs (dDEGs). For controls and independently of the donor's age, comparison between hiPSCs and MSCs retrieved 927 dDEGs (Fig 2B), thus considered as the physiological genes impacted by differentiation. We next compared these 927 dDEGs to dDEGs retrieved for each group of patients. We found 227 dDEGs in HGPS; 307 in HGPS-L, and 1,456 dDEGs in APS (Fig 2C). Using dDEGs across all pathological conditions versus controls, Gene Ontology (GO) analysis identified processes enriched for genes related to DNA replication (>60%), vascular and mesenchymal development (50% and >20%, respectively), and TGFβ regulation (40%) (Fig 2D). Interestingly, the most significant pathway in this analysis corresponds to cartilage development and organization of the ECM (20% enrichment; Fig 2D). Further GO analysis of dDEGs specific to each group of patients identified pathways related to VEGFR signaling for HGPS, several tissues/organs development in HGPS-L, or DNA replication for APS (Fig S3C).

Previous works performed in HGPS fibroblasts highlighted defects in mitochondria, DNA repair, and telomeres (9, 29, 30, 31), all associated with physiological aging (32). We thus analyzed separately DEGs that belong to these three pathways in MSCs. For genes encoding mitochondrial proteins (Fig 2E) and genes involved in DNA damage response (Fig 2F), unsupervised clustering revealed a difference between controls (young and old) and pathological samples consistent with the increase in mitochondrial network defects and DNA damage observed upon aging (32). For both biological processes, the APS line was closer to the young control as also observed when all DEGs were considered (Fig 2A). On the opposite, the analysis of DEGs corresponding to telomere-related genes (Fig 2G) revealed a clustering between APS cells and the aged control, whereas the young control was associated with HGPS and HGPS-L cells. Overall, this suggests differences in the expression profile of genes related to those three aging-associated processes between the different progeroid syndromes.

Cells from prematurely aging patients show an overall altered DNA methylation profile

Given the links between *LMNA* gene mutations and chromatin regulation (33), we next investigated whether changes in gene expression correlate with alterations in DNA methylation in controls and cells from prematurely aged patients. To this aim, we profiled the genome-wide DNA methylation patterns of the different MSCs samples (hiPSC-derived MSCs), using the Illumina Infinium EPIC methylation assay after sodium bisulfite DNA modification. This assay that covers 850,000 CpG sites throughout the genome provides the methylation profile of the coding genome, regulatory elements, and also the noncoding genome with probes distributed in intergenic regions and gene bodies (29% and 37%, respectively), 5′ UTR (8%) and CpG located within 200 bp or 1,500 bp from transcription start sites (TSS, 12% and 8%, respectively) (34). For each probe, the methylation level of CpGs covered by the array was determined with a 99% confidence by calculating the median DNA methylation β-values and SD between samples groups (Fig 3A). Probes with an absolute mean Δ β-values of 0.2 (20%) between controls and patients were considered as differentially methylated (DMP, differentially methylated probe) (35). Depending on the samples, we observed between 70,497 and 137,900 DMPs in pathological samples compared with controls with a global trend toward hypermethylation (Fig 3A and Table S2) that is more pronounced when comparison is made with the young donor (Fig 3B and C; CT-Y; HyperM APS, 65.5%; HGPS, 83.2%; HGPS-L, 79%) than with the aged donor (CT-A; 39% for APS, 59.15% for HGPS, and 61.43% for HGPS-L). For all comparisons, we noticed a lower proportion (15–20%) of hypermethylated probes when APS cells are compared with the young donor but a higher proportion (~20%) compared with the aged donor (Fig 3C). By comparing the percentage of probes covered by the array and categorized by CpG content using the Illumina annotations, we noticed a decreased proportion of hypermethylated probes corresponding to gene regulatory regions, that is, CpG islands, first exon TSS1500, and TSS200 (Figs 3D and E and S4A and B and Tables S3 and S4), in agreement with findings from others using different cellular models (e.g., bone marrow–derived MSCs) (36). The percentage of hypermethylated probes for open seas and intergenic regions (isolated CpG) is increased, whereas hypomethylated DMPs are localized within shores (at the border of CpG islands). Consistent with earlier observation, this trend was less pronounced in APS MSCs regardless of the control used for comparison (Tables S3 and S4).

The ChromHMM track from MSCs derived from adipocytes (E025 cells, Roadmap Epigenomics Mapping Consortium) was used to predict association to functional elements (Fig 3F and G). Regardless of the control used, methylation changes affect only slightly heterochromatin but more globally enhancer elements (Fig 3F and G and Table S5). We observed a decreased proportion of hypermethylated probes for actively transcribed regions regardless of the control used for comparison but a marked increase in the percentage of hypermethylation for quiescent genes in comparison to the young donor (Table S4). This feature might be associated with aging, as reported by a previous study (36), because the repartition of CpGs associated to quiescent genes is similar between patients and the aged donor (about 18% of hyper- and hypomethylated DMPs, Table S5).

Methylation changes mainly concern lamina-associated domains in patients with premature aging

Reports in HGPS fibroblasts suggest that genes dysregulated in premature aging syndromes are mostly enriched in lamin-associated domains (LADs) (37, 38). To whether this is the case in the different disease contexts, we specifically analyzed DEGs and DMPs that correspond to LADs. Comparison of genes covered by the RNA-Seq analysis (n = 60,733 from GENCODE annotation) to the list of DEGs (from MSCs) in each condition and their respective distances to LADs did not reveal any massive enrichment of genes located close to LADs (median distance in all conditions = 1.7 Mb; Fig S5A). However, plotting DMPs to their respective distance from LADs identified two groups. The first group comprises HGPS, HGPS-L, and the aged donor cells (CT-A); the second group, the APS together with the young donor cells (APS, CT-Y; Figs 4 and S4C), as for the transcriptome analysis (Fig 2A). Within LADs, the group corresponding to HGPS, HGPS-L, and the aged donor displayed a high and narrow peak for highly methylated probes, visible as a fixed

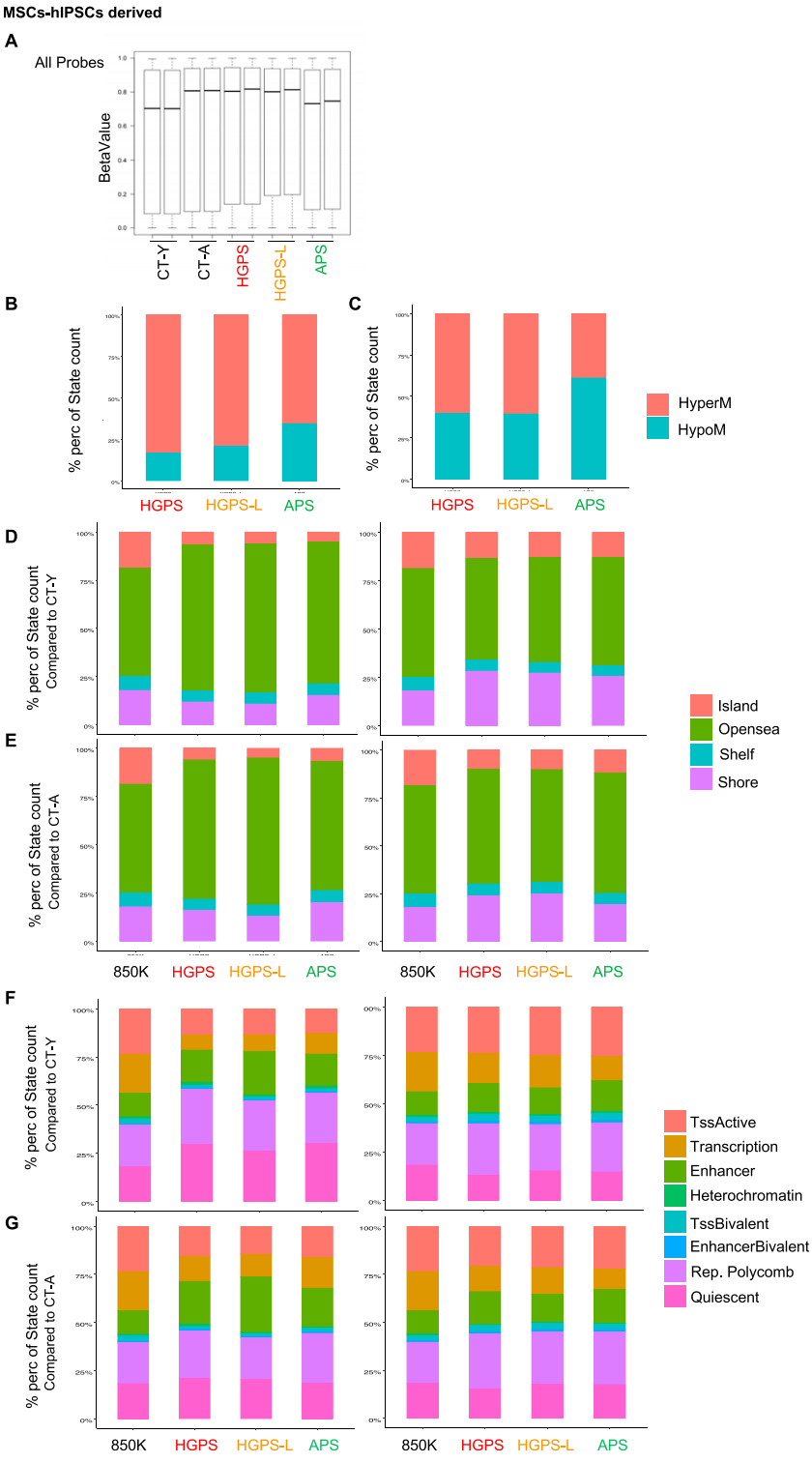


Figure 3. Analysis of global methylation in hiPSC-derived mesenchymal stem cell (MSC).
(A) Median of methylation Beta values for all CpG probes in the different conditions. Median is represented by the black bar. **(B, C)** Stacked barplots representing the distribution of differentially methylated probes in patient cells (MSCs) compared with healthy young (B) and aged (C) donor cells (*P*adj < 0.05 and abs(Δ*β*) > 0.2). **(D)** Stacked barplots representing the distribution of hypermethylated (left) and hypomethylated (right) probes relative to CpG islands, shores (2 kb flanking CpG islands), shelves (2 kb extending from shores), or open seas (isolated CpG in the rest of the genome) in patients compared with young donor cells (CT-Y; *P*adj < 0.05 and abs(Δ*β*) > 0.2). **(E)** Stacked barplots representing the distribution of hypermethylated (left) and hypomethylated (right) probes relative to CpG islands, shores (2 kb flanking CpG islands), shelves (2 kb extending from shores), or open seas (isolated CpG in the rest of the genome) in patients compared with aged donor cells (CT-A; *P*adj < 0.05 and abs(Δ*β*) > 0.2). **(F)** Stacked barplots representing the distribution of hypermethylated (left) and hypomethylated (right) probes analyzed for REMC (Roadmap Epigenomics Mapping Consortium) features for adipose-derived MSC cultured cells (E025), in patients compared with young donor cells (CT-Y). Features with similar characteristics were pooled for better visualization on the plot. (*P*-value < 0.05 and abs(Δ*β*) > 0.2). **(G)** Stacked barplots representing the distribution of hypermethylated (left) and hypomethylated (right) probes analyzed for REMC (Roadmap Epigenomics Mapping Consortium) features for adipose-derived MSC cultured cells (E025), in patients compared with aged donor cells (CT-A). Features with similar characteristics were pooled for better visualization on the plot. (*P*-value < 0.05 and abs(Δ*β*) > 0.2). In all stacked barplots presented (D, E, F, G), we report the distribution given by the whole EPIC Array (850k probes, Illumina).

yellow region associated with a superior median value of methylation at LADs (Fig 4B, CT-A); whereas the second group (APS, CT-Y) exhibited a lower and more spread methylation profile, illustrated by two yellow regions and a lower median value at LADs when compared with others (Fig 4A, CT-Y; Welch two-sample t-test $P < 2.2 \times 10^{-16}$ for all pathologies compared with controls). We further confirmed these observations by comparing group effect, as defined by Cohen's test (i.e., d < 0.2: no effect), across conditions, CT-Y

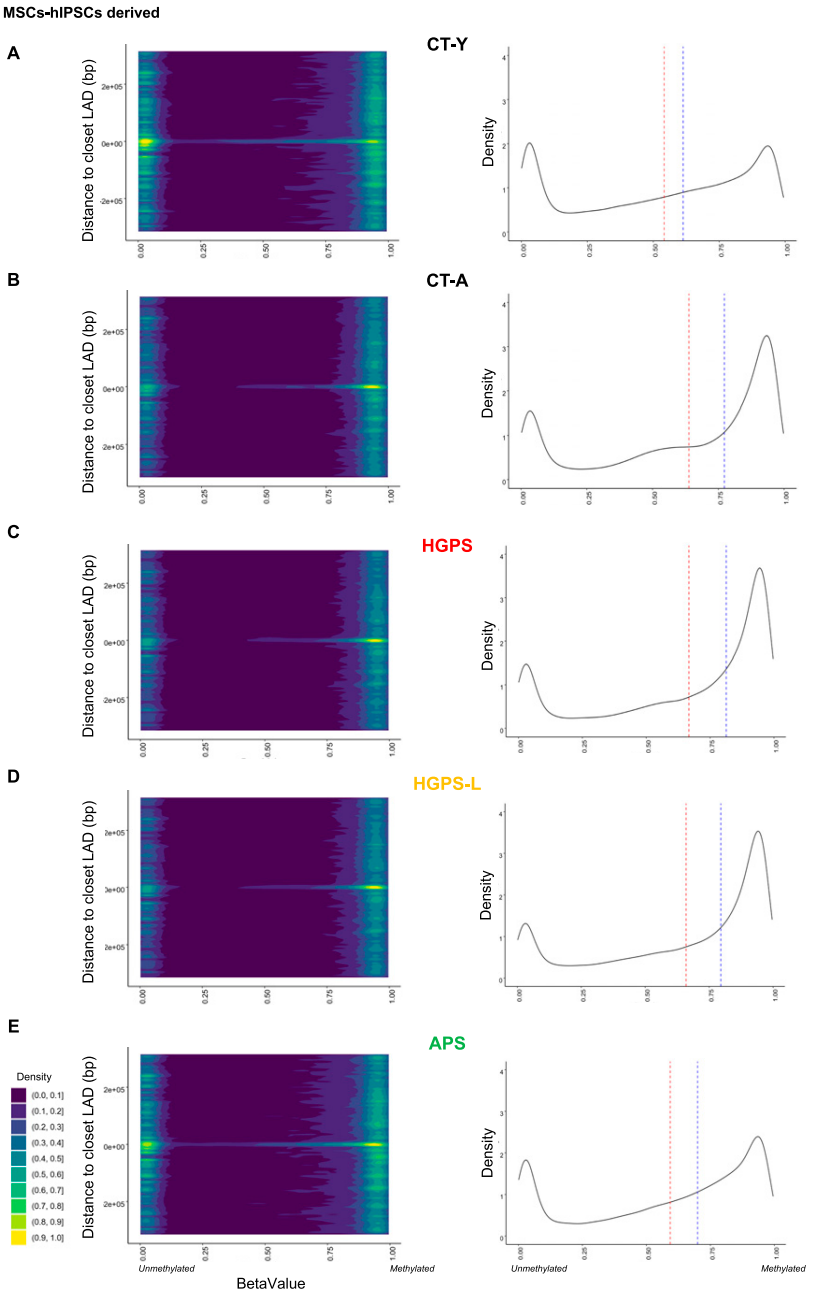


Figure 4. DNA methylation regarding lamin-associated domains in hiPSC-derived mesenchymal stem cells.
2D density plots of distances to closest LAD and associated probe methylation (left panels) and density plot of betavalue (methylation) of probes located within LADs (right panels). **(A, B, C, D, E)** We report results from the young control (CT-Y, A); aged control (CT-A, B), progeria (Hutchinson–Gilford progeria syndrome, C), progeria-like (Hutchinson–Gilford progeria syndrome-L, D), and atypical progeroid (atypical progeroid syndrome, E) samples; respectively. For 2D density plots, we report all probes located within ±315 kb of LADs (n = 167,848 probes) that successfully passed the QC threshold (GSM1313397). Probes located within LADs are associated to 0. Probe density is represented by a color scale where yellow represents the highest density. Methylation levels are reported by their associated betavalue where 0 report unmethylated probes; 1 fully methylated. For density plot located in LADs (n = 81,842 probes), dashed red line indicates mean methylation; dashed blue line indicates median methylation. We report a higher density of unmethylated probes at LADs in CT-Y and atypical progeroid syndrome hiPSC-derived mesenchymal stem cells as seen by a yellow signal at 0 on both axis in their 2D density plot panels (left panels) and further confirmed by a lower median axis (blue dashed lines) in the density plot at LAD (right panels).

versus HGPS (d = 0.4), CT-Y versus HGPS-L (d = 0.4), CT-Y versus APS (d = 0.2). Of note, because of an overrepresentation of CpGs within LADs (n = 81,842, 10% of total), we performed a similar analysis, keeping only CpGs outside of LADs. Again, we note an identical distribution of groups with immediate LAD shores mostly hypo-methylated in APS and CT-Y samples compared with HGPS, HGPS-L, and CT-A (Fig S4C).

Overall, our comparison of MSCs from patients with premature aging, and accumulating or not progerin or truncated prelamin A, suggests that in these cells, *LMNA* splice mutations (HGPS and HGPS-L) or point mutations (APS) have different consequences on the epigenetic and transcriptomic landscape with HGPS and HGPS-L cells more closely resembling to cells from an aged donor than APS cells.

Selective gene deregulation through differentiation in MSCs

To further delineate the impact of *LMNA* mutations in MSCs, we selected a subset of genes involved in pathways related to MSC differentiation (Figs 2D and 3C; n = 8) and performed RT-qPCR at P7. We analyzed expression of *GTF2H2* (DNA repair); *FOXC1* and *FOXC2* (mesenchyme development); *COL1A1* and *COL1A2* (cartilage

development); *TBX20* (heart development); and *TGFB2* or *FGFR2* (growth signaling cascade) in the samples analyzed by RNA-Seq and additional ones (HGPS, n = 3; HGPS-L, n = 1; APS, n = 3). We confirmed significant differences in gene expression between MSCs from healthy donors and patients (Fig S5B). Down-regulation of *FOXC1* is restricted to APS cells ($P < 0.05$; Kruskal–Wallis test). *COL1A1* and *COL1A2* are down-regulated in cells producing progerin or truncated prelamin A (HGPS; HGPS-L, $P < 0.01$; Kruskal–Wallis test) but up-regulated in APS cells ($P < 0.01$; Kruskal–Wallis test). Next, we analyzed the kinetics of expression of these genes at different passages to ask whether gene modulations in patients (i.e., linked to progerin or truncated prelamin A accumulation) might be a consequence of the differentiation process. Strikingly, in APS cells, *FOXC1* expression increases transiently at P4, whereas *FOXC1* expression seems to increase gradually in all other conditions. Likewise, *COL1A1* and *COL1A2* expression increases between passages, with the exception of *COL1A2* in APS cells that displayed a steady expression (Fig S5C). These observations suggest that defects observed at P7 could be the consequences of early events already in place at P2 (HGPS; HGPS-L) and persisting throughout differentiation. However, in APS cells, changes in gene expression might be more transient (*FOXC1*, P4). For some candidates (*FGFR2*, *TBX20*, and *TGFB2*), the trend of modulation (up- or down-regulation) is not consistent between samples, suggesting variation in the differentiation process.

One could hypothesize that the accumulation of nuclear abnormalities along with accumulation of progerin or truncated prelamin A progressively impacts chromatin organization and gene expression. This would result in a stochastic expression of genes in cell populations from each independent differentiation replicate, in agreement with our observations on transcriptomic data (39, 40).

Premature aging linked to the *LMNA* gene mutations leads to increased nuclear anomalies and DNA damage response, with different impacts on telomere erosion

Our previous analyses revealed an unpredicted clustering between pathologies with APS separated from HGPS and HGPS-L and confirmed that gene expression, chromatin structure, and their respective links to LADs profile are impacted by the consequences of mutations in the *LMNA* gene (Figs 2 and 4). We thus further investigated the main pathways evidenced in all MSCs (e.g., control, n = 2; HGPS, n = 3; HGPS-L, n = 1; APS, n = 3). As nuclear abnormalities are a hallmark of HGPS primary cells (41), we first evaluated the percentage of MSCs presenting nuclear deformations in the different samples at P7. This passage corresponds to the highest percentage of MSCs in each population and the presence of progerin in HGPS and lamin Δ35 isoform in HGPS-L cells. On average, the young control displayed 8% (±SD = 1) of cells with nuclear abnormalities (Fig 5A and B). This rate increases significantly ($P < 0.0001$; Tukey's multiple comparisons test) in the aged control (Mean ± SD: 27% ± 16), HGPS (45% ± 26), and APS (56% ± 21) and reached a maximum of 72% (±SD = 3) for HGPS-L cells.

In a second step, we quantified DNA double-strand breaks (DSB) by performing γH2AX staining. Concomitant with the expression of progerin and accumulation of nuclear abnormalities (Fig 5A), we observed a significant increase in γH2AX foci in HGPS, HGPS-L, and APS cells compared with controls ($P < 0.0001$, Holm-Sidak's multiple comparisons test; Fig 5C and D). By considering more specifically the accumulation of γH2AX foci at telomeres, we found a marked and significant increase in telomere induced foci (TIFs) in the different diseases compared with controls ($P < 0.01$ for HGPS; $P < 0.0001$ for HGPS-L and APS; Holm-Sidak's multiple comparisons test) that correlates with the loss of telomeric signal in HGPS but not in HGPS-L and APS (Fig 5D).

Overall, these results indicate that despite the suppression of age-related markers (i.e., DNA damage, nuclear defects) by reprogramming, production of mutated A-type lamins during MSC differentiation recapitulates the cellular defects observed in primary patient's cells with an even higher rate of age-associated defects in HGPS-L and APS cells compared with HGPS.

MSCs from patients with premature aging display an altered mitochondrial pattern

Increased DNA damage response and repair (DDR) and accumulation of reactive oxygen species (ROS) associated with altered mitochondrial pattern has been reported in HGPS cells (42, 43, 44, 45) but never investigated in APS and HGPS-L. To further address whether cellular stress and DNA damage correlates with mitochondrial defects, we analyzed the mitochondrial network of MSCs by confocal microscopy after staining with mitotracker. After 3D image reconstruction using the Imaris software (Bitplane), we counted cells with a normal mitochondrial pattern (Fig 5E and F) and cells in which this pattern is modified, that is, segmented, reduced, or clustered around the nucleus. In young control MSCs, more than 90% of cells (Mean ± SD: 97% ±4) displayed well-organized mitochondrial networks around the nucleus with spreading throughout the cytoplasm. In agreement with earlier report on mitochondrial aging (46, 47), the number of cells with a fragmented mitochondrial network increases significantly in MSCs from the aged healthy donor (51% ± 54, $P < 0.0001$; Tukey's multiple comparisons test). In cells from patients with premature aging (HGPS, HGPS-L and APS), the mitochondrial network presented distinctive patterns and appeared more fragmented and concentrated at the periphery of the nucleus in APS, HGPS, and more particularly in HGPS-L cells (87% ± 16, $P < 0.0001$; Tukey's multiple comparisons test). Consistent with previous findings (9), our data further show that mitochondrial defects occur at early stages and are present in precursor MSCs with possible repercussion in final differentiation toward the different MSC-derived lineages (i.e., adipocytes and osteocytes).

Altogether, our data showed common hallmarks in MSCs derived from patients with premature aging syndromes linked to *LMNA* mutations (DNA damage response and nuclear and mitochondrial abnormalities), regardless of the type of mutation, but possibly linked to different pathways depending on the presence (HGPS, HGPS-L) or absence (APS) of truncated prelamin A isoforms, including progerin.

Discussion

For the past decade, hiPSCs have allowed to explore the etiology of a wide range of diseases, thanks to the direct in vitro modeling of

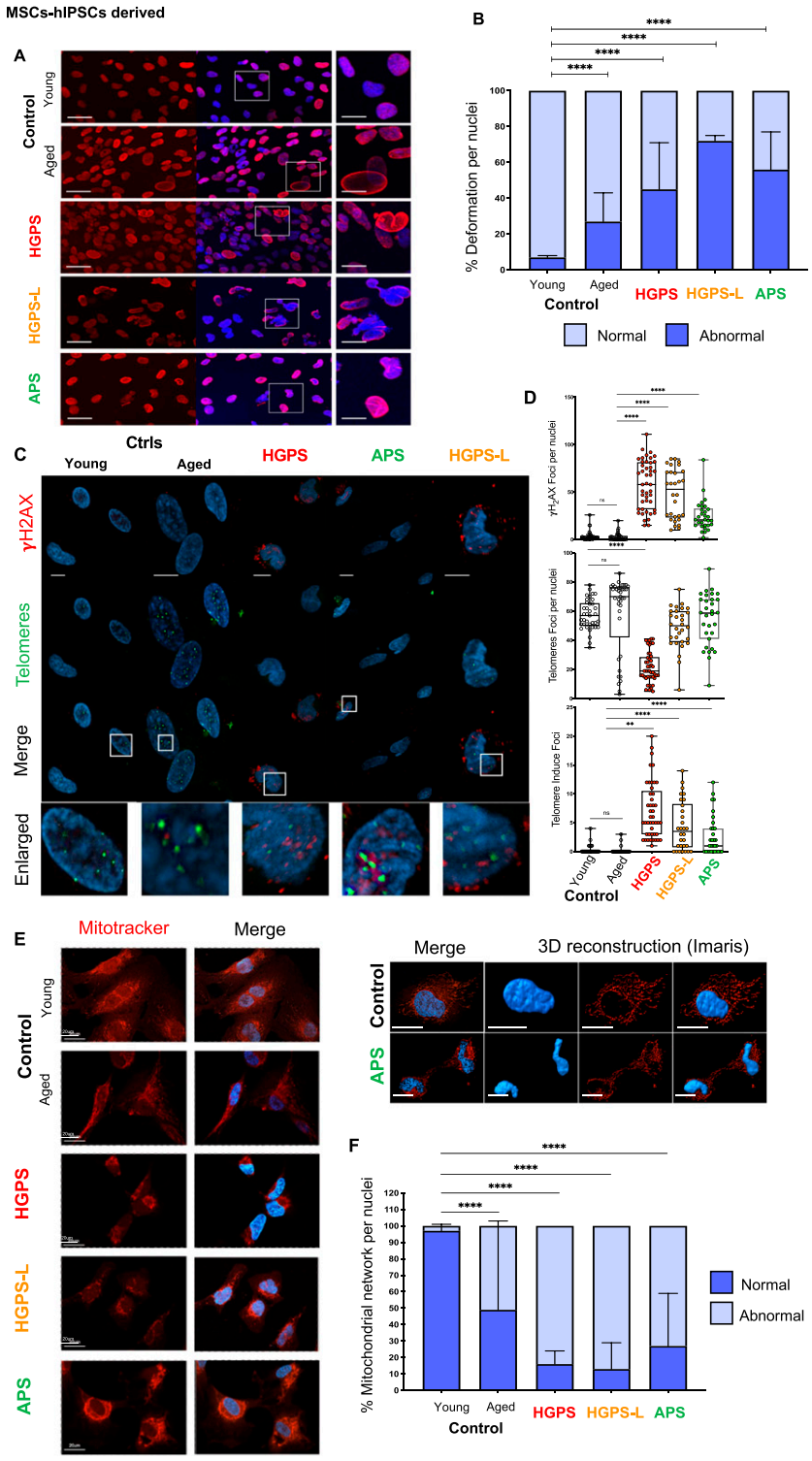


Figure 5. hiPSC-derived mesenchymal stem cells (MSCs) from patients with premature aging syndromes display hallmarks of aging.
(A) Representative Z-stack after confocal microscopy showing the distribution of lamins A/C (red) in the nucleus of hiPSC-derived MSCs (controls, Hutchinson–Gilford progeria syndrome [HGPS], HGPS-L, and atypical progeroid syndrome) at passage 7. Cells were immunostained using anti-lamin A/C antibodies and were counterstained with DAPI. Bars correspond to 30 μm (left panels) and 10 μm (right panel, enlargement) scales; respectively. **(B)** Quantification of nuclear abnormalities in hiPSC-derived MSCs. Experiments were carried in triplicates; 100 nuclei were counted per condition. The percentage of nuclear abnormalities observed was plotted. Mean ± SD are reported. Tukey's multiple comparisons test *P*-value * < 0.05; ** < 0.005; *** < 0.0005; **** < 0.0001. **(C)** Immunostaining of γH2AX foci in the different hiPSC-derived MSCs at P7 (upper panel). Telomeres were visualized using a telomeric PNA FISH probe. Telomere-induced foci (TIFs) were evidenced by overlays between γH2AX staining and telomeric signals. **(D)** For each assay, we report the number of telomeric foci, γH2AX foci along with TIFs. Experiments were carried out in duplicate with a minimum of 50 nuclei counted by condition. Mean ± SEM are reported. Significant differences are shown using the Holm-Sidak's multiple comparisons test *P*-value * < 0.05; ** < 0.005; *** < 0.0005; **** < 0.0001. **(E)** Mitochondrial network in MSCs. Staining was performed using mitotracker and counterstained with DAPI. **(F)** Quantification of cells with normal or abnormal mitochondrial patterns. Experiments were carried out either in triplicate (CT-Y, CT-A, and HGPS-L) with 100 nuclei counted per replicate (n > 300 nuclei per condition) or across biological triplicate (HGPS, atypical progeroid syndrome) with 100 nuclei counted per individual (n > 300). We report the percentage of nuclear abnormalities observed by immunofluorescence at P7; mean ± SD. Significant differences are shown using Tukey's multiple comparisons test *P*-value * < 0.05; ** < 0.005; *** < 0.0005; **** < 0.0001.

affected tissues. Nevertheless, to date, most of the information on the pathophysiology of HGPS and related premature aging syndromes comes from studies performed on patient-derived skin fibroblasts or animal models (15, 18, 29, 31, 38, 41). Besides, other mutations of the *LMNA* gene have been found in patients with characteristics of premature aging (2, 3, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21), but very little is known on the molecular consequences of lamin A alterations. A common feature of patients affected with lamin-

associated mutations is the premature aging of MSC-derived tissues (e.g., myocardium, cartilage, bones, skin, and vascular smooth muscle cells). However, the mechanisms linking the production of altered lamin A to MSC differentiation defects remain unknown. Here, using reprogrammed cells from patients affected with HGPS, progeria-like syndrome (HGPS-L) or APS, we have broadened the description of the phenotypic cellular alterations linked to causative *LMNA* mutations. Overall, we describe that the accumulation of defects associated with cellular aging is common to all samples, whereas DNA methylation profiles differ between HGPS or HGPS-L and APS MSCs.

To further identify pathways associated with MSC defects which are specific to premature aging, we performed a transcriptome analysis of the different pathological samples in hiPSCs and derived MSCs. Importantly, we set our exploration in hiPSCs with low passages as the persistent maintenance of hiPSCs might induce a drift unrelated to their associated mutations (48, 49). Likewise, all MSCs were analyzed at P7, the earliest passage where progerin and isoform (lamin Δ35) could robustly and consistently be detected. Of note, because cells were kept in culture until P12, and no differences in proliferations were observed at P7, we considered that P7 represent the best timing to investigate the impact of *LMNA* mutations with minimum bias induced by the overaccumulation of defects on cellular senescence and proliferation.

Clustering analysis of RNA sequencing data revealed massive changes in gene expression between hiPSCs and MSCs, consistent with the absence of A-type lamins expression in pluripotent stem cells and induction of gene expression upon differentiation. The low number of DEGs in control hiPSCs compared with hiPSCs from premature aging patients indicates that despite the presence of nuclear abnormalities and progerin accumulation in the primary fibroblasts, reprogramming to the pluripotent state erases most of the differences as previously reported (27), resulting in a very similar gene expression profile between patients and healthy donors.

As in hiPSCs, the lists of DEGs retrieved from hiPSC-derived MSCs did not discriminate biological pathways or samples with *LMNA* mutations from one another. An observation probably because of the cumulative effects of increased expression of *LMNA* and associated mutations (progerin and lamin Δ35) during early and late differentiation into MSCs. We thus focused on DEG retrieved from the differentiation process (dDEGs), to narrow down our analyses to the earliest (and most specific) events. Taking advantage of our transcriptome in both hIPSCs and MSCs, we generated a list of dDEGs (hIPSC versus MSC) for each sample corresponding to gene differentially expressed specifically during differentiation. Next, to interpret dDEGs in the context of diseases, we subtracted dDEGs retrieved from both controls (CT-Y; CT-A), considered as representative of the physiological differentiation process. We then obtained dDEGs respective of each *LMNA*-associated mutation, modeling the potential early lamin-associated defects. Interestingly, most dDEGs correspond to biological pathways related to the development of the mesoderm, cartilage, ECM, and response to transcription factors, consistent with defects reported on these pathologies (12, 16, 17, 20, 21). Among dDEGs, we selected a list of genes corresponding to the identified biological pathways, including two collagens (*COL1A1*, *COL1A2*) and one transcription factor (TF) involved in the development of mesenchymal tissues, bone, skin, and the cardiovascular system, *FOXC1* (50,51). We confirmed the constant down-regulation of these ECM proteins, specifically in cells producing progerin or the Δ35 isoform (HGPS and HGPS-L, respectively). Hence, a small proportion of cells producing progerin are delayed in the production of ECM proteins (COL1A1 and COL1A2). At P7, where we could detect robust progerin and isoforms production, *COL1A1* and *COL1A2* levels are still decreased, suggesting that no efficient compensation occurred. In our hands, *FOXC1* down-regulation is restricted to APS MSCs, with a transient up-regulation at P4, concomitant with the highest replication rate observed in these cells (P3 to P4). *FOXC1* is a short-lived TF (51), selectively expressed in chondrocytes (52), and involved in hair maintenance (53). Changes in gene expression suggest a disturbed process in the orchestration of TFs required for MSCs differentiation. Regulation of ECM proteins in HGPS, HGPS-L, and TF in APS remains to be investigated, including in more defined cell types as all MSCs were capable of reaching final differentiations stages and produce chondrocytes, osteoblasts, or adipocytes.

During aging, the overall level of methylation tends to decrease over time with a local hypermethylation of specific sequences (54, 55). Yet, this trend might depend on the type of cells as the opposite was reported in muscle stem cells upon aging (56). To globally evaluate the impact of *LMNA* mutations on the epigenome, we analyzed DNA methylation profiles in the different samples. Our study highlights hypermethylation of HGPS and HGPS-L patients with a similar distribution of methylated CpG probes as in the aged control cells. In APS cells, the distribution of hyper- or hypomethylated probes resemble the young control. Although reprogramming can reset the epigenetic aging clock, it has been demonstrated that a significant residual signature of the donor age remains in hiPSCs (57), whereas most can be erased by extensive hiPSCs expansion along with an increased risk of genetic alteration and epimutations (58). An overall resistance to demethylation has been observed in hiPSCs from elderly donors; in accordance with this, age-related CpGs in hiPSCs derived from older donors display increased methylation levels compared with hiPSC derived from young individuals. Because we kept our hiPSCs at low passages, this residual age-associated signature is most likely carried on in our hiPSCs, conserved upon differentiation into hiPSC-derived MSCs and explains the differences in methylation profiles observed between our young and old donors control cell lines.

Regarding probe distribution, we observed an increase in hypermethylated probes in intergenic regions and a decrease of hypermethylated probes at transcription initiation sites, consistent with previous report (36), an impact of promoter methylation on gene expression (59) and an overlap between down-regulated DEGs and aggregated hypermethylated DMPs. Accordingly, we found the highest overlap in methylation and transcription when considering down-regulated DEGs and aggregated hypermethylated DMPs (Table S6).

In all samples associated to *LMNA* mutations, we observed an altered distribution of the mitochondrial network, increased chromosomal abnormalities, and an accumulation of DNA damage

response foci associated or not with telomere erosion; all corresponding to obvious signs of aging (32). Premature aging of HGPS patients and accumulation of progerin caused by the *LMNA* c.1824C>T gene mutation summarize most of these cellular markers (13, 60). Increase in telomere induced foci (TIF) correlates with the loss of telomere signals (61, 62). Consistently, by comparing telomeres in HGPS-derived MSCs to an age-matched control and cells derived from a healthy 82-yr-old donor (CT-A), we observed that the drastic decrease in the number of telomere signals in HGPS cells associates with accumulation of double-strand DNA breaks as a response to DNA damage. Telomere erosion is not as marked in HGPS-L cells and APS cells. In these cells, the *LMNA* mutations are paralleled with accumulation of γH2AX foci at telomeres, suggesting telomere attrition. However, in these cells (HGPS-L, APS), the number of telomere signals does not decrease significantly (e.g., no significant loss of telomere ends), whereas the number of TIFs is increased. This might further indicate either a slower rate of telomere erosion, a high number of cells with critically short telomeres but a lower number of cells with telomere loss (i.e., no signal) or telomere uncapping. Of note, we did not evidence any change in the expression level of genes encoding proteins forming the shelterin complex (Fig 2G), including TRF2 that interacts with A-type lamins but not with progerin (63), in HGPS, HGPS-L, APS contexts. Intriguingly, compared with HGPS and HGPS-L cells, we did not observe any change in APS MSCs replication rate, accumulation of nuclear abnormalities, or DNA damage foci except for TIFs. Thus, this suggests converging pathways that seem unrelated to DNA damage and senescence as replication rates remains similar, even long after initiation of differentiation followed by the maintenance of cells in culture (P12) but potentially linked to TFs and/or methylation patterns, as highlighted above.

The main cause of DNA damage and telomere erosion, apart from replication, is the accumulation of ROS. In the literature, it is widely accepted that the primary source of ROS is the mitochondria, as a normal by-product of the respiratory chain (64). We observed a modification of the mitochondrial network with a condensed and concentrated mitochondrial network distribution in the periphery of the nucleus in patients, whereas controls showed a more diffuse distribution across the cytoplasm. In addition, our RNA-Seq analyses showed that several genes encoding mitochondrial proteins are differentially expressed in patient cells and the elderly control when compared with the young control. Importantly, all our observations (nuclear shapes, DNA damage, and mitochondrial network) are made under basal conditions. Further studies are needed to fully grasp changes detected across pathologies. This might include the use of stressor and protector of DNA damage or ROS and antioxidant (mitochondrial network). Depending on their associate *LMNA* mutations, differences observed could be erased (because of resilience) or exacerbated.

Overall, we showed that mutations in *LMNA* leading to premature aging, associated or not with progerin or other truncated prelamin A isoforms accumulation, impact processes related to DNA structure (methylation and DNA damage), nuclear shape, and mitochondria. All of them are hallmark features of aging and occur at early stages of differentiation of MSCs. In addition, beyond progerin clearance, our work suggests that ECM defects supporting differentiation could be at play in HGPS, whereas transcription factor seems transiently affected in APS. Furthermore, our work describes common aberrant features between pathologies and hiPSC-derived MSCs from an old donor with the exclusion of DNA methylation. Indeed, hiPSC-derived MSCs from APS patients and the young donor share similar DNA methylation pattern, suggesting that DNA methylation might not be a key factor in premature aging. This observation is complementary to previous work (22, 36) but requires a higher number of samples (we report 7 *LMNA*-associated pathologies and two controls) before additional speculations, because of potential compensations in APS cells for example.

As recently performed in mice (10, 65), future studies using our cellular model could assess current leading treatments for HGPS (e.g., farnesyl transferase inhibitor and rapamycin analog to promote clearance) and their potential effects in associated *LMNA* diseases (HGPS-L), including in the absence of progerin accumulation (APS). Taking advantage of hiPSCs and their derived MSCs, treatment could be performed as early as possible during the differentiation process to appreciate if one can reverse modestly (or completely) aging hallmarks (nuclear abnormalities, DNA damage) as recently suggested (66) and reported in in vitro (14) and in vivo models (10, 65, 67).

Although HGPS and HGPS-L cells may display the cumulative impact of progerin (or other toxic isoforms), APS cells, which do not produce progerin, exhibit an early disturbed differentiation process that ultimately leads to the same cellular aberrations, opening new grounds for understanding tissue-specific defects in premature but also physiological aging.

Materials and Methods

Human ethics statement

Parents have provided written informed consent for the use of biopsies for medical research in accordance with the Declaration of Helsinki. Samples were provided by the Center for biological Resources (Department of Medical Genetics, La Timone Children's Hospital) with the AC 2011-1312 and N°IE-2013-710 accreditation numbers (Table S7).

Induced pluripotent stem cells (iPSC) generation

Isolated primary fibroblasts were reprogrammed into iPS cells as reported elsewhere (24, 68) using the OKSM cocktail. For each reprogramming, at least 10 clones were collected. Two clones were fully validated for each sample for alkaline phosphatase activity, expression of pluripotency markers (flow cytometry and RT-qPCR), chromosomal stability (karyotyping), and the capacity for each clone to differentiate and generate embryoid bodies expressing markers of the three embryonic lineages. All iPSC cells used in this study fulfilled these criteria. Colonies were grown and expanded in mTeSR1 medium (Stemcells) on BD Matrigel (BD Biosciences, Cat. no. 354277) coated dishes.

MSC differentiation

HiPSC-derived MSCs were grown on poly-D-lysine (1 mg/ml)–pretreated culture dishes coated with fibronectin (0.1%; Sigma-Aldrich). For differentiation, IPS cells were plated in mTesR medium at day 1. At day 2, the medium was switched to a mixture composed of TesR and Knock-Out DMEM (KO-DMEM) basal media (1: 1). KO-DMEM was supplemented by FBS (15%; Life Technologies), GlutaMAX (1×; Life Technologies), nonessential amino acids (1×; Life Technologies), antibiotics (penicillin, streptomycin), and β-mercaptoethanol (50 μM). Medium was supplemented with thiazovivin (5 μM; StemCell), β-FGF (10 ng/ml; Peprotech), and L-ascorbic acid-2-phosphate (1 mM; Sigma-Aldrich). At day 3, cells were switched to a KO-DMEM medium supplemented with 15% FBS, thiazovivin (5 μM; StemCell), basic FGF (10 ng/ml; Peprotech), and L-ascorbic acid-2-phosphate (1 mM; Sigma-Aldrich). Cells were split at 90% confluency with accutase (StemCell).

Flow cytometry

Cells were treated with accutase (StemCells) and counted with a KOVA glass slide (Thermo Fisher Scientific). Cells were then spun at 500*g* for 5 min and resuspended in a buffer composed of PBS (1×) supplemented with FBS (2.5%; Life Technologies) and sodium azide (0.1%) at 1milion cells per ml. We used 100 μl of cells (100,000 cells) per condition. Antibodies were added to each tube and incubated for 2 h at RT (protected from light) then washed thoroughly with FACS buffer for a total of 3 × 5 min washes.

For hiPSCs characterization, SSEA4, Tra-1-60, and TRA-1-81 antibodies were used. For MSCs, we used CD105 (Endoglin, 12-1057-42; Thermo Fisher Scientific), CD90 (Thy1, 559869; BD Biosciences), and CD73 (ecto-5′-nucleotidase, 550257; BD Bioscience) as positive markers and CD45 (563204; BD Biosciences) with CD34 (561440BD; Biosciences) antibodies as negative hematopoietic lineage marker. We used an isotype control for each condition corresponding to the fluorochrome of the antibody. Cells positively labeled for both CD73 and CD105 cells were considered as MSCs. Subsequent experiments in this study using MSCs were only performed using populations of cells that reached >80% of positive ($CD73^+$; CD105+) cells per condition.

Immunofluorescence assay

Immunofluorescence assays were performed as followed: cells were grown on cover slides and fixed for 10 min with 4% paraformaldehyde diluted in 1× PBS. After PBS washes (3 × 5 min), cells were incubated for 15 min at RT in a permeabilization solution (0.5% Triton X-100 in PBS) before incubation for 2 h at 37°C in a blocking solution (2 mg/ml BSA in PBS). Cells were then incubated overnight at 4°C in a blocking solution containing the primary antibodies (anti-lamin A/C; 1:100, Sc6215; Santa Cruz, anti-γH2AX 1:250, ab11174; Abcam). After three washes with PBS/0.1% Tween (3 × 5 min), slides were incubated for 45 min at RT with the secondary antibody (Alexa Fluor 1:500) in PBS 1× supplemented with BSA (1 mg/ml). Slides were mounted in VECTASHIELD with DAPI (Vector Laboratories), and images acquired using a confocal imaging system (LSM800; Zeiss).

TIFs

Cells were grown on cover slides and fixed for 10 min on ice with 4% paraformaldehyde in 1× PBS. After PBS washes (3 × 5 min), cells were incubated for 1 h at RT in blocking solution (1% Triton X-100, 1% BSA, 5% donkey serum in PBS). To perform the PNA-FISH staining, cells were washed twice with SSC2X for 5 min at RT and subsequently treated with RNase A for 45 min at 37°C. After an additional SSC2X wash (5 min, 4°C), cover slides were dried and incubated upside-down with a hybridization solution containing the PNA probe (20 μl H2O; 70 μl formamide; 7 μl 10% blocking B [Roche]; 1 μl 1M Tris, pH 7.2; 1 μl probe) and sealed on coverslips using rubber cement. Slides were then heated at 85°C for 4 min and incubated in the dark at 37°C in a humidification chamber for 2 h. After removal of the rubber cement, cells were serially washed in three different solutions: twice for 15 min at RT with washing solution I (10 mM Tris, pH 7.2; 70% formamide); twice for 15 min at RT with washing solution II (150 mM NaCl; 50 mM Tris, pH 7.2; 0.05% Tween 20); and twice with 1× PBS for 5 min at RT. Cells were then blocked for 1 h with the blocking solution and immunostained overnight at 4°C in the blocking solution containing the primary rabbit polyclonal anti-53BP1 antibody (1:500; Novus Biologicals). After three washes with PBS/0.1% Triton X-100, slides were incubated for 1 h 30 min at RT with Alexa 555 Donkey anti-rabbit secondary antibody in PBS containing 0.5% Triton X-100, 1% BSA, 2.5% donkey serum. Slides were mounted in VECTASHIELD with DAPI (Vector Laboratories). Images were taken using a confocal system (LSM800; Zeiss). Co-localization events, representing telomeric DNA damages (TIFs), were counted in at least 30 nuclei per condition from three independent experiments using the IMARIS software.

Western blot

Cells were collected by centrifugation and stored at 1 million cells per aliquot at −80°C for future use. Cell lysis was carried out using a lysis buffer composed of Tris–HCl, pH 7 (100 mM), EDTA (10 mM), glycerol (10%), and SDS (10%). Samples were then frozen at −80°C and thawed for a total of three cycles and finally stored at −80°C. Before loading, samples were diluted in migration buffer composed of cell lysate (5–50 μl), lithium dodecyl sulfate (LDS; 1: 4), and DTT (Dithiotreitol; 1:10) in ddH_2O. Samples were then heated at 95°C for 10 min. Next, samples were run on a polyacrylamide gel (bis-Tris 4–12%; Life Technologies), according to manufacturers' recommendations. Migration buffer was made freshly (20× MOPS buffer, 1:20; Life Technologies) in ddH_2O. Samples were run for 90 min at 100V and 40 mA. After migration, proteins were transferred to a polyvinylidene fluoride membrane (PVDF) activated with 100% ethanol. The transfer was carried out in a transfer tank filled with transfer buffer (ethanol 1:10 in 1× transfer buffer; Life Technologies) at 30V, 400 mA for 1 h. Then, membranes were rinsed in PBS-T (Tween 20 0.05% in PBS 1×) and incubated in blocking buffer for 1 h (Tween 20, 0.05% in 5% milk PBS). Membranes were then incubated at 4°C overnight with primary antibody solutions prepared in 5% milk in PBS-T, anti-lamin A/C (1:100, Sc6215; Santa Cruz), and anti-progerin (1:100, ab66587; Abcam). Membranes were washed in PBS-T (4 × 5 min) and then incubated 1 h at RT with secondary antibodies against appropriate species Alexa Fluor 488-555 (1:1,000; Abcam).

Last, membranes were washed in PBS-T (4 × 5 min), and pictures were taken using a BioRad Chemidoc Imaging System. Normalizations and quantifications were performed using the ImageJ software which calculates the ratio between the fluorescence of the loading control and the protein of interest, after background extraction.

RNA extraction and RT-qPCR

RNA extraction was realized using the QIAGEN's RNeasy mini kit. Briefly, reverse transcription of 1 μg of total RNA was performed using the Superscript III kit and oligo dT following manufacturer's instructions at 42°C for 50 min followed by inactivation at 70°C for 15 min (Life Technologies). Primers were designed using Primer Blast. PCR amplification was performed on a LightCycler 480 (Roche) using the SYBR green master mix with the following program: preincubation at 95°C for 10 min then 40 cycles amplification each corresponding to 15 s at 95°C followed by 1 min at 60°C. The program ends with a merge step including a step of a second at 98°C, 30 s at 70°C and finally 10 s at 98°C.

Crossing-threshold (Ct) values were normalized by subtracting the geometric mean of three housekeeping genes (*GAPDH*, *PPIA*, and *HPRT1*). All Ct values were corrected by their PCR efficiency, determined by 1:2 or 1:4 cDNA dilution series. Results were treated with the GraphPad software (prism V8.0) for statistical tests (ANOVA, Kruskal–Wallis multiple comparison test; α set at 0.05). Only *P*-values less than 0.05 were considered as statistically significant. All analyses were carried out in biological duplicates and technical duplicates. Primer sequences are provided as supplemental information.

RNA sequencing

After extraction, RNA quality was controlled by a bioanalyzer and quantified using QuBit. RNA sample with a RIN >8 was considered for sequencing with 1 μg used per condition. For sequencing the universal plus, mRNA-seq from NuGEN was used for preparation of poly-A RNAs libraries. The same bioinformatics analysis was applied for both datasets of RNA-Seq generated from two sequencing cores: Integragen using TruSeq Stranded Total RNA-Illumina/Illumina HiSeq 4000 (2 × 75 bp) (2017) and GBiM using mRNA universal Nugen-Tecansur kit/Illumina NextSeq 500 (2 × 75 bp) (2018). A total of 39 samples were analyzed. Sequencing reads were aligned to the Human genome reference GRCh38 using STAR v2.5.3a (69). Files indexes were generated with Sambamba (v0.6.6), and aligned reads on genes (GENCODE) were quantified using Stringtie (v1.3.1c). Finally, DEGs between conditions were identified with the R package DESeq2 (v1.18.1). Overrepresentation test analyses were performed using enrichGO from the R package clusterProfiler (v3.10.1) (70). DEG identified in RNA-seq with an FDR-adjusted *P*-value < 0.05 and abs($\log_2$FC) > 2 were used as input. Identified GO terms in biological process ontology were selected based on an FDR-adjusted *P*-value < 0.05. Heatmaps were obtained thanks to the pheatmap (v1.0.12) R package using TPM values.

RNA-seq data and raw count matrix were deposited at the NCBI Gene Expression Omnibus (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/) under the complete SuperSeries accession number GSE202369 (RNASes, GSE202364; EPIC Array 850K, GSE202368).

Infinium MethylationEPIC array

Genome-wide DNA methylation analysis was performed by Infinium MethylationEPIC Array through Diagenode services. Genomic DNA was extracted using the NucleoSpin Tissue kit (Macherey-Nagel) from two different cell pellets for each sample. A minimum of 500 ng was sent to Diagenode services for DNA methylation analysis. The analysis was mainly carried out using the R package ChAMP (71). Probes with missing values are removed, samples with more than 10% of probes with a detection *P*-value greater than 0.01, probes with a detection *P*-value greater than 0.01 in at least one sample, and probes for which 5% of samples have a bead count less than three are filtered out. An annotation file is loaded that contains information about the location of probes—such as chromosome, position, and nearby genes (72). Probes targeting CpG sites that are near SNPs, belong to X/Y chromosomes, or align with multiple locations are filtered out. A matrix of methylation β values is returned. The β-value indicates the percentage of copies of a CpG site from a given sample that were methylated (73) determined for each CpG location as the relative intensity of methylated signal (M) and unmethylated signal (U) (35).

Samples from the different groups were compared with identify DMPs based on a significantly different average methylation level at CpG site. The ChAMP function for identifying DMPs uses the limma package (74). A 0.2 absolute difference in mean β values ($\Delta\beta$) was used to identify DMPs (75). The ComBat method was used to correct for batch effects (74). Heatmaps were realized using the pheatmap (v1.0.12) R package using β value matrix for methylation. Violin plots were realized by converting β-value matrix to M-value (for better visualization) using the lumi (v2.42.0) R package then by plotting values using the ggplot2 (v3.3.3) R package. DMPs with an FDR-adjusted *P*-value < 0.05 and an abs($\Delta\beta$) > 0.2 were represented as bar plots using the ggplot2 (v3.3.3) R package for genomic features and CGI status according to Illumina EPIC array annotation file. Comparisons were made relative to the REMC (Roadmap Epigenomics Mapping Consortium) features for EO25 adipose-derived MSC cultured cells. Corrected betavalue matrix along with closest distance to lamin A LADs (GSM1313397) for annotated probes in EPIC array were used to create 2D density plot using ggplot2 (v3.3.3) R package.

Availability of Data and Material

All data supporting the findings of this study are available; further information is available within the supplementary section of this manuscript. Materials are available upon request.

Ethics approval and consent to participate

Parents have provided written informed consent for the use of biopsies for medical research in accordance with the Declaration of Helsinki. Samples were provided by the Center for Biological Resources (Department of Medical Genetics, La Timone Children's Hospital) with the AC 2011-1312 and No IE-2013-710 accreditation numbers.

Supplementary Information

Supplementary information is available at https://doi.org/10.26508/lsa.202201501.

Acknowledgements

We are indebted and thank all patients for participating in this study. Source of funding: This study was funded by "Association Française contre les Myopathies," AFM Telethon (AFM; TRIM-RD), Aix Marseille University Initiative of Excellence (A*Midex, VinTAge project), and the INSERM-Agemed cross-cutting program. K Annab was the recipient of a fellowship from the French Ministry of Education and Fondation pour la Recherche Médicale (FDT 20170437114). Study sponsors had no role in study design, collection analysis, data interpretation, writing of the report, or decision to submit the paper for publication.

Author Contributions

JP Trani: data curation, formal analysis, validation, investigation, and writing—review and editing.
R Chevalier: data curation, software, formal analysis, validation, and writing—review and editing.
L Caron: data curation, formal analysis, validation, investigation, and writing—review and editing.
C El Yazidi: validation and methodology.
N Broucqsault: validation and methodology.
L Toury: formal analysis.
M Thomas: validation and methodology.
K Annab: validation, investigation, and methodology.
B Binetruy: conceptualization, funding acquisition, and writing—review and editing.
A De Sandre-Giovannoli: resources and writing—review and editing.
N Levy: resources and funding acquisition.
F Magdinier: conceptualization, data curation, formal analysis, supervision, funding acquisition, project administration, and writing—review and editing.
JD Robin: conceptualization, data curation, formal analysis, supervision, validation, investigation, methodology, project administration, and writing—original draft, review, and editing.

Conflict of Interest Statement

The authors declare that they have no conflict of interest.

Author Contribution

JP Trani performed most of the experiments presented in the report and analyzed the data.

RC performed the bioinformatics data analysis.

N Broucqsault, L Caron, LT, and K Annab set up the differentiation assay and performed some experiments.

C El Yazidi and M Thomas produced or provided pluripotent stem cells.

B Binetruy participated in the study design.

A De Sandre-Giovannoli provided patient's samples, designed the study, and contributed to the edition of the manuscript.

N Levy provided patient's samples, designed the study, and obtained funding.

FM supervised the study, analyzed the data, wrote the manuscript, and obtained funding.

JDR performed some of the experiments, analyzed the data, and wrote and edited the manuscript.

References

1. Steele-Stallard HB, Pinton L, Sarcar S, Ozdemir T, Maffioletti SM, Zammit PS, Tedesco FS (2018) Modeling skeletal muscle laminopathies using human induced pluripotent stem cells carrying pathogenic LMNA mutations. *Front Physiol* 9: 1332. doi:10.3389/fphys.2018.01332
2. Kang S-M, Yoon M-H, Park B-J (2018) Laminopathies; Mutations on single gene and various human genetic diseases. *BMB Rep* 51: 327–337. doi:10.5483/bmbrep.2018.51.7.113
3. Petillo R, D'Ambrosio P, Torella A, Taglia A, Picillo E, Testori A, Ergoli M, Nigro G, Piluso G, Nigro V, et al (2015) Novel mutations in LMNA A/C gene and associated phenotypes. *Acta Myol* 34: 116–119.
4. Earle AJ, Kirby TJ, Fedorchak GR, Isermann P, Patel J, Iruvanti S, Moore SA, Bonne G, Wallrath LL, Lammerding J (2020) Mutant lamins cause nuclear envelope rupture and DNA damage in skeletal muscle cells. *Nat Mater* 19: 464–473. doi:10.1038/s41563-019-0563-5
5. Merideth MA, Gordon LB, Clauss S, Sachdev V, Smith ACM, Perry MB, Brewer CC, Zalewski C, Kim HJ, Solomon B, et al (2008) Phenotype and course of Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *N Engl J Med* 358: 592–604. doi:10.1056/nejmoa0706898
6. Eriksson M, Brown WT, Gordon LB, Glynn MW, Singer J, Scott L, Erdos MR, Robbins CM, Moses TY, Berglund P, et al (2003) Recurrent de novo point mutations in lamin A cause Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Nature* 423: 293–298. doi:10.1038/nature01629
7. De Sandre-Giovannoli A, Bernard R, Cau P, Navarro C, Amiel J, Boccaccio I, Lyonnet S, Stewart CL, Munnich A, Le Merrer M, et al (2003) Lamin a truncation in Hutchinson-Gilford progeria. *Science* 300: 2055. doi:10.1126/science.1084125
8. Harhouri K, Navarro C, Depetris D, Mattei M-G, Nissan X, Cau P, De Sandre-Giovannoli A, Levy N (2017) MG132-induced progerin clearance is mediated by autophagy activation and splicing regulation. *EMBO Mol Med* 9: 1294–1313. doi:10.15252/emmm.201607315
9. Elouej S, Harhouri K, Le Mao M, Baujat G, Nampoothiri S, Kayserili H, Menabawy NA, Selim L, Paneque AL, Kubisch C, et al (2020) Loss of MTX2 causes mandibuloacral dysplasia and links mitochondrial dysfunction to altered nuclear morphology. *Nat Commun* 11: 4589. doi:10.1038/s41467-020-18146-9
10. Cao K, Graziotto JJ, Blair CD, Mazzulli JR, Erdos MR, Krainc D, Collins FS (2011) Rapamycin reverses cellular phenotypes and enhances mutant protein clearance in Hutchinson-Gilford progeria syndrome cells. *Sci Transl Med* 3: 89ra58. doi:10.1126/scitranslmed.3002346
11. Halaschek-Wiener J, Brooks-Wilson A (2007) Progeria of stem cells: Stem cell exhaustion in Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 62: 3–8. doi:10.1093/gerona/62.1.3
12. Zhang J, Lian Q, Zhu G, Zhou F, Sui L, Tan C, Mutalif RA, Navasankari R, Zhang Y, Tse H-F, et al (2011) A human iPSC model of Hutchinson Gilford Progeria reveals vascular smooth muscle and mesenchymal stem cell defects. *Cell Stem Cell* 8: 31–45. doi:10.1016/j.stem.2010.12.002
13. Scaffidi P, Misteli T (2008) Lamin A-dependent misregulation of adult stem cells associated with accelerated ageing. *Nat Cell Biol* 10: 452–459. doi:10.1038/ncb1708
14. 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. doi:10.1038/cddis.2015.374

15. Shalev SA, De Sandre-Giovannoli A, Shani AA, Levy N (2007) An association of Hutchinson-Gilford progeria and malignancy. *Am J Med Genet A* 143A: 1821–1826. doi:10.1002/ajmg.a.31803

16. Fukuchi K, Katsuya T, Sugimoto K, Kuremura M, Kim HD, Li L, Ogihara T (2004) LMNA mutation in a 45 year old Japanese subject with Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *J Med Genet* 41: e67. doi:10.1136/jmg.2003.014688

17. Barthélémy F, Navarro C, Fayek R, Da Silva N, Roll P, Sigaudy S, Oshima J, Bonne G, Papadopoulou-Legbelou K, Evangeliou AE, et al (2015) Truncated prelamin A expression in HGPS-like patients: A transcriptional study. *Eur J Hum Genet* 23: 1051–1061. doi:10.1038/ejhg.2014.239

18. Verstraeten VLRM, Broers JLV, van Steensel MAM, Zinn-Justin S, Ramaekers FCS, Steijlen PM, Kamps M, Kuijpers HJH, Merckx D, Smeets HJM, et al (2006) Compound heterozygosity for mutations in LMNA causes a progeria syndrome without prelamin A accumulation. *Hum Mol Genet* 15: 2509–2522. doi:10.1093/hmg/ddl172

19. Soria-Valles C, Carrero D, Gabau E, Velasco G, Quesada V, Bárcena C, Moens M, Fieggen K, Möhrcken S, Owens M, et al (2016) Novel LMNA mutations cause an aggressive atypical neonatal progeria without progerin accumulation. *J Med Genet* 53: 776–785. doi:10.1136/jmedgenet-2015-103695

20. Garg A, Subramanyam L, Agarwal AK, Simha V, Levine B, D'Apice MR, Novelli G, Crow Y (2009) Atypical progeroid syndrome due to heterozygous missense LMNA mutations. *J Clin Endocrinol Metab* 94: 4971–4983. doi:10.1210/jc.2009-0472

21. Luo D-Q, Wang X-Z, Meng Y, He D-Y, Chen Y-M, Ke Z-Y, Yan M, Huang Y, Chen D-F (2014) Mandibuloacral dysplasia type A-associated progeria caused by homozygous LMNA mutation in a family from Southern China. *BMC Pediatr* 14: 256–258. doi:10.1186/1471-2431-14-256

22. Frobel J, Hemeda H, Lenz M, Abagnale G, Joussen S, Denecke B, Sarić T, Zenke M, Wagner W (2014) Epigenetic rejuvenation of mesenchymal stromal cells derived from induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Rep* 3: 414–422. doi:10.1016/j.stemcr.2014.07.003

23. Wang Y, Chen J, Hu J-L, Wei X-X, Qin D, Gao J, Zhang L, Jiang J, Li J-S, Liu J, et al (2011) Reprogramming of mouse and human somatic cells by high-performance engineered factors. *EMBO Rep* 12: 373–378. doi:10.1038/embor.2011.58

24. Dion C, Roche S, Laberthonnière C, Broucqsault N, Mariot V, Xue S, Gurzau AD, Nowak A, Gordon CT, Gaillard M-C, et al (2019) SMCHD1 is involved in de novo methylation of the DUX4-encoding D4Z4 macrosatellite. *Nucleic Acids Res* 47: 2822–2839. doi:10.1093/nar/gkz005

25. Constantinescu D, Gray HL, Sammak PJ, Schatten GP, Csoka AB (2006) Lamin A/C expression is a marker of mouse and human embryonic stem cell differentiation. *Stem Cells* 24: 177–185. doi:10.1634/stemcells.2004-0159

26. Vodyanik MA, Yu J, Zhang X, Tian S, Stewart R, Thomson JA, Slukvin II (2010) A mesoderm-derived precursor for mesenchymal stem and endothelial cells. *Cell Stem Cell* 7: 718–729. doi:10.1016/j.stem.2010.11.011

27. Chen Z, Chang WY, Etheridge A, Strickfaden H, Jin Z, Palidwor G, Cho J-H, Wang K, Kwon SY, Doré C, et al (2017) Reprogramming progeria fibroblasts re-establishes a normal epigenetic landscape. *Aging Cell* 16: 870–887. doi:10.1111/acel.12621

28. Liu G-H, Barkho BZ, Ruiz S, Diep D, Qu J, Yang S-L, Panopoulos AD, Suzuki K, Kurian L, Walsh C, et al (2011) Recapitulation of premature ageing with iPSCs from Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Nature* 472: 221–225. doi:10.1038/nature09879

29. Rivera-Torres J, Acín-Perez R, Cabezas-Sánchez P, Osorio FG, Gonzalez-Gómez C, Megias D, Cámara C, López-Otín C, Enríquez JA, Luque-García JL, et al (2013) Identification of mitochondrial dysfunction in Hutchinson-Gilford progeria syndrome through use of stable isotope labeling with amino acids in cell culture. *J Proteomics* 91: 466–477. doi:10.1016/j.jprot.2013.08.008

30. Decker ML, Chavez E, Vulto I, Lansdorp PM (2009) Telomere length in Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Mech Ageing Dev* 130: 377–383. doi:10.1016/j.mad.2009.03.001

31. Aguado J, Sola-Carvajal A, Cancila V, Revêchon G, Ong PF, Jones-Weinert CW, Wallén Arzt E, Lattanzi G, Dreesen O, Tripodo C, et al (2019) Inhibition of DNA damage response at telomeres improves the detrimental phenotypes of Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome. *Nat Commun* 10: 4990. doi:10.1038/s41467-019-13018-3

32. López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G (2013) The hallmarks of aging. *Cell* 153: 1194–1217. doi:10.1016/j.cell.2013.05.039

33. Robin JD, Magdinier F (2016) Physiological and pathological aging affects chromatin dynamics, structure and function at the nuclear edge. *Front Genet* 7: 153. doi:10.3389/fgene.2016.00153

34. Moran S, Arribas C, Esteller M (2016) Validation of a DNA methylation microarray for 850, 000 CpG sites of the human genome enriched in enhancer sequences. *Epigenomics* 8: 389–399. doi:10.2217/epi.15.114

35. Bibikova M, Barnes B, Tsan C, Ho V, Klotzle B, Le JM, Delano D, Zhang L, Schroth GP, Gunderson KL, et al (2011) High density DNA methylation array with single CpG site resolution. *Genomics* 98: 288–295. doi:10.1016/j.ygeno.2011.07.007

36. Pasumarthy KK, Doni Jayavelu N, Kilpinen L, Andrus C, Battle SL, Korhonen M, Lehenkari P, Lund R, Laitinen S, Hawkins RD (2017) Methylome analysis of human bone marrow MSCs reveals extensive age- and culture-induced changes at distal regulatory elements. *Stem Cell Rep* 9: 999–1015. doi:10.1016/j.stemcr.2017.07.018

37. Sebestyén E, Marullo F, Lucini F, Petrini C, Bianchi A, Valsoni S, Olivieri I, Antonelli L, Gregoretti F, Oliva G, et al (2020) SAMMY-seq reveals early alteration of heterochromatin and deregulation of bivalent genes in Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome. *Nat Commun* 11: 6274. doi:10.1038/s41467-020-20048-9

38. Köhler F, Bormann F, Raddatz G, Gutekunst J, Corless S, Musch T, Lonsdorf AS, Erhardt S, Lyko F, Rodríguez-Paredes M (2020) Epigenetic deregulation of lamina-associated domains in Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Genome Med* 12: 46. doi:10.1186/s13073-020-00749-y

39. Lionetti MC, Bonfanti S, Fumagalli MR, Budrikis Z, Font-Clos F, Costantini G, Chepizhko O, Zapperi S, La Porta CAM (2020) Chromatin and cytoskeletal tethering determine nuclear morphology in progerin-expressing cells. *Biophys J* 118: 2319–2332. doi:10.1016/j.bpj.2020.04.001

40. Ramdas NM, Shivashankar GV (2015) Cytoskeletal control of nuclear morphology and chromatin organization. *J Mol Biol* 427: 695–706. doi:10.1016/j.jmb.2014.09.008

41. Goldman RD, Shumaker DK, Erdos MR, Eriksson M, Goldman AE, Gordon LB, 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. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 8963–8968. doi:10.1073/pnas.0402943101

42. Balaban RS, Nemoto S, Finkel T (2005) Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell* 120: 483–495. doi:10.1016/j.cell.2005.02.001

43. Richards SA, Muter J, Ritchie P, Lattanzi G, Hutchison CJ (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. *Hum Mol Genet* 20: 3997–4004. doi:10.1093/hmg/ddr327

44. Xiong Z-M, Choi JY, Wang K, Zhang H, Tariq Z, Wu D, Ko E, LaDana C, Sesaki H, Cao K (2016) Methylene blue alleviates nuclear and mitochondrial abnormalities in progeria. *Aging Cell* 15: 279–290. doi:10.1111/acel.12434

45. Torres RA, Lewis W (2014) Aging and HIV/AIDS: Pathogenetic role of therapeutic side effects. *Lab Invest* 94: 120–128. doi:10.1038/labinvest.2013.142

46. Haas RH (2019) Mitochondrial dysfunction in aging and diseases of aging. *Biology (Basel)* 8: 48. doi:10.3390/biology8020048

47. Sun N, Youle RJ, Finkel T (2016) The mitochondrial basis of aging. *Mol Cell* 61: 654–666. doi:10.1016/j.molcel.2016.01.028

48. Liang G, Zhang Y (2013) Genetic and epigenetic variations in iPSCs: Potential causes and implications for application. *Cell Stem Cell* 13: 149–159. doi:10.1016/j.stem.2013.07.001

49. Zambelli F, Mertens J, Dziedzicka D, Sterckx J, Markouli C, Keller A, Tropel P, Jung L, Viville S, Van de Velde H, et al (2018) Random mutagenesis, clonal events, and embryonic or somatic origin determine the mtDNA variant type and load in human pluripotent stem cells. *Stem Cell Rep* 11: 102–114. doi:10.1016/j.stemcr.2018.05.007

50. Ray T, Ryusaki T, Ray PS (2021) Therapeutically targeting cancers that overexpress FOXC1: A transcriptional driver of cell plasticity, partial EMT, and cancer metastasis. *Front Oncol* 11: 721959. doi:10.3389/fonc.2021.721959

51. Berry FB, Mirzayans F, Walter MA (2006) Regulation of FOXC1 stability and transcriptional activity by an epidermal growth factor-activated mitogen-activated protein kinase signaling cascade. *J Biol Chem* 281: 10098–10104. doi:10.1074/jbc.m513629200

52. Yoshida M, Hata K, Takashima R, Ono K, Nakamura E, Takahata Y, Murakami T, Iseki S, Takano-Yamamoto T, Nishimura R, et al (2015) The transcription factor Foxc1 is necessary for Ihh-Gli2-regulated endochondral ossification. *Nat Commun* 6: 6653. doi:10.1038/ncomms7653

53. Lay K, Kume T, Fuchs E (2016) FOXC1 maintains the hair follicle stem cell niche and governs stem cell quiescence to preserve long-term tissue-regenerating potential. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113: E1506–E1515. doi:10.1073/pnas.1601569113

54. Horvath S (2013) DNA methylation age of human tissues and cell types. *Genome Biol* 14: R115–R120. doi:10.1186/gb-2013-14-10-r115

55. Bell CG, Lowe R, Adams PD, Baccarelli AA, Beck S, Bell JT, Christensen BC, Gladyshev VN, Heijmans BT, Horvath S, et al (2019) DNA methylation aging clocks: Challenges and recommendations. *Genome Biol* 20: 249. doi:10.1186/s13059-019-1824-y

56. Bigot A, Duddy WJ, Ouandaogo ZG, Negroni E, Mariot V, Ghimbovschi S, Harmon B, Wielgosik A, Loiseau C, Devaney J, et al (2015) Age-associated methylation suppresses SPRY1, leading to a failure of re-quiescence and loss of the reserve stem cell pool in elderly muscle. *Cell Rep* 13: 1172–1182. doi:10.1016/j.celrep.2015.09.067

57. Lo Sardo V, Ferguson W, Erikson GA, Topol EJ, Baldwin KK, Torkamani A (2017) Influence of donor age on induced pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol* 35: 69–74. doi:10.1038/nbt.3749

58. Perrera V, Martello G (2019) How does reprogramming to pluripotency affect genomic imprinting? *Front Cell Dev Biol* 7: 76. doi:10.3389/fcell.2019.00076

59. Suzuki MM, Bird A (2008) DNA methylation landscapes: Provocative insights from epigenomics. *Nat Rev Genet* 9: 465–476. doi:10.1038/nrg2341

60. Scaffidi P, Misteli T (2006) Lamin A-dependent nuclear defects in human aging. *Science* 312: 1059–1063. doi:10.1126/science.1127168

61. Gonzalez-Suarez I, Redwood AB, Perkins SM, Vermolen B, Lichtensztejin D, Grotsky DA, Morgado-Palacin L, Gapud EJ, Sleckman BP, Sullivan T, et al (2009) Novel roles for A-type lamins in telomere biology and the DNA damage response pathway. *EMBO J* 28: 2414–2427. doi:10.1038/emboj.2009.196

62. Raz V, Vermolen BJ, Garini Y, Onderwater JJM, Mommaas-Kienhuis MA, Koster AJ, Young IT, Tanke H, Dirks RW (2008) The nuclear lamina promotes telomere aggregation and centromere peripheral localization during senescence of human mesenchymal stem cells. *J Cell Sci* 121: 4018–4028. doi:10.1242/jcs.034876

63. Wood AM, Danielsen JMR, Lucas CA, Rice EL, Scalzo D, Shimi T, Goldman RD, Smith ED, Le Beau MM, Kosak ST (2014) TRF2 and lamin A/C interact to facilitate the functional organization of chromosome ends. *Nat Commun* 5: 5467. doi:10.1038/ncomms6467

64. Sinha K, Das J, Pal PB, Sil PC (2013) Oxidative stress: The mitochondria-dependent and mitochondria-independent pathways of apoptosis. *Arch Toxicol* 87: 1157–1180. doi:10.1007/s00204-013-1034-4

65. Cabral WA, Tavarez UL, Beeram I, Yeritsyan D, Boku YD, Eckhaus MA, Nazarian A, Erdos MR, Collins FS (2021) Genetic reduction of mTOR extends lifespan in a mouse model of Hutchinson-Gilford Progeria syndrome. *Aging Cell* 20: e13457. doi:10.1111/acel.13457

66. Guilbert SM, Cardoso D, Levy N, Muchir A, Nissan X (2021) Hutchinson-Gilford progeria syndrome: Rejuvenating old drugs to fight accelerated ageing. *Methods* 190: 3–12. doi:10.1016/j.ymeth.2020.04.005

67. Cubria MB, Suarez S, Masoudi A, Oftadeh R, Kamalapathy P, DuBose A, Erdos MR, Cabral WA, Karim L, Collins FS, et al (2020) Evaluation of musculoskeletal phenotype of the G608G progeria mouse model with lonafarnib, pravastatin, and zoledronic acid as treatment groups. *Proc Natl Acad Sci U S A* 117: 12029–12040. doi:10.1073/pnas.1906713117

68. Badja C, Maleeva G, El-Yazidi C, Barruet E, Lasserre M, Tropel P, Binetruy B, Bregestovski P, Magdinier F (2014) Efficient and cost-effective generation of mature neurons from human induced pluripotent stem cells. *Stem Cells Transl Med* 3: 1467–1472. doi:10.5966/sctm.2014-0024

69. Dobin A, Davis CA, Schlesinger F, Drenkow J, Zaleski C, Jha S, Batut P, Chaisson M, Gingeras TR (2013) STAR: Ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* 29: 15–21. doi:10.1093/bioinformatics/bts635

70. Wu T, Hu E, Xu S, Chen M, Guo P, Dai Z, Feng T, Zhou L, Tang W, Zhan L, et al (2021) clusterProfiler 4.0: A universal enrichment tool for interpreting omics data. *Innovation (Camb)* 2: 100141. doi:10.1016/j.xinn.2021.100141

71. Morris TJ, Butcher LM, Feber A, Teschendorff AE, Chakravarthy AR, Wojdacz TK, Beck S (2014) ChAMP: 450k chip analysis methylation pipeline. *Bioinformatics* 30: 428–430. doi:10.1093/bioinformatics/btt684

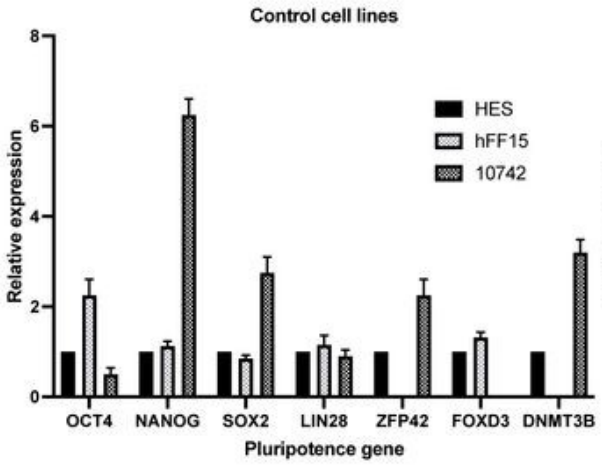
72. Butcher LM, Beck S (2015) Probe lasso: A novel method to rope in differentially methylated regions with 450K DNA methylation data. *Methods* 72: 21–28. doi:10.1016/j.ymeth.2014.10.036

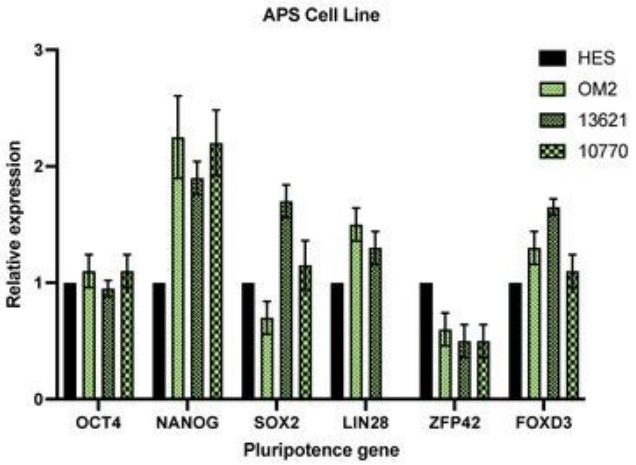
73. Du P, Zhang X, Huang C-C, Jafari N, Kibbe WA, Hou L, Lin SM (2010) Comparison of beta-value and M-value methods for quantifying methylation levels by microarray analysis. *BMC Bioinformatics* 11: 587–589. doi:10.1186/1471-2105-11-587

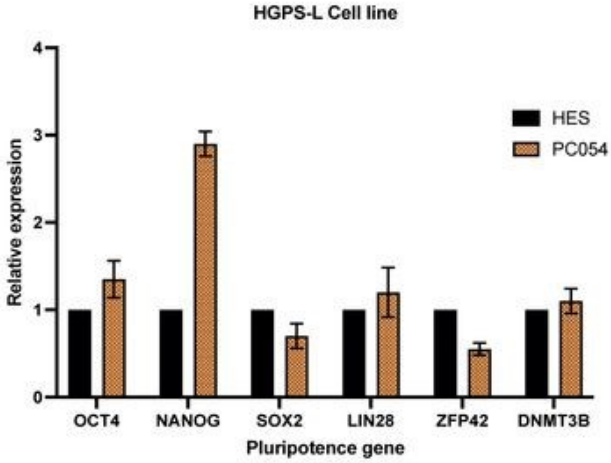
74. Ritchie ME, Phipson B, Wu D, Hu Y, Law CW, Shi W, Smyth GK (2015) Limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res* 43: e47. doi:10.1093/nar/gkv007

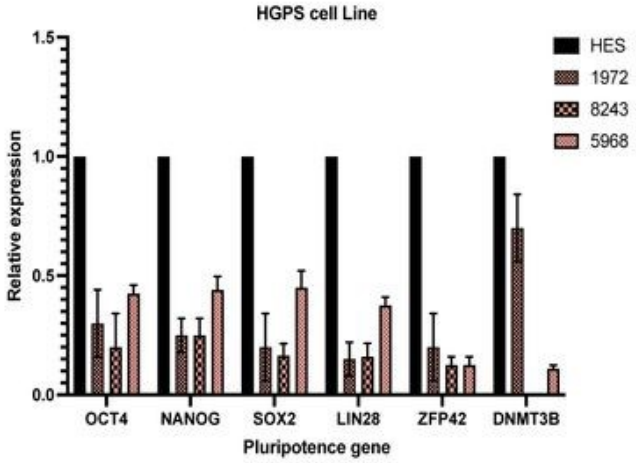
75. Smyth GK (2004) Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat Appl Genet Mol Biol* 3: 3. doi:10.2202/1544-6115.1027

License: This article is available under a Creative Commons License (Attribution 4.0 International, as described at https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).







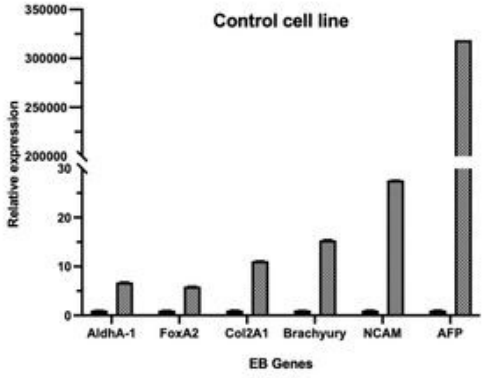


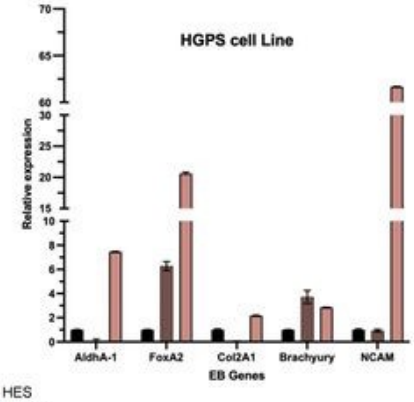
Target Name	Category	iPS hFF15	EB hFF15 J15
COL2A1	Ectoderm	0,58	17,65
PAX6	Ectoderm	0,40	75,94
AFP	Endoderm	0,00	3 280,50
FOXA2	Endoderm	0,01	0,76
HAND1	Mesoderm	0,00	50,21

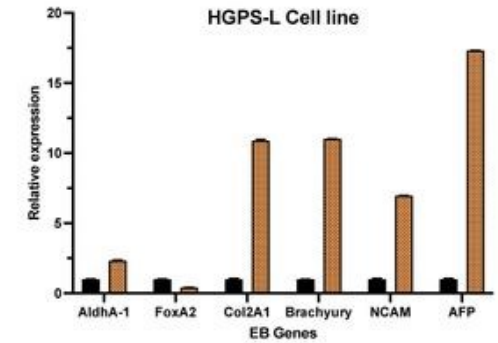
Target Name	Category	iPS 13621 TS P11	EB 13621 TS J17 P10
COL2A1	Ectoderm	2,78	41,60
PAX6	Ectoderm	0,17	539,53
AFP	Endoderm	0,01	52,90
FOXA2	Endoderm	0,02	0,25
HAND1	Mesoderm	0,03	132,43

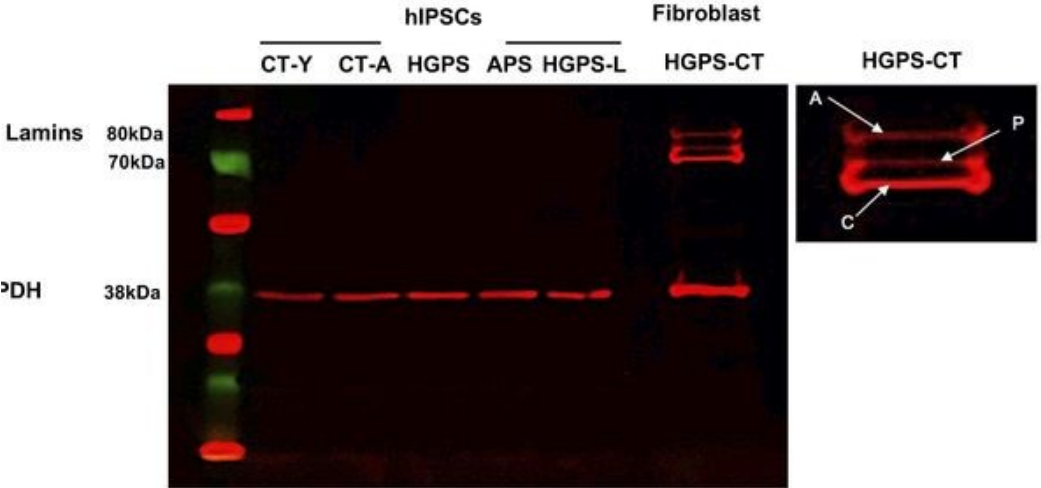
Target Name	Category	iPS OM2 P33	EB OM2 J15 P31
COL2A1	Ectoderm	4,53	34,88
PAX6	Ectoderm	3,63	424,64
AFP	Endoderm	0,00	41,33
FOXA2	Endoderm	0,07	0,05
HAND1	Mesoderm	0,02	40,91

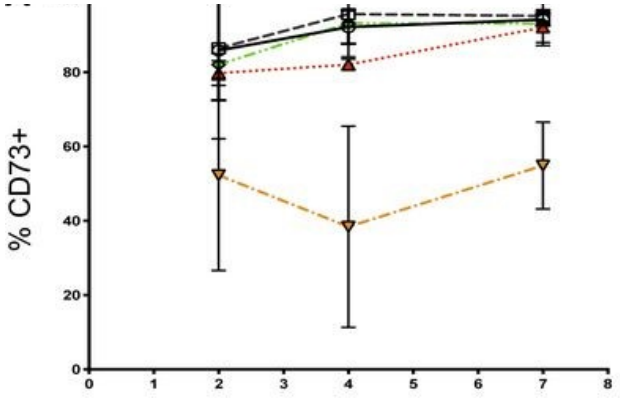
C

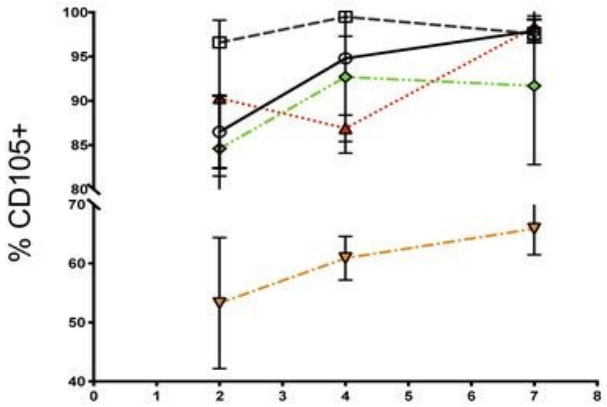


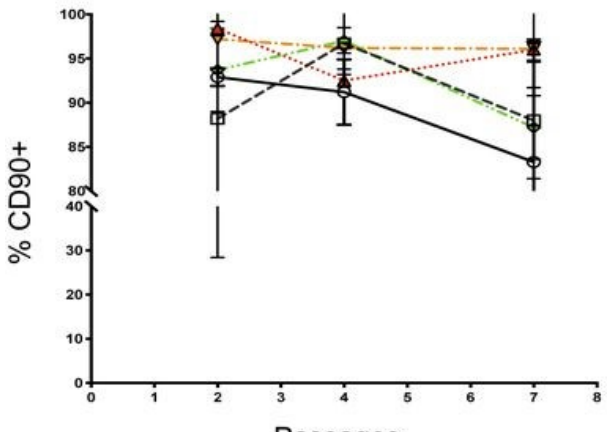




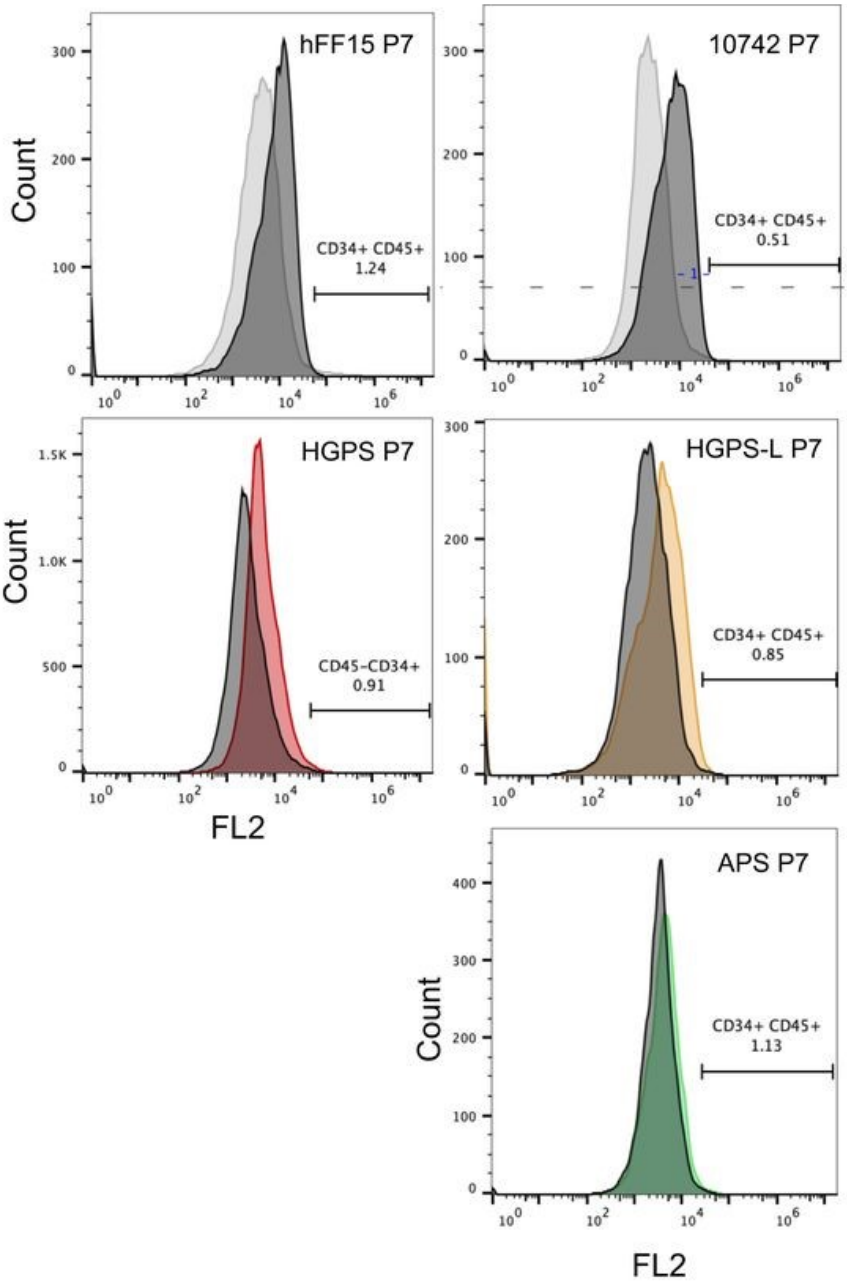



% CD73+

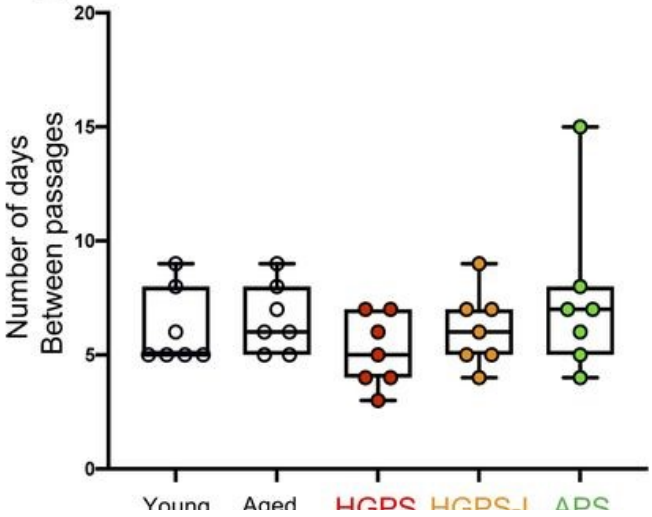

% CD105+


% CD90+
Passages

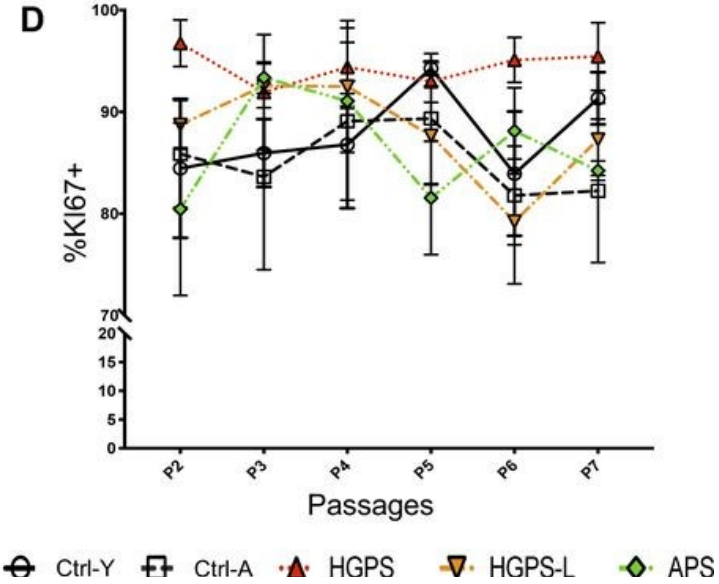

Ctrl-Y
Ctrl-A
HGPS
HGPS-L
APS

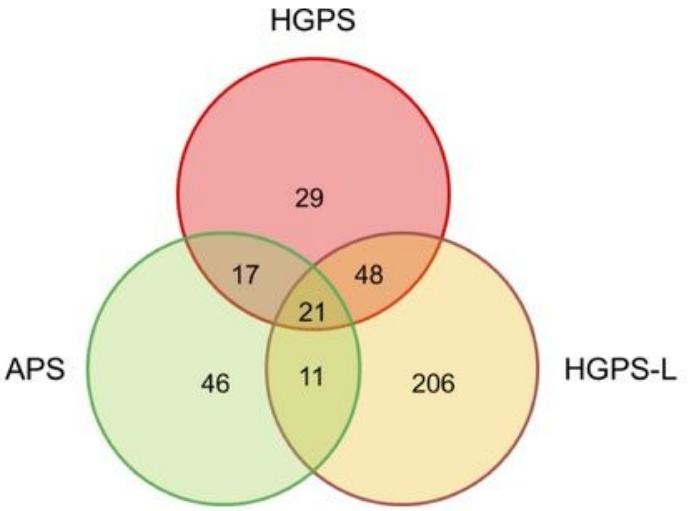

hFF15 P7
CD34+ CD45+
1.24
10742 P7
CD34+ CD45+
0.51
HGPS P7
CD45-CD34+
0.91
HGPS-L P7
CD34+ CD45+
0.85
APS P7
CD34+ CD45+
1.13
Count
FL2

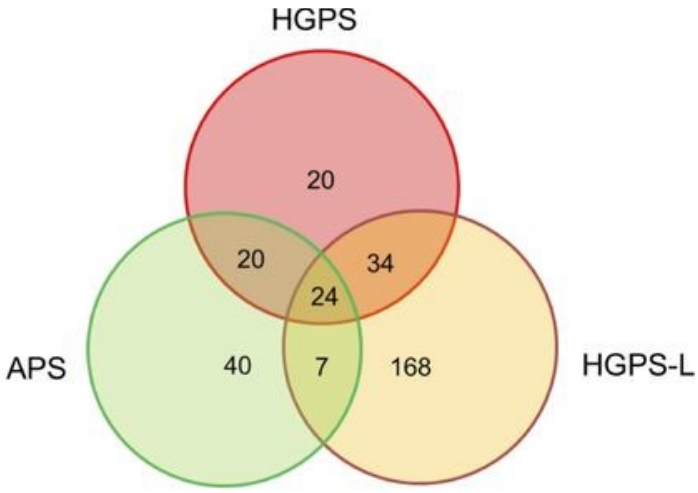
C


Number of days
Between passages
Young
Aged
HGPS
HGPS-L
APS

D

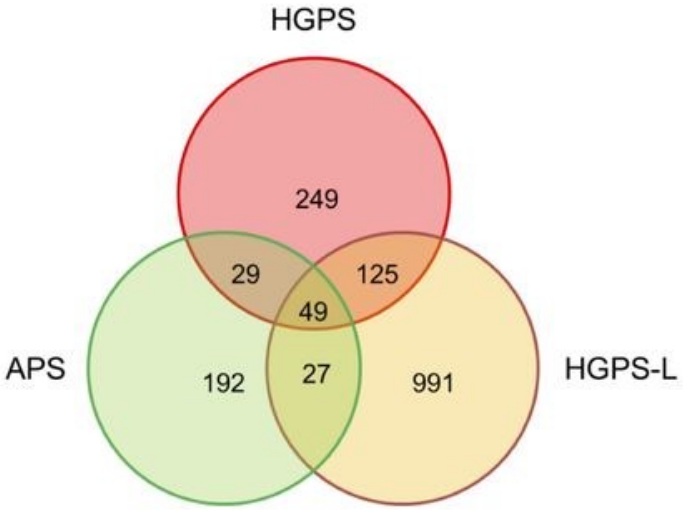

%KI67+
P2
P3
P4
P5
P6
P7
Passages
Ctrl-Y
Ctrl-A
HGPS
HGPS-L
APS



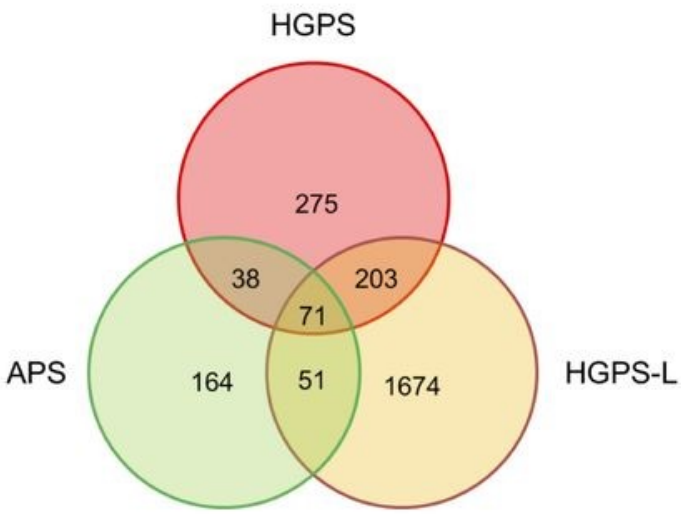


B

MSCs DEG when compared to CT-Y

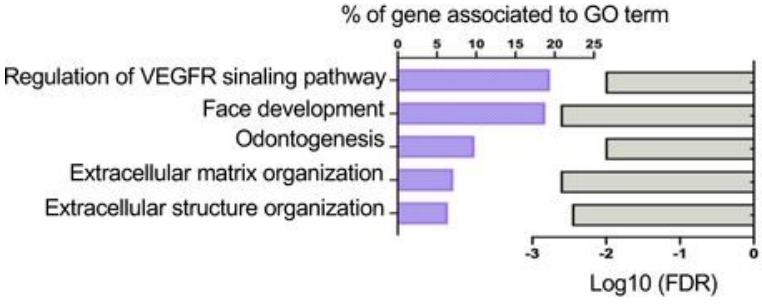


MSCs DEG when compared to CT-A

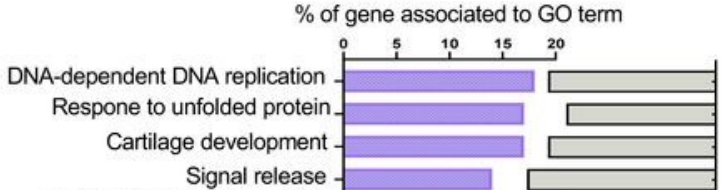


C

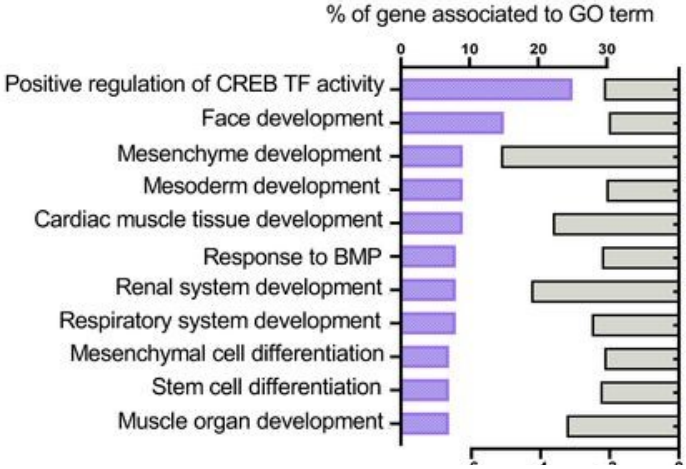
Differentiation DEG HGPS

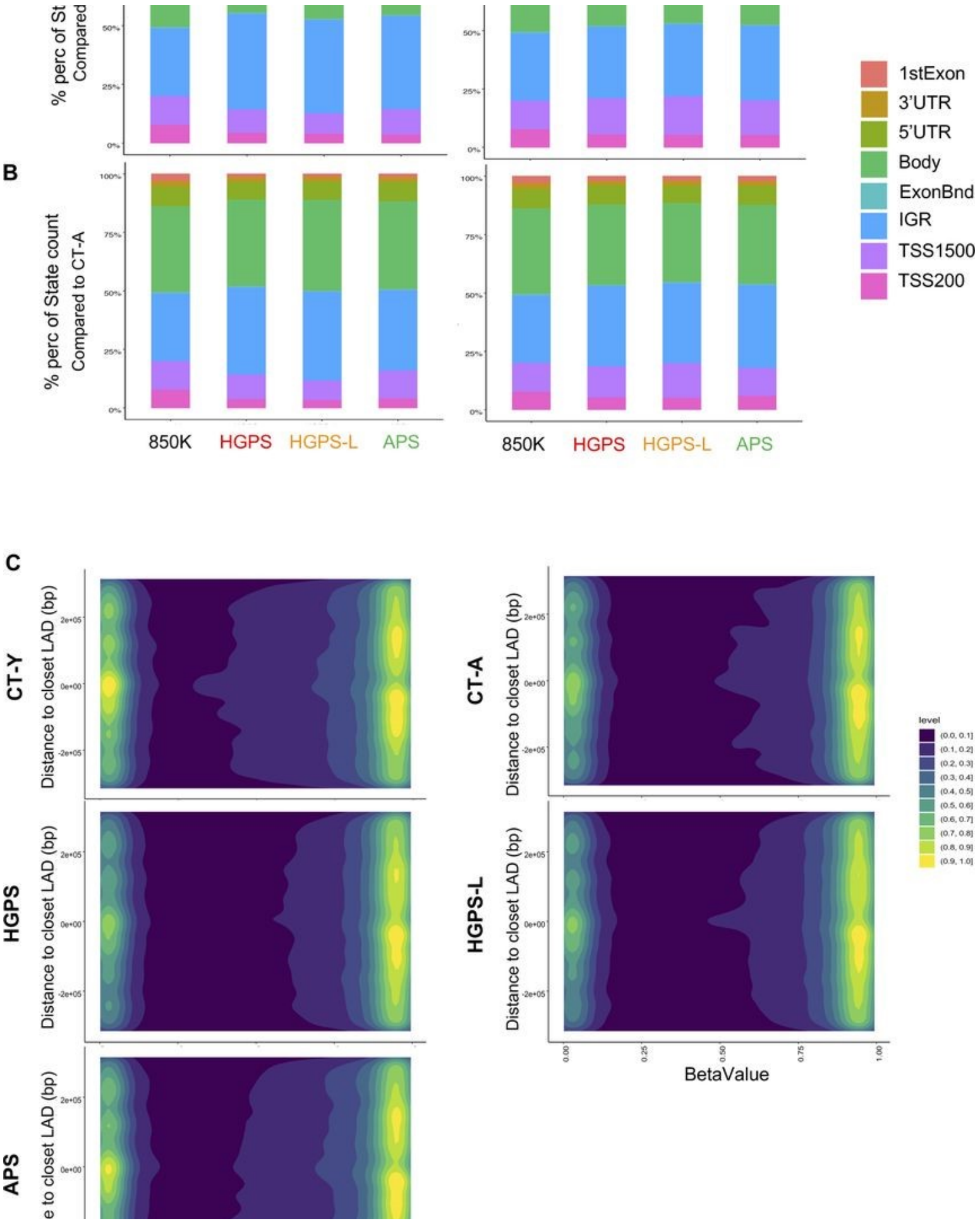


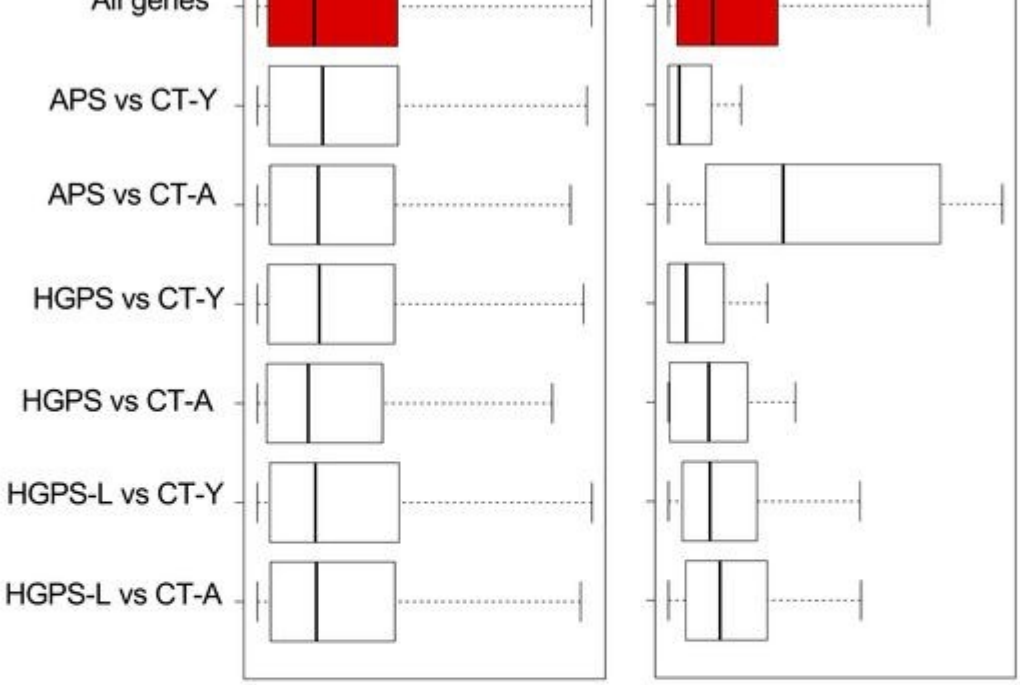
Differentiation DEG APS



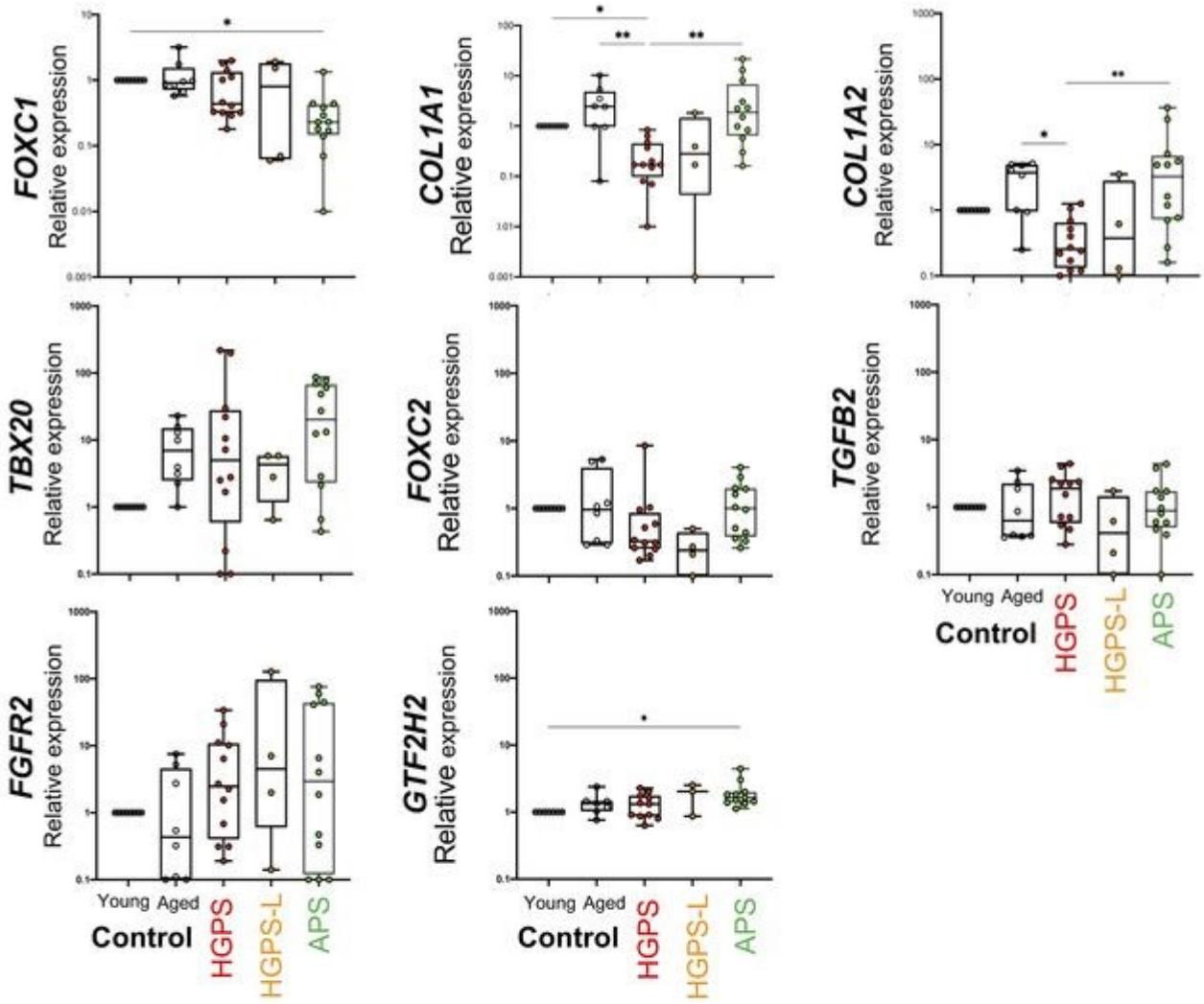
Differentiation DEG HGPS-L



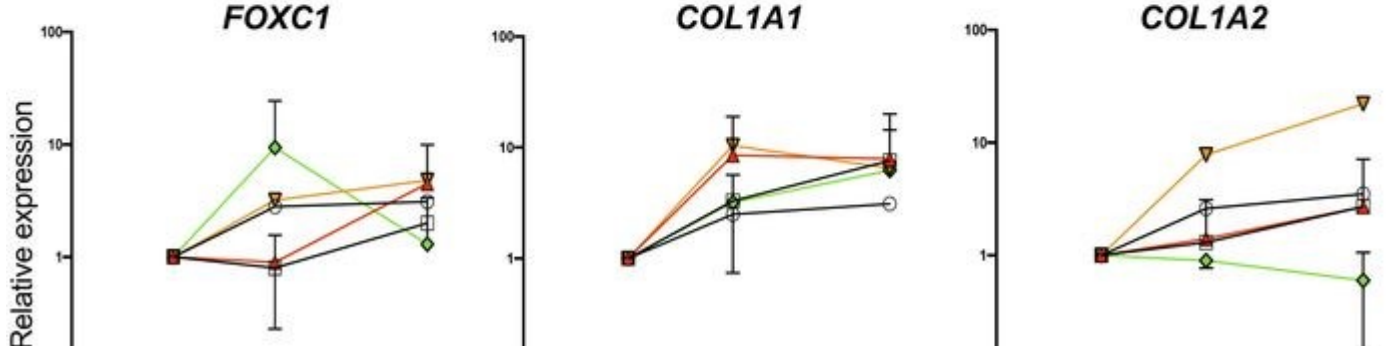

B
% perc of St
Compared
% perc of State count
Compared to CT-A
50%
25%
0%
100%
75%
50%
25%
0%
850K
HGPS
HGPS-L
APS
1stExon
3'UTR
5'UTR
Body
ExonBnd
IGR
TSS1500
TSS200
C
CT-Y
CT-A
HGPS
HGPS-L
APS
Distance to closet LAD (bp)
2e+05
0e+00
-2e+05
level
(0.0, 0.1]
(0.1, 0.2]
(0.2, 0.3]
(0.3, 0.4]
(0.4, 0.5]
(0.5, 0.6]
(0.6, 0.7]
(0.7, 0.8]
(0.8, 0.9]
(0.9, 1.0]
0.00
0.25
0.50
0.75
1.00
BetaValue


All genes
APS vs CT-Y
APS vs CT-A
HGPS vs CT-Y
HGPS vs CT-A
HGPS-L vs CT-Y
HGPS-L vs CT-A

B


FOXC1
COL1A1
COL1A2
TBX20
FOXC2
TGFB2
FGFR2
GTF2H2
Relative expression
Young Aged
Control
HGPS
HGPS-L
APS

C


FOXC1
COL1A1
COL1A2
Relative expression

Supplementary Table 1. Pathologic cell lines with associated clinics. (AMD: acro-mandibular dysplasia)

Cell Line	Pathology	Mutation	Clinics
1972	HGPS 1	LMNA c.1824C>T (p.G608G D50)	Early and accelerated aging Lipodystrophy Osteoporosis Cardiovascular dysfunction
8243	HGPS 2		
5968	HGPS 3		
PC054	HGPS-L	LMNA c.1868C>G (p.T623S D35)	
OM2	APS 1	LMNA c.1583C>T (p.T528M) – Homozygous	Progeria-like, MAD-like and myopathy
13621	APS 2	LMNA c.1762T>C (p.C588R) – Heterozygous	AMD_like, no heart attack
10770	APS 3	LMNA c.1583C>T and c.1619T>C (p.T528M and p.M540T) – Compound heterozygous	Progeria-like, AMD like and early hypertension

Supplementary Table 2. Distribution of differentially methylated probes (DMP) in patient's cells (MSCs) compared to controls.

	CT-Y			CT-A		
	APS	HGPS	HGPS-L	APS	HGPS	HGPS-L
HyperM	46192 65.52%	90051 83.23%	108982 79.03%	38883 39.08%	47473 59.15%	67476 61.43%
HypoM	24305 34.48%	18142 16.77%	28918 20.97%	60624 60.92%	32792 40.85%	42364 38.57%

Supplementary Table 3. Distribution of Hypermethylated (top) and Hypomethylated (bottom) probes relative to CpGs, CpG islands, shores (2kb flanking CpG islands), shelves (2kb extending from shores) or openseas (isolated CpG in the rest of the genome) in patient cells (MSCs) compared to controls.

Hypermethylated probes							
	CT-Y			CT-A			
	APS	HGPS	HGPS-L	APS	HGPS	HGPS-L	850K
Islands	2415 5.23%	5977 6.64%	6629 6.08%	2708 6.96%	2860 6.02%	3370 4.99%	161441 18.63%
Open sea	33959 73.52%	68373 75.93%	84407 77.45%	25959 66.76%	34235 72.11%	51399 76.17%	488876 56.42%
Shelf	2777 6.01%	5074 5.63%	6265 5.75%	2472 6.36%	2817 5.93%	3964 5.87%	61691 7.12%
Shore	7041 15.24%	10627 11.8%	11681 10.72%	7744 19.92%	7561 15.93%	8743 12.96%	154546 17.83%
	Hypomethylated probes						
	CT-Y			CT-A			
	APS	HGPS	HGPS-L	APS	HGPS	HGPS-L	850K
Islands	3169 13.04%	2461 13.57%	3756 12.99%	7217 11.9%	3354 10.23%	4310 10.17%	161441 18.63%
Open sea	13628 56.07%	9508 52.41%	15714 54.34%	38134 62.9%	19559 59.65%	24953 58.9%	488876 56.42%
Shelf	1312 5.4%	1062 5.85%	1596 5.52%	3583 5.91%	2065 6.3%	2594 6.12%	61691 7.12%
Shore	6196 25.49%	5111 28.17%	7852 27.15%	11690 19.28%	7814 23.83%	10507 24.8%	154546 17.83%

Supplementary Table 4. Distribution of Hypermethylated (top) and hypomethylated (bottom) probes corresponding to gene functional elements. E.g : first exon, 3' UTR, 5'UTR, gene bodies, Exon boundaries, Internal genomic regions (IGR), 1500 bp from transcription start sites (TSS1500) or 2000 bp from transcription start sites (TSS200).

Hypermethylated probes							
	CT-Y			CT-A			
	APS	HGPS	HGPS-L	APS	HGPS	HGPS-L	850K
1st exon	665 1.44%	1633 1.81%	1819 1.67%	589 1.51%	726 1.53%	910 1.35%	26419 3.05%
3'UTR	894 1.94%	1711 1.9%	2059 1.89%	803 2.07%	953 2.01%	1300 1.93%	21557 2.49%
5' UTR	3125 6.77%	6163 6.84%	8150 7.48%	3175 8.17%	3568 7.52%	5350 7.93%	72994 8.42%
Body	16358 35.41%	30664 34.05%	39417 36.17%	14631 37.63%	17599 37.07%	26229 38.87%	317777 36.67%
Exon Bnd	217 0.47%	455 0.51%	536 0.49%	208 0.53%	255 0.54%	334 0.49%	5678 0.66%
IGR	18.09 39.64%	36668 40.72%	43398 39.82%	13349 34.33%	17668 37.22%	25578 37.91%	249956 28.84%
TSS1500	5043 10.92%	8972 9.96%	9434 8.66%	4651 11.96%	5015 10.56%	5695 8.44%	107064 12.36%
TSS200	1581 3.42%	3785 4.2%	4169 3.83%	1477 3.8%	1689 3.56%	2080 3.08%	65109 7.51%
	Hypomethylated probes						
	CT-Y			CT-A			

	APS	HGPS	HGPS-L	APS	HGPS	HGPS-L	850K
1st exon	523 2.15%	427 2.35%	575 1.99%	1408 2.32%	712 2.17%	828 1.95%	26419 3.05%
3'UTR	519 2.15%	354 1.95%	668 2.31%	1155 1.91%	572 1.74%	890 2.1%	21557 2.49%
5' UTR	1986 8.17%	1601 8.82%	2332 8.06%	4967 8.19%	2743 8.36%	3193 7.54%	72994 8.42%
Body	8547 35.17%	6342 34.96%	9983 34.52%	20555 33.91%	11307 34.48%	14349 33.87%	317777 36.67%
Exon Bnd	102 0.42%	75 0.41%	170 0.59%	265 0.44%	127 0.39%	189 0.45%	5678 0.66%
IGR	7782 32.02%	5550 30.59%	8894 30.76%	21487 35.44%	11297 34.45%	14529 34.3%	249956 28.84%
TSS1500	3601 14.82%	2826 15.58%	4800 16.6%	7298 12.04%	4364 13.31%	6283 14.83%	107064 12.36%
TSS200	1245 5.12%	967 5.33%	1496 5.17%	3489 5.76%	1670 5.09%	2103 4.96%	65109 7.51%

Supplementary Table 5. Association to functional chromatin elements using ChromHMM track (MSCs E025 Cells, Roadmap Epigenomics Mapping Consortium)

	Hypermethylated probes						
	CT-Y			CT-A			
	APS	HGPS	HGPS-L	APS	HGPS	HGPS-L	850K
TSSActive	5833 12.63%	12269 13.62%	14703 13.49%	6298 16.2%	7542 15.89%	9756 14.46%	202331 23.49%
Transcription	5006 10.84%	7016 7.79%	9465 8.68%	6188 15.91%	6025 12.69%	7923 11.74%	174982 20.31%
Enhancer	7650 16.56%	14999 16.66%	24461 22.44%	7834 20.15%	10643 22.42%	19471 28.86%	105218 12.22%
Heterochromatin	626 1.36%	1418 1.57%	1406 1.29%	282 0.73%	480 1.01%	645 0.96%	8497 0.99%
TSSBivalent	676 1.46%	1203 1.34%	1273 1.17%	656 1.69%	671 1.41%	757 1.12%	22519 2.61%
Enhancerbivalent	413 0.89%	651 0.72%	788 0.72%	381 0.98%	419 0.88%	554 0.82%	6185 0.72%
RepressivePolycomb	12088 26.17%	25685 28.25%	28161 25.84%	9999 25.72%	11693 24.63%	14528 21.53%	184472 21.42%
Quiescent	13900 30.09%	26810 29.77%	28725 26.36%	7245 18.63%	10000 21.06%	13842 20.51%	157159 18.25%
	Hypomethylated probes						
	CT-Y			CT-A			
	APS	HGPS	HGPS-L	APS	HGPS	HGPS-L	850K

	Hypermethylated probes						
	CT-Y			CT-A			
	APS	HGPS	HGPS-L	APS	HGPS	HGPS-L	850K
TSSActive	6178 25.42%	4318 23.8%	7274 25.15%	13559 22.37%	6821 20.8%	9121 21.53%	202331 23.49%
Transcription	3107 12.78%	2888 15.92%	4802 16.61%	6292 10.38%	4317 13.16%	5883 13.89%	174982 20.31%
Enhancer	3892 16.01%	2722 15%	4013 13.88%	10701 17.65%	5610 17.11%	6109 14.42%	105218 12.22%
Heterochromatin	158 0.65%	111 0.61%	204 0.71%	311 0.51%	132 0.4%	319 0.75%	8497 0.99%
TSSBivalent	877 3.61%	684 3.77%	944 3.26%	1765 2.91%	1092 3.33%	1326 3.13%	22519 2.61%
Enhancerbivalent	347 1.43%	228 1.26%	329 1.14%	773 1.28%	438 1.34%	562 1.33%	6185 0.72%
RepressivePolycomb	6161 25.35%	4816 26.55%	6914 23.91%	16561 27.32%	9321 28.42%	11571 27.31%	184472 21.42%
Quiescent	3585 14.75%	2375 13.09%	4438 15.35%	10662 17.59%	5061 15.43%	7473 17.64%	157159 18.25%

Supplementary Table 6. Overlap between Downregulated DEGs and aggregated Hypermethylated DMPs; Upregulated DEGs and aggregated Hypomethylated DMPs, respectively. Percentage of overlap are given considering the overall DEGs and Aggregated DMPs.

	Hypermethylated					
	CT-Y			CT-A		
	APS	HGPS	HGPS-L	APS	HGPS	HGPS-L
Downregulated DEGs	181	210	618	218	358	1075
Aggregated DMPs	8258	12381	12856	6446	9425	10400
Overlap	79 43.65%	71 33.81%	279 45.15%	44 20.18%	120 33.52%	402 37.40%

	Hypomethylated					
	CT-Y			CT-A		
	APS	HGPS	HGPS-L	APS	HGPS	HGPS-L
Upregulated DEGs	116	242	574	106	229	924
Aggregated DMPs	5643	3094	4044	9463	5464	6131
Overlap	39 33.62%	39 16.12%	85 14.81%	21 19.81%	50 21.83%	188 20.35%

Supplementary Table 7. List of RT-qPCR primers

Gene	Forward	Reverse
HPRT	TGATAGATCCATTCCTATGACTGTAGA	CAAGACATTCTTTCCATGTAAAGT
PPIA	ATGCTGGACCCAACACAAAT	TCTTTTATCTTGCCAAACACC
FOXC1	TGAACGGCAATAGTAGCTGTCA	GGACGTGCGGTACAGAGAC
FOXC2	GGGGACCTGAACCACCTC	AACATCTCCCGCACGTTG
COL1A1	CCCAAGGCTTCCAAGGTC	GGACGACCAGGTTTTCCAG
COL1A2	TGGTGAAGTGGGTCTTCCA	ACCCTTGGCACCAGTAAGG
GTF2H2	CATGCCTGGACATACAAGTCGAG	CAGTGCAAACGCGAACTTCTGC
TGFB2	CAAAGGGTACAATGCCAACTT	GCAGATGCTTCTGGATTTATGG
FGFR2	CCAAAATGGGAGTTTCCAAG	CATGACCACTTGCCCAAAG
TBX20	AGCAAATGGCCAAAATTGC	GATGGTTGGAAACATCCTCCT

Bibliographie

Andreu, I., Granero-Moya, I., Chahare, N. R., Clein, K., Molina-Jordán, M., Beedle, A. E. M., Elosegui-Artola, A., Abenza, J. F., Rossetti, L., Trepat, X., Raveh, B., & Roca-Cusachs, P. (2022). Mechanical force application to the nucleus regulates nucleocytoplasmic transport. *Nature Cell Biology*, *24*(6), 896-905. https://doi.org/10.1038/s41556-022-00927-7

Assistance Publique Hopitaux De Marseille. (2013). *Treatment of the Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome With a Combination of Pravastatin and Zoledronic Acid* (Clinical trial registration No. NCT00731016). clinicaltrials.gov. https://clinicaltrials.gov/study/NCT00731016

Baroukh, N., Ravier, M. A., Loder, M. K., Hill, E. V., Bounacer, A., Scharfmann, R., Rutter, G. A., & Van Obberghen, E. (2007). MicroRNA-124a Regulates Foxa2 Expression and Intracellular Signaling in Pancreatic β-Cell Lines. *Journal of Biological Chemistry*, *282*(27), 19575-19588. https://doi.org/10.1074/jbc.M611841200

Barthélémy, F., Navarro, C., Fayek, R., Da Silva, N., Roll, P., Sigaudy, S., Oshima, J., Bonne, G., Papadopoulou-Legbelou, K., Evangeliou, A. E., Spilioti, M., Lemerrer, M., Wevers, R. A., Morava, E., Robaglia-Schlupp, A., Lévy, N., Bartoli, M., & De Sandre-Giovannoli, A. (2015). Truncated prelamin A expression in HGPS-like patients : A transcriptional study. *European Journal of Human Genetics*, *23*(8), Article 8. https://doi.org/10.1038/ejhg.2014.239

Basso, A. D., Kirschmeier, P., & Bishop, W. R. (2006). Thematic review series : Lipid Posttranslational Modifications. Farnesyl transferase inhibitors. *Journal of Lipid Research*, *47*(1), 15-31. https://doi.org/10.1194/jlr.R500012-JLR200

Belgardt, B.-F., Ahmed, K., Spranger, M., Latreille, M., Denzler, R., Kondratiuk, N., Von Meyenn, F., Villena, F. N., Herrmanns, K., Bosco, D., Kerr-Conte, J., Pattou, F., Rülicke, T., & Stoffel, M. (2015). The microRNA-200 family regulates pancreatic beta cell survival in type 2 diabetes. *Nature Medicine*, *21*(6), 619-627. https://doi.org/10.1038/nm.3862

Benetti, R., Gonzalo, S., Jaco, I., Muñoz, P., Gonzalez, S., Schoeftner, S., Murchison, E., Andl, T., Chen, T., Klatt, P., Li, E., Serrano, M., Millar, S., Hannon, G., & Blasco, M. A. (2008). A mammalian microRNA cluster controls DNA methylation and telomere recombination via Rbl2-dependent regulation of DNA methyltransferases. *Nature Structural & Molecular Biology*, *15*(3), 268-279. https://doi.org/10.1038/nsmb.1399

Benhamed, M., Herbig, U., Ye, T., Dejean, A., & Bischof, O. (2012). Senescence is an endogenous trigger for microRNA-directed transcriptional gene silencing in human cells. *Nature Cell Biology*, *14*(3), 266-275. https://doi.org/10.1038/ncb2443

Benson, E. K., Lee, S. W., & Aaronson, S. A. (2010). Role of progerin-induced telomere dysfunction in HGPS premature cellular senescence. *Journal of Cell Science*, *123*(15), Article 15. https://doi.org/10.1242/jcs.067306

Bergo, M. O., Gavino, B., Ross, J., Schmidt, W. K., Hong, C., Kendall, L. V., Mohr, A., Meta, M., Genant, H., Jiang, Y., Wisner, E. R., van Bruggen, N., Carano, R. A. D., Michaelis, S., Griffey, S. M., & Young, S. G. (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*(20), Article 20. https://doi.org/10.1073/pnas.192460799

Bernstein, E., Kim, S. Y., Carmell, M. A., Murchison, E. P., Alcorn, H., Li, M. Z., Mills, A. A., Elledge, S. J., Anderson, K. V., & Hannon, G. J. (2003). Dicer is essential for mouse development. *Nature Genetics*, *35*(3), 215-217. https://doi.org/10.1038/ng1253

Beyret, E., Liao, H.-K., Yamamoto, M., Hernandez-Benitez, R., Fu, Y., Erikson, G., Reddy, P., & Izpisua Belmonte, J. C. (2019). Single-dose CRISPR–Cas9 therapy extends lifespan of mice with Hutchinson–Gilford progeria syndrome. *Nature Medicine*, *25*(3), Article 3. https://doi.org/10.1038/s41591-019-0343-4

Bommer, G. T., Gerin, I., Feng, Y., Kaczorowski, A. J., Kuick, R., Love, R. E., Zhai, Y., Giordano, T. J., Qin, Z. S., Moore, B. B., MacDougald, O. A., Cho, K. R., & Fearon, E. R. (2007). P53-Mediated Activation of miRNA34 Candidate Tumor-Suppressor Genes. *Current Biology*, *17*(15), 1298-1307. https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.06.068

Boyer, L. A., Lee, T. I., Cole, M. F., Johnstone, S. E., Levine, S. S., Zucker, J. P., Guenther, M. G., Kumar, R. M., Murray, H. L., Jenner, R. G., Gifford, D. K., Melton, D. A., Jaenisch, R., & Young, R. A. (2005). Core Transcriptional Regulatory Circuitry in Human Embryonic Stem Cells. *Cell*, *122*(6), 947-956. https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.08.020

Brennecke, J., Stark, A., Russell, R. B., & Cohen, S. M. (2005). Principles of microRNA-target recognition. *PLoS Biology*, *3*(3), e85. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0030085

Brondello, J.-M., Prieur, A., Philipot, D., Lemaitre, J.-M., Lenaers, G., Piette, J., & Dulić, V. (2012). [Cellular senescence and the myth of Janus]. *Medecine Sciences: M/S*, *28*(3), 288-296. https://doi.org/10.1051/medsci/2012283017

Bueno, M. J., & Malumbres, M. (2011). MicroRNAs and the cell cycle. *Biochimica Et Biophysica Acta*, *1812*(5), Article 5. https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2011.02.002

Burla, R., La Torre, M., Merigliano, C., Vernì, F., & Saggio, I. (2018). Genomic instability and DNA replication defects in progeroid syndromes. *Nucleus*, *9*(1), Article 1. https://doi.org/10.1080/19491034.2018.1476793

Burton, D. G. A., & Krizhanovsky, V. (2014). Physiological and pathological consequences of cellular senescence. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *71*(22), 4373-4386. https://doi.org/10.1007/s00018-014-1691-3

Buxboim, A., Swift, J., Irianto, J., Spinler, K. R., Dingal, P. C. D. P., Athirasala, A., Kao, Y.-R. C., Cho, S., Harada, T., Shin, J.-W., & Discher, D. E. (2014). Matrix Elasticity Regulates Lamin-A,C Phosphorylation and Turnover with Feedback to Actomyosin. *Current Biology*, *24*(16), 1909-1917. https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.07.001

Cabral, W. A., Stephan, C., Terajima, M., Thaivalappil, A. A., Blanchard, O., Tavarez, U. L., Narisu, N., Yan, T., Wincovitch, S. M., Taga, Y., Yamauchi, M., Kozloff, K. M., Erdos, M. R., & Collins, F. S. (2023). Bone dysplasia in HUTCHINSON-GILFORD progeria syndrome is associated with dysregulated differentiation and function of bone cell populations. *Aging Cell*, *22*(9), e13903. https://doi.org/10.1111/acel.13903

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), Article 89. https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3002346

Capell, B. C., Erdos, M. R., Madigan, J. P., Fiordalisi, J. J., Varga, R., Conneely, K. N., Gordon, L. B., Der, C. J., Cox, A. D., & Collins, F. S. (2005). Inhibiting farnesylation of progerin prevents the characteristic nuclear blebbing of Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *102*(36), 12879-12884. https://doi.org/10.1073/pnas.0506001102

Capell, B. C., Olive, M., Erdos, M. R., Cao, K., Faddah, D. A., Tavarez, U. L., Conneely, K. N., Qu, X., San, H., Ganesh, S. K., Chen, X., Avallone, H., Kolodgie, F. D., Virmani, R., Nabel, E. G., & Collins, F. S. (2008). A farnesyltransferase inhibitor prevents both the onset and late progression of cardiovascular disease in a progeria mouse model. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *105*(41), 15902-15907. https://doi.org/10.1073/pnas.0807840105

Caravia, X. M., & López-Otín, C. (2015). Regulatory Roles of miRNAs in Aging. In G. Santulli (Éd.), *microRNA: Basic Science* (Vol. 887, p. 213-230). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-22380-3_11

Caravia, X. M., Roiz-Valle, D., Morán-Álvarez, A., & López-Otín, C. (2017). Functional relevance of miRNAs in premature ageing. *Mechanisms of Ageing and Development*, *168*, 10-19. https://doi.org/10.1016/j.mad.2017.05.003

Caron, M., Auclair, M., Donadille, B., Béréziat, V., Guerci, B., Laville, M., Narbonne, H., Bodemer, C., Lascols, O., Capeau, J., & 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 & Differentiation*, *14*(10), 1759-1767. https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4402197

Carrero, D., Soria-Valles, C., & López-Otín, C. (2016). Hallmarks of progeroid syndromes : Lessons from mice and reprogrammed cells. *Disease Models & Mechanisms*, *9*(7), Article 7. https://doi.org/10.1242/dmm.024711

Cau, P., Navarro, C., Harhouri, K., Roll, P., Sigaudy, S., Kaspi, E., Perrin, S., De Sandre-Giovannoli, A., & Lévy, N. (2014a). Nuclear matrix, nuclear envelope and premature aging syndromes in a translational research perspective. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, *29*, 125-147. https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2014.03.021

Cau, P., Navarro, C., Harhouri, K., Roll, P., Sigaudy, S., Kaspi, E., Perrin, S., De Sandre-Giovannoli, A., & Lévy, N. (2014b). Nuclear matrix, nuclear envelope and premature aging syndromes in a translational research perspective. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, *29*, 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., Fini, M., Marmiroli, S., Scarano, E., Maraldi, N. M., Squarzoni, S., Prencipe, S., & 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. https://doi.org/10.4081/ejh.2011.e36

Chen, L., Qian, X., Wang, Z., & Zhou, X. (2021). The HOTAIR lncRNA : A remarkable oncogenic promoter in human cancer metastasis (Review). *Oncology Letters*, *21*(4), 302. https://doi.org/10.3892/ol.2021.12563

Chen, N. Y., Kim, P., Weston, T. A., Edillo, L., Tu, Y., Fong, L. G., & Young, S. G. (2018). Fibroblasts lacking nuclear lamins do not have nuclear blebs or protrusions but nevertheless have frequent nuclear membrane ruptures. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *115*(40), 10100-10105. https://doi.org/10.1073/pnas.1812622115

Choi, J. Y., Lai, J. K., Xiong, Z.-M., Ren, M., Moorer, M. C., Stains, J. P., & Cao, K. (2018). Diminished Canonical β-Catenin Signaling During Osteoblast Differentiation Contributes to Osteopenia in Progeria. *Journal of Bone and Mineral Research*, *33*(11), Article 11. https://doi.org/10.1002/jbmr.3549

Cisneros, B., García-Aguirre, I., De Ita, M., Arrieta-Cruz, I., & Rosas-Vargas, H. (2023). Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome : Cellular Mechanisms and Therapeutic Perspectives. *Archives of Medical Research*, *54*(5), 102837. https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2023.06.002

Clemson, C. M., Hutchinson, J. N., Sara, S. A., Ensminger, A. W., Fox, A. H., Chess, A., & Lawrence, J. B. (2009). An Architectural Role for a Nuclear Noncoding RNA : NEAT1 RNA Is Essential for the Structure of Paraspeckles. *Molecular Cell*, *33*(6), 717-726. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.01.026

Clevers, H. (2006). Wnt/β-Catenin Signaling in Development and Disease. *Cell*, *127*(3), 469-480. https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.10.018

Coppedè, F. (2021). Mutations Involved in Premature-Ageing Syndromes. *The Application of Clinical Genetics*, *14*, 279-295. https://doi.org/10.2147/TACG.S273525

Danielsson, B. E., Peters, H. C., Bathula, K., Spear, L. M., Noll, N. A., Dahl, K. N., & Conway, D. E. (2022). Progerin-expressing endothelial cells are unable to adapt to shear stress. *Biophysical Journal*, *121*(4), Article 4. https://doi.org/10.1016/j.bpj.2022.01.004

Das, A., Grotsky, D. A., Neumann, M. A., Kreienkamp, R., Gonzalez-Suarez, I., Redwood, A. B., Kennedy, B. K., Stewart, C. L., & Gonzalo, S. (2013). Lamin A Δexon9 mutation leads to telomere and chromatin defects but not genomic instability. *Nucleus*, *4*(5), 410-419. https://doi.org/10.4161/nucl.26873

Davies, B. S. J., Barnes, R. H., Tu, Y., Ren, S., Andres, D. A., Spielmann, H. P., Lammerding, J., Wang, Y., Young, S. G., & Fong, L. G. (2010). An accumulation of non-farnesylated prelamin A causes cardiomyopathy but not progeria. *Human Molecular Genetics*, *19*(13), 2682-2694. https://doi.org/10.1093/hmg/ddq158

De Sandre-Giovannoli, A., Bernard, R., Cau, P., Navarro, C., Amiel, J., Boccaccio, I., Lyonnet, S., Stewart, C. L., Munnich, A., Le Merrer, M., & Lévy, N. (2003). Lamin a truncation in Hutchinson-Gilford progeria. *Science (New York, N.Y.)*, *300*(5628), Article 5628. https://doi.org/10.1126/science.1084125

Dechat, T., Adam, S. A., Taimen, P., Shimi, T., & Goldman, R. D. (2010). Nuclear Lamins. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *2*(11), a000547-a000547. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000547

Dechat, T., Pfleghaar, K., Sengupta, K., Shimi, T., Shumaker, D. K., Solimando, L., & Goldman, R. D. (2008a). Nuclear lamins : Major factors in the structural organization and function of the nucleus and chromatin. *Genes & Development*, *22*(7), 832-853. https://doi.org/10.1101/gad.1652708

Dechat, T., Pfleghaar, K., Sengupta, K., Shimi, T., Shumaker, D. K., Solimando, L., & Goldman, R. D. (2008b). Nuclear lamins : Major factors in the structural organization and function of the nucleus and chromatin. *Genes & Development*, *22*(7), Article 7. https://doi.org/10.1101/gad.1652708

de Pontual, L., Yao, E., Callier, P., Faivre, L., Drouin, V., Cariou, S., Van Haeringen, A., Geneviève, D., Goldenberg, A., Oufadem, M., Manouvrier, S., Munnich, A., Vidigal, J. A., Vekemans, M., Lyonnet, S., Henrion-Caude, A., Ventura, A., & Amiel, J. (2011). Germline deletion of the miR-17∼92 cluster causes skeletal and growth defects in humans. *Nature Genetics*, *43*(10), 1026-1030. https://doi.org/10.1038/ng.915

Dinkova-Kostova, A. T., & Abramov, A. Y. (2015). The emerging role of Nrf2 in mitochondrial function. *Free Radical Biology & Medicine*, *88*(Pt B), 179-188. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.04.036

Dorado, B., Pløen, G. G., Barettino, A., Macías, A., Gonzalo, P., Andrés-Manzano, M. J., González-Gómez, C., Galán-Arriola, C., Alfonso, J. M., Lobo, M., López-Martín, G. J., Molina, A., Sánchez-Sánchez, R., Gadea, J., Sánchez-González, J., Liu, Y., Callesen, H., Filgueiras-Rama, D., Ibáñez, B., … Andrés, V. (2019). Generation and characterization of a novel knockin minipig model of Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Cell Discovery*, *5*(1), Article 1. https://doi.org/10.1038/s41421-019-0084-z

Dou, Z., Xu, C., Donahue, G., Shimi, T., Pan, J.-A., Zhu, J., Ivanov, A., Capell, B. C., Drake, A. M., Shah, P. P., Catanzaro, J. M., Daniel Ricketts, M., Lamark, T., Adam, S. A., Marmorstein, R., Zong, W.-X., Johansen, T., Goldman, R. D., Adams, P. D., & Berger, S. L. (2015). Autophagy mediates degradation of nuclear lamina. *Nature*, *527*(7576), 105-109. https://doi.org/10.1038/nature15548

Doubaj, Y., De Sandre-Giovannoli, A., Vera, E., Navarro, C. L., Elalaoui, S. C., Tajir, M., Lévy, N., & 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

Egesipe, A.-L., Blondel, S., Lo Cicero, A., Jaskowiak, A.-L., Navarro, C., Sandre-Giovannoli, A. D., Levy, N., Peschanski, M., & Nissan, X. (2016). Metformin decreases progerin expression and alleviates pathological defects of Hutchinson–Gilford progeria syndrome cells. *Npj Aging and Mechanisms of Disease*, *2*(1), 16026. https://doi.org/10.1038/npjamd.2016.26

El Ouaamari, A., Baroukh, N., Martens, G. A., Lebrun, P., Pipeleers, D., & Van Obberghen, E. (2008). miR-375 Targets 3'-Phosphoinositide–Dependent Protein Kinase-1 and Regulates Glucose-Induced Biological Responses in Pancreatic β-Cells. *Diabetes*, *57*(10), 2708-2717. https://doi.org/10.2337/db07-1614

Elosegui-Artola, A., Andreu, I., Beedle, A. E. M., Lezamiz, A., Uroz, M., Kosmalska, A. J., Oria, R., Kechagia, J. Z., Rico-Lastres, P., Le Roux, A.-L., Shanahan, C. M., Trepat, X., Navajas, D., Garcia-Manyes, S., & Roca-Cusachs, P. (2017). Force Triggers YAP Nuclear Entry by Regulating Transport across Nuclear Pores. *Cell*, *171*(6), 1397-1410.e14. https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.10.008

Elouej, S., Harhouri, K., Le Mao, M., Baujat, G., Nampoothiri, S., Kayserili, H., Menabawy, N. A., Selim, L., Paneque, A. L., Kubisch, C., Lessel, D., Rubinsztajn, R., Charar, C., Bartoli, C., Airault, C., Deleuze, J.-F., Rötig, A., Bauer, P., Pereira, C., … De Sandre-Giovannoli, A. (2020). Loss of MTX2 causes mandibuloacral dysplasia and links mitochondrial dysfunction to altered nuclear morphology. *Nature Communications*, *11*(1), Article 1. https://doi.org/10.1038/s41467-020-18146-9

Erdos, M. R., Cabral, W. A., Tavarez, U. L., Cao, K., Gvozdenovic-Jeremic, J., Narisu, N., Zerfas, P. M., Crumley, S., Boku, Y., Hanson, G., Mourich, D. V., Kole, R., Eckhaus, M. A., Gordon, L. B., & Collins, F. S. (2021). A targeted antisense therapeutic approach for Hutchinson–Gilford progeria syndrome. *Nature Medicine*, *27*(3), Article 3. https://doi.org/10.1038/s41591-021-01274-0

Eriksson, M., Brown, W. T., Gordon, L. B., Glynn, M. W., Singer, J., Scott, L., Erdos, M. R., Robbins, C. M., Moses, T. Y., Berglund, P., Dutra, A., Pak, E., Durkin, S., Csoka, A. B., Boehnke, M., Glover, T. W., & Collins, F. S. (2003). Recurrent de novo point mutations in lamin A cause Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Nature*, *423*(6937), Article 6937. https://doi.org/10.1038/nature01629

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., & López-Otín, C. (2008). Nuclear envelope defects cause stem cell dysfunction in premature-aging mice. *The Journal of Cell Biology*, *181*(1), 27-35. https://doi.org/10.1083/jcb.200801096

Esteller, M. (2011). Non-coding RNAs in human disease. *Nature Reviews Genetics*, *12*(12), 861-874. https://doi.org/10.1038/nrg3074

EU/3/18/2118—Orphan designation for treatment of Hutchinson-Gilford progeria | European Medicines Agency (EMA). (2019, mars 11). https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/orphan-designations/eu-3-18-2118

Filipowicz, W., Bhattacharyya, S. N., & Sonenberg, N. (2008). Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs : Are the answers in sight? *Nature Reviews. Genetics*, *9*(2), 102-114. https://doi.org/10.1038/nrg2290

Frankel, D., Delecourt, V., Harhouri, 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*, *17*(4), e12766. https://doi.org/10.1111/acel.12766

Frankel, D., Delecourt, V., Novoa-del-Toro, E.-M., Robin, J. D., Airault, C., Bartoli, C., Carabalona, A., Perrin, S., Mazaleyrat, K., De Sandre-Giovannoli, A., Magdinier, F., Baudot, A., Lévy, N., Kaspi, E., & Roll, P. (2022). miR-376a-3p and miR-376b-3p overexpression in Hutchinson-Gilford progeria fibroblasts inhibits cell proliferation and induces premature senescence. *iScience*, *25*(2), 103757. https://doi.org/10.1016/j.isci.2022.103757

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

Gabriel, D., Shafry, D. D., Gordon, L. B., & Djabali, K. (2017). Intermittent treatment with farnesyltransferase inhibitor and sulforaphane improves cellular homeostasis in Hutchinson-Gilford progeria fibroblasts. *Oncotarget*, *8*(39), Article 39. https://doi.org/10.18632/oncotarget.19363

Gan, S., Huang, Z., Liu, N., Su, R., Xie, G., Zhong, B., Zhang, K., Wang, S., Hu, X., Zhang, J., & Xiang, S. (2016). Micro RNA -140-5p impairs zebrafish embryonic bone development via targeting BMP -2. *FEBS Letters*, *590*(10), 1438-1446. https://doi.org/10.1002/1873-3468.12190

Gao, X., Jiang, Y., & Li, Y. (2021). Inhibitory effect of miR-140-5p on doxorubicin resistance of hepatocellular carcinoma. *Experimental and Therapeutic Medicine*, *21*(5), 507. https://doi.org/10.3892/etm.2021.9938

Garg, A., Subramanyam, L., Agarwal, A. K., Simha, V., Levine, B., D'Apice, M. R., Novelli, G., & Crow, Y. (2009). Atypical progeroid syndrome due to heterozygous missense LMNA mutations. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, *94*(12), Article 12. https://doi.org/10.1210/jc.2009-0472

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., & Collins, F. S. (2004). Accumulation of mutant lamin A causes progressive changes in nuclear architecture in Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *101*(24), Article 24. https://doi.org/10.1073/pnas.0402943101

Gonzalez-Suarez, I., Redwood, A. B., Perkins, S. M., Vermolen, B., Lichtensztejin, D., Grotsky, D. A., Morgado-Palacin, L., Gapud, E. J., Sleckman, B. P., Sullivan, T., Sage, J., Stewart, C. L., Mai, S., & Gonzalo, S. (2009). Novel roles for A-type lamins in telomere biology and the DNA damage response pathway. *The EMBO Journal*, *28*(16), 2414-2427. https://doi.org/10.1038/emboj.2009.196

Gonzalo, S., & Kreienkamp, R. (2015). DNA repair defects and genome instability in Hutchinson–Gilford Progeria Syndrome. *Current Opinion in Cell Biology*, *34*, 75-83. https://doi.org/10.1016/j.ceb.2015.05.007

Gonzalo, S., Kreienkamp, R., & Askjaer, P. (2017). Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome : A premature aging disease caused by LMNA gene mutations. *Ageing Research Reviews*, *33*, 18-29. https://doi.org/10.1016/j.arr.2016.06.007

Gordon, L. B., Brown, W. T., & Collins, F. S. (1993). Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome. In M. P. Adam, H. H. Ardinger, R. A. Pagon, S. E. Wallace, L. J. Bean, K. Stephens, & A. Amemiya (Éds.), *GeneReviews®*. University of Washington, Seattle. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1121/

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., Snyder, B. D., Ullrich, N. J., Silvera, V. M., Liang, M. G., Quinn, N., Miller, D. T., Huh, S. Y., Dowton, A. A., Littlefield, K., … Kieran, M. W. (2016). Clinical Trial of the Protein Farnesylation Inhibitors Lonafarnib, Pravastatin, and Zoledronic Acid in Children With Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome. *Circulation*, *134*(2), Article 2. https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.116.022188

Gordon, L. B., Kleinman, M. E., Miller, D. T., Neuberg, D. S., Giobbie-Hurder, A., Gerhard-Herman, M., Smoot, L. B., Gordon, C. M., Cleveland, R., Snyder, B. D., Fligor, B., Bishop, W. R., Statkevich, P., Regen, A., Sonis, A., Riley, S., Ploski, C., Correia, A., Quinn, N., … Kieran, M. W. (2012). Clinical trial of a farnesyltransferase inhibitor in children with Hutchinson–Gilford progeria syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *109*(41), Article 41. https://doi.org/10.1073/pnas.1202529109

Gruenbaum, Y., & Foisner, R. (2015a). Lamins : Nuclear Intermediate Filament Proteins with Fundamental Functions in Nuclear Mechanics and Genome Regulation. *Annual Review of Biochemistry*, *84*(1), Article 1. https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060614-034115

Gruenbaum, Y., & Foisner, R. (2015b). Lamins : Nuclear Intermediate Filament Proteins with Fundamental Functions in Nuclear Mechanics and Genome Regulation. *Annual Review of Biochemistry*, *84*(1), 131-164. https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060614-034115

Guilluy, C., Osborne, L. D., Van Landeghem, L., Sharek, L., Superfine, R., Garcia-Mata, R., & Burridge, K. (2014). Isolated nuclei adapt to force and reveal a mechanotransduction pathway in the nucleus. *Nature Cell Biology*, *16*(4), 376-381. https://doi.org/10.1038/ncb2927

Guo, C.-J., Xu, G., & Chen, L.-L. (2020). Mechanisms of Long Noncoding RNA Nuclear Retention. *Trends in Biochemical Sciences*, *45*(11), 947-960. https://doi.org/10.1016/j.tibs.2020.07.001

Gupta, M. K., Halley, C., Duan, Z.-H., Lappe, J., Viterna, J., Jana, S., Augoff, K., Mohan, M. L., Vasudevan, N. T., Na, J., Sossey-Alaoui, K., Liu, X., Liu, C., Tang, W. H. W., & Naga Prasad, S. V. (2013). miRNA-548c : A specific signature in circulating PBMCs from dilated cardiomyopathy patients. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, *62*, 131-141. https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2013.05.011

Hammond, S. M. (2015a). An overview of microRNAs. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *87*, 3-14. https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.05.001

Hammond, S. M. (2015b). An overview of microRNAs. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *87*, 3-14. https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.05.001

Han, P., Li, W., Lin, C.-H., Yang, J., Shang, C., Nurnberg, S. T., Jin, K. K., Xu, W., Lin, C.-Y., Lin, C.-J., Xiong, Y., Chien, H.-C., Zhou, B., Ashley, E., Bernstein, D., Chen, P.-S., Chen, H.-S. V., Quertermous, T., & Chang, C.-P. (2014). A long noncoding RNA protects the heart from pathological hypertrophy. *Nature*, *514*(7520), 102-106. https://doi.org/10.1038/nature13596

Han, Y.-C., Vidigal, J. A., Mu, P., Yao, E., Singh, I., González, A. J., Concepcion, C. P., Bonetti, C., Ogrodowski, P., Carver, B., Selleri, L., Betel, D., Leslie, C., & Ventura, A. (2015). An allelic series of miR-17 ~ 92-mutant mice uncovers functional specialization and cooperation among members of a microRNA polycistron. *Nature Genetics*, *47*(7), 766-775. https://doi.org/10.1038/ng.3321

Harhouri, K., Navarro, C., Depetris, D., Mattei, M., Nissan, X., Cau, P., De Sandre-Giovannoli, A., & Lévy, N. (2017a). MG132-induced progerin clearance is mediated by autophagy activation and splicing regulation. *EMBO Molecular Medicine*, *9*(9), 1294-1313. https://doi.org/10.15252/emmm.201607315

Harhouri, K., Navarro, C., Depetris, D., Mattei, M., Nissan, X., Cau, P., De Sandre-Giovannoli, A., & Lévy, N. (2017b). MG132-induced progerin clearance is mediated by autophagy activation and splicing regulation. *EMBO Molecular Medicine*, *9*(9), Article 9. https://doi.org/10.15252/emmm.201607315

Harley, C. B., Futcher, A. B., & Greider, C. W. (1990). Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature*, *345*(6274), 458-460. https://doi.org/10.1038/345458a0

Henke, J. I., Goergen, D., Zheng, J., Song, Y., Schüttler, C. G., Fehr, C., Jünemann, C., & Niepmann, M. (2008). microRNA-122 stimulates translation of hepatitis C virus RNA. *The EMBO Journal*, *27*(24), Article 24. https://doi.org/10.1038/emboj.2008.244

Hennekam, R. C. M. (2006). Hutchinson–Gilford progeria syndrome : Review of the phenotype. *American Journal of Medical Genetics Part A*, *140A*(23), Article 23. https://doi.org/10.1002/ajmg.a.31346

Hennessy, E., Clynes, M., Jeppesen, P. B., & O'Driscoll, L. (2010). Identification of microRNAs with a role in glucose stimulated insulin secretion by expression profiling of MIN6 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *396*(2), 457-462. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.04.116

Herman, A. B., Tsitsipatis, D., & Gorospe, M. (2022). Integrated lncRNA function upon genomic and epigenomic regulation. *Molecular Cell*, *82*(12), 2252-2266. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2022.05.027

Hisama, F. M., Lessel, D., Leistritz, D., Friedrich, K., McBride, K. L., Pastore, M. T., Gottesman, G. S., Saha, B., Martin, G. M., Kubisch, C., & Oshima, J. (2011). Coronary artery disease in a Werner syndrome-like form of progeria characterized by low levels of progerin, a splice variant of lamin A. *American Journal of Medical Genetics. Part A*, *155A*(12), 3002-3006. https://doi.org/10.1002/ajmg.a.34336

Hu, Q., Zhang, N., Sui, T., Li, G., Wang, Z., Liu, M., Zhu, X., Huang, B., Lu, J., Li, Z., & Zhang, Y. (2023). Anti-hsa-miR-59 alleviates premature senescence associated with Hutchinson-Gilford progeria syndrome in mice. *The EMBO Journal*, *42*(1), Article 1. https://doi.org/10.15252/embj.2022110937

Huang, Z.-P., Chen, J., Seok, H. Y., Zhang, Z., Kataoka, M., Hu, X., & Wang, D.-Z. (2013). MicroRNA-22 Regulates Cardiac Hypertrophy and Remodeling in Response to Stress. *Circulation Research*, *112*(9), 1234-1243. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.112.300682

Hwang, S., Park, S.-K., Lee, H. Y., Kim, S. W., Lee, J. S., Choi, E. K., You, D., Kim, C.-S., & Suh, N. (2014). miR-140-5p suppresses BMP2-mediated osteogenesis in undifferentiated human mesenchymal stem cells. *FEBS Letters*, *588*(17), Article 17. https://doi.org/10.1016/j.febslet.2014.05.048

Ihalainen, T. O., Aires, L., Herzog, F. A., Schwartlander, R., Moeller, J., & Vogel, V. (2015). Differential basal-to-apical accessibility of lamin A/C epitopes in the nuclear lamina regulated by changes in cytoskeletal tension. *Nature Materials*, *14*(12), 1252-1261. https://doi.org/10.1038/nmat4389

Iliou, M. S., Da Silva-Diz, V., Carmona, F. J., Ramalho-Carvalho, J., Heyn, H., Villanueva, A., Muñoz, P., & Esteller, M. (2014). Impaired DICER1 function promotes stemness and metastasis in colon cancer. *Oncogene*, *33*(30), 4003-4015. https://doi.org/10.1038/onc.2013.398

Islam, R., Yoon, W., & Ryoo, H. (2017). Pin1, the Master Orchestrator of Bone Cell Differentiation. *Journal of Cellular Physiology*, *232*(9), 2339-2347. https://doi.org/10.1002/jcp.25442

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., Persson, R., King, B. D., Kauppinen, S., Levin, A. A., & 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

Joglekar, M. V., Parekh, V. S., Mehta, S., Bhonde, R. R., & Hardikar, A. A. (2007). MicroRNA profiling of developing and regenerating pancreas reveal post-transcriptional regulation of neurogenin3. *Developmental Biology*, *311*(2), 603-612. https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2007.09.008

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., Young, S. G., & Fong, L. G. (2012a). Regulation of prelamin A but not lamin C by miR-9, a brain-specific microRNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *109*(7). https://doi.org/10.1073/pnas.1111780109

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., Young, S. G., & Fong, L. G. (2012b). 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), Article 7. https://doi.org/10.1073/pnas.1111780109

Jurk, D., Wilson, C., Passos, J. F., Oakley, F., Correia-Melo, C., Greaves, L., Saretzki, G., Fox, C., Lawless, C., Anderson, R., Hewitt, G., Pender, S. L., Fullard, N., Nelson, G., Mann, J., Van De Sluis, B., Mann, D. A., & Von Zglinicki, T. (2014). Chronic inflammation induces telomere dysfunction and accelerates ageing in mice. *Nature Communications*, *5*(1), 4172. https://doi.org/10.1038/ncomms5172

Kang, H. T., Park, J. T., Choi, K., Choi, H. J. C., Jung, C. W., Kim, G. R., Lee, Y.-S., & Park, S. C. (2017). Chemical screening identifies ROCK as a target for recovering mitochondrial function in Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Aging Cell*, *16*(3), Article 3. https://doi.org/10.1111/acel.12584

Kaspi, E., Frankel, D., Guinde, J., Perrin, S., Laroumagne, S., Robaglia-Schlupp, A., Ostacolo, K., Harhouri, K., Tazi-Mezalek, R., Micallef, J., Dutau, H., Tomasini, P., De Sandre-Giovannoli, A., Lévy, N., Cau, P., Astoul, P., & Roll, P. (2017). Low lamin A expression in lung adenocarcinoma cells from pleural effusions is a pejorative factor associated with high number of metastatic sites and poor Performance status. *PLOS ONE*, *12*(8), e0183136. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183136

Kittisopikul, M., Shimi, T., Tatli, M., Tran, J. R., Zheng, Y., Medalia, O., Jaqaman, K., Adam, S. A., & Goldman, R. D. (2021). Computational analyses reveal spatial relationships between nuclear pore complexes and specific lamins. *Journal of Cell Biology*, *220*(4), e202007082. https://doi.org/10.1083/jcb.202007082

Kleinman, M. E. (2019a). *A Phase II Pilot Study of Zoledronic Acid, Pravastatin, and Lonafarnib (SCH66336) for Patients With Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome (HGPS) and Progeroid Laminopathies* (Clinical trial registration No. NCT00879034). clinicaltrials.gov. https://clinicaltrials.gov/study/NCT00879034

Kleinman, M. E. (2019b). *An Open Label Dose Adjusted Phase II Trial of the Oral Farnesyltransferase Inhibitor (FTI) Lonafarnib (SCH66336) for Patients With Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome (HGPS) and Progeroid Laminopathies* (Clinical trial registration No. NCT00425607). clinicaltrials.gov. https://clinicaltrials.gov/study/NCT00425607

Kleinman, M. E. (2023). *Phase I/II Trial of Everolimus in Combination With Lonafarnib in Progeria* (Clinical trial registration No. NCT02579044). clinicaltrials.gov. https://clinicaltrials.gov/study/NCT02579044

Kloosterman, W. P., Lagendijk, A. K., Ketting, R. F., Moulton, J. D., & Plasterk, R. H. A. (2007). Targeted Inhibition of miRNA Maturation with Morpholinos Reveals a Role for miR-375 in Pancreatic Islet Development. *PLoS Biology*, *5*(8), e203. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0050203

Koblan, L. W., Erdos, M. R., Wilson, C., Cabral, W. A., Levy, J. M., Xiong, Z.-M., Tavarez, U. L., Davison, L. M., Gete, Y. G., Mao, X., Newby, G. A., Doherty, S. P., Narisu, N., Sheng, Q., Krilow, C., Lin, C. Y., Gordon, L. B., Cao, K., Collins, F. S., … Liu, D. R. (2021). In vivo base editing rescues Hutchinson–Gilford progeria syndrome in mice. *Nature*, *589*(7843), Article 7843. https://doi.org/10.1038/s41586-020-03086-7

Kono, Y., Adam, S. A., Sato, Y., Reddy, K. L., Zheng, Y., Medalia, O., Goldman, R. D., Kimura, H., & Shimi, T. (2022). Nucleoplasmic lamin C rapidly accumulates at sites of nuclear envelope rupture with BAF and cGAS. *Journal of Cell Biology*, *221*(12), e202201024. https://doi.org/10.1083/jcb.202201024

Koshimizu, E., Imamura, S., Qi, J., Toure, J., Valdez, D. M., Carr, C. E., Hanai, J., & Kishi, S. (2011). Embryonic Senescence and Laminopathies in a Progeroid Zebrafish Model. *PLoS ONE*, *6*(3), Article 3. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017688

Kreienkamp, R., Croke, M., Neumann, M. A., Bedia-Diaz, G., Graziano, S., Dusso, A., Dorsett, D., Carlberg, C., & Gonzalo, S. (2016). Vitamin D receptor signaling improves Hutchinson-Gilford progeria syndrome cellular phenotypes. *Oncotarget*, *7*(21), Article 21. https://doi.org/10.18632/oncotarget.9065

Kreienkamp, R., & Gonzalo, S. (2020). Metabolic Dysfunction in Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome. *Cells*, *9*(2), 395. https://doi.org/10.3390/cells9020395

Kubben, N., Zhang, W., Wang, L., Voss, T. C., Yang, J., Qu, J., Liu, G.-H., & Misteli, T. (2016). Repression of the Antioxidant NRF2 Pathway in Premature Aging. *Cell*, *165*(6), Article 6. https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.05.017

Kumarswamy, R., Bauters, C., Volkmann, I., Maury, F., Fetisch, J., Holzmann, A., Lemesle, G., De Groote, P., Pinet, F., & Thum, T. (2014). Circulating Long Noncoding RNA, LIPCAR, Predicts Survival in

Patients With Heart Failure. *Circulation Research*, *114*(10), 1569-1575. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.114.303915

LAGOS-QUINTANA, M., RAUHUT, R., MEYER, J., BORKHARDT, A., & TUSCHL, T. (2003). New microRNAs from mouse and human. *RNA*, *9*(2), Article 2. https://doi.org/10.1261/rna.2146903

Lee, J. M., Nobumori, C., Tu, Y., Choi, C., Yang, S. H., Jung, H.-J., Vickers, T. A., Rigo, F., Bennett, C. F., Young, S. G., & Fong, L. G. (2016). Modulation of LMNA splicing as a strategy to treat prelamin A diseases. *Journal of Clinical Investigation*, *126*(4), 1592-1602. https://doi.org/10.1172/JCI85908

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. https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90529-y

Li, Y., Cui, J., Liu, L., Hambright, W. S., Gan, Y., Zhang, Y., Ren, S., Yue, X., Shao, L., Cui, Y., Huard, J., Mu, Y., Yao, Q., & Mu, X. (2024). mtDNA release promotes cGAS-STING activation and accelerated aging of postmitotic muscle cells. *Cell Death & Disease*, *15*(7), 523. https://doi.org/10.1038/s41419-024-06863-8

Li, Z., Jin, C., Chen, S., Zheng, Y., Huang, Y., Jia, L., Ge, W., & Zhou, Y. (2017). Long non-coding RNA MEG3 inhibits adipogenesis and promotes osteogenesis of human adipose-derived mesenchymal stem cells via miR-140-5p. *Molecular and Cellular Biochemistry*, *433*(1), Article 1. https://doi.org/10.1007/s11010-017-3015-z

Liu, B., Ghosh, S., Yang, X., Zheng, H., Liu, X., Wang, Z., Jin, G., Zheng, B., Kennedy, B. K., Suh, Y., Kaeberlein, M., Tryggvason, K., & Zhou, Z. (2012). Resveratrol Rescues SIRT1-Dependent Adult Stem Cell Decline and Alleviates Progeroid Features in Laminopathy-Based Progeria. *Cell Metabolism*, *16*(6), Article 6. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.11.007

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., Pei, D., Pendas, A. M., Cadiñanos, J., López-Otín, C., Tse, H. F., Hutchison, C., Chen, J., Cao, Y., Cheah, K. S. E., … Zhou, Z. (2005). Genomic instability in laminopathy-based premature aging. *Nature Medicine*, *11*(7), 780-785. https://doi.org/10.1038/nm1266

Liu, C., Liang, T., Zhang, Z., Chen, J., Xue, J., Zhan, X., & Ren, L. (2023). MEG3 alleviates ankylosing spondylitis by suppressing osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells through regulating microRNA-125a-5p-mediated TNFAIP3. *Apoptosis*, *28*(3-4), 498-513. https://doi.org/10.1007/s10495-022-01804-2

López-Otín, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M., & Kroemer, G. (2013). The Hallmarks of Aging. *Cell*, *153*(6), Article 6. https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.05.039

López-Otín, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M., & Kroemer, G. (2023). Hallmarks of aging : An expanding universe. *Cell*, *186*(2), Article 2. https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.11.001

Lu, X., & Djabali, K. (2018). Autophagic Removal of Farnesylated Carboxy-Terminal Lamin Peptides. *Cells*, *7*(4), 33. https://doi.org/10.3390/cells7040033

Luo, Z., Feng, X., Wang, H., Xu, W., Zhao, Y., Ma, W., Jiang, S., Liu, D., Huang, J., & Songyang, Z. (2015). Mir-23a induces telomere dysfunction and cellular senescence by inhibiting TRF 2 expression. *Aging Cell*, *14*(3), 391-399. https://doi.org/10.1111/acel.12304

Ma, X., Becker Buscaglia, L. E., Barker, J. R., & Li, Y. (2011). MicroRNAs in NF- B signaling. *Journal of Molecular Cell Biology*, *3*(3), 159-166. https://doi.org/10.1093/jmcb/mjr007

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. https://doi.org/10.1074/jbc.271.16.9249

Magno, S., Ceccarini, G., Pelosini, C., Ferrari, F., Prodam, F., Gilio, D., Maffei, M., Sessa, M. R., Barison, A., Ciccarone, A., Emdin, M., Aimaretti, G., & Santini, F. (2020). Atypical Progeroid Syndrome and Partial Lipodystrophy Due to LMNA Gene p.R349W Mutation. *Journal of the Endocrine Society*, *4*(10), Article 10. https://doi.org/10.1210/jendso/bvaa108

Mahboudi, H., Soleimani, M., Enderami, S. E., Kehtari, M., Ardeshirylajimi, A., Eftekhary, M., & Kazemi, B. (2018). Enhanced chondrogenesis differentiation of human induced pluripotent stem cells by MicroRNA-140 and transforming growth factor beta 3 (TGFβ3). *Biologicals*, *52*, 30-36. https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2018.01.005

Mahboudi, H., Soleimani, M., Hanaee-Ahvaz, H., Ghanbarian, H., Bandehpour, M., Enderami, S. E., & Kazemi, B. (2018). New Approach for Differentiation of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Toward Chondrocyte Cells With Overexpression of MicroRNA-140. *ASAIO Journal*, *64*(5), 662-672. https://doi.org/10.1097/MAT.0000000000000688

Manakanatas, C., Ghadge, S. K., Agic, A., Sarigol, F., Fichtinger, P., Fischer, I., Foisner, R., & Osmanagic-Myers, S. (2022). Endothelial and systemic upregulation of miR-34a-5p fine-tunes senescence in progeria. *Aging*, *14*(1), 195-224. https://doi.org/10.18632/aging.203820

Mariño, G., Ugalde, A. P., Fernández, Á. F., Osorio, F. G., Fueyo, A., Freije, J. M. P., & López-Otín, C. (2010a). 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*(37), 16268-16273. https://doi.org/10.1073/pnas.1002696107

Mariño, G., Ugalde, A. P., Fernández, Á. F., Osorio, F. G., Fueyo, A., Freije, J. M. P., & López-Otín, C. (2010b). 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*(37), 16268-16273. https://doi.org/10.1073/pnas.1002696107

Mateos, J., De la Fuente, A., Lesende-Rodriguez, I., Fernández-Pernas, P., Arufe, M. C., & Blanco, F. J. (2013). Lamin A deregulation in human mesenchymal stem cells promotes an impairment in their chondrogenic potential and imbalance in their response to oxidative stress. *Stem Cell Research*, *11*(3), 1137-1148. https://doi.org/10.1016/j.scr.2013.07.004

Mattick, J. S., Amaral, P. P., Carninci, P., Carpenter, S., Chang, H. Y., Chen, L.-L., Chen, R., Dean, C., Dinger, M. E., Fitzgerald, K. A., Gingeras, T. R., Guttman, M., Hirose, T., Huarte, M., Johnson,

R., Kanduri, C., Kapranov, P., Lawrence, J. B., Lee, J. T., … Wu, M. (2023). Long non-coding RNAs : Definitions, functions, challenges and recommendations. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *24*(6), 430-447. https://doi.org/10.1038/s41580-022-00566-8

Maynard, S., Hall, A., Galanos, P., Rizza, S., Yamamoto, T., Gram, H. H., Munk, S. H. N., Shoaib, M., Sørensen, C. S., Bohr, V. A., Lerdrup, M., Maya-Mendoza, A., & Bartek, J. (2022). Lamin A/C impairments cause mitochondrial dysfunction by attenuating PGC1α and the NAMPT-NAD+ pathway. *Nucleic Acids Research*, *50*(17), 9948-9965. https://doi.org/10.1093/nar/gkac741

McCord, R. P., Nazario-Toole, A., Zhang, H., Chines, P. S., Zhan, Y., Erdos, M. R., Collins, F. S., Dekker, J., & 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

Mencía, Á., Modamio-Høybjør, S., Redshaw, N., Morín, M., Mayo-Merino, F., Olavarrieta, L., Aguirre, L. A., Del Castillo, I., Steel, K. P., Dalmay, T., Moreno, F., & Moreno-Pelayo, M. Á. (2009). Mutations in the seed region of human miR-96 are responsible for nonsyndromic progressive hearing loss. *Nature Genetics*, *41*(5), 609-613. https://doi.org/10.1038/ng.355

Miyaki, S., Nakasa, T., Otsuki, S., Grogan, S. P., Higashiyama, R., Inoue, A., Kato, Y., Sato, T., Lotz, M. K., & Asahara, H. (2009). MicroRNA-140 is expressed in differentiated human articular chondrocytes and modulates interleukin-1 responses. *Arthritis and Rheumatism*, *60*(9), 2723-2730. https://doi.org/10.1002/art.24745

Moir, R. D., Spann, T. P., Herrmann, H., & Goldman, R. D. (2000). Disruption of Nuclear Lamin Organization Blocks the Elongation Phase of DNA Replication. *The Journal of Cell Biology*, *149*(6), 1179-1192. https://doi.org/10.1083/jcb.149.6.1179

Musich, P. R., & Zou, Y. (2009). Genomic instability and DNA damage responses in progeria arising from defective maturation of prelamin A. *Aging*, *1*(1), 28-37. https://doi.org/10.18632/aging.100012

Nakamura, Y., Inloes, J. B., Katagiri, T., & Kobayashi, T. (2011). Chondrocyte-specific microRNA-140 regulates endochondral bone development and targets Dnpep to modulate bone morphogenetic protein signaling. *Molecular and Cellular Biology*, *31*(14), Article 14. https://doi.org/10.1128/MCB.05178-11

Nissan, X., Blondel, S., Navarro, C., Maury, Y., Denis, C., Girard, M., Martinat, C., De Sandre-Giovannoli, A., Levy, N., & 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), Article 1. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2012.05.015

NONCODE. (s. d.). Consulté 28 décembre 2024, à l'adresse http://v5.noncode.org/

Orphanet : Dermopathie restrictive. (s. d.). Consulté 26 octobre 2024, à l'adresse https://www.orpha.net/fr/disease/detail/1662

Orphanet : Dysplasie mandibulo-acrale. (s. d.). Consulté 26 octobre 2024, à l'adresse https://www.orpha.net/fr/disease/detail/2457?name=2457&mode=orpha

Orphanet : Progéria. (s. d.). Consulté 26 octobre 2024, à l'adresse https://www.orpha.net/fr/disease/detail/740

Orphanet : Progéria de Nestor-Guillermo. (s. d.). Consulté 27 octobre 2024, à l'adresse https://www.orpha.net/fr/disease/detail/280576?name=280576&mode=orpha

Orphanet : Syndrome de Werner atypique. (s. d.). Consulté 26 octobre 2024, à l'adresse https://www.orpha.net/fr/disease/detail/79474?name=ORPHA%2379474&mode=orpha

Osorio, F. G., Bárcena, C., Soria-Valles, C., Ramsay, A. J., de Carlos, F., Cobo, J., Fueyo, A., Freije, J. M. P., & López-Otín, C. (2012). Nuclear lamina defects cause ATM-dependent NF-κB activation and link accelerated aging to a systemic inflammatory response. *Genes & Development*, *26*(20), Article 20. https://doi.org/10.1101/gad.197954.112

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., Depetris, D., de Carlos, F., Cobo, J., Andrés, V., De Sandre-Giovannoli, A., Freije, J. M. P., Lévy, N., & López-Otín, C. (2011a). Splicing-directed therapy in a new mouse model of human accelerated aging. *Science Translational Medicine*, *3*(106), Article 106. https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3002847

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., Depetris, D., de Carlos, F., Cobo, J., Andrés, V., De Sandre-Giovannoli, A., Freije, J. M. P., Lévy, N., & López-Otín, C. (2011b). Splicing-Directed Therapy in a New Mouse Model of Human Accelerated Aging. *Science Translational Medicine*, *3*(106), Article 106. https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3002847

Pal, S., & Tyler, J. K. (2016). Epigenetics and aging. *Science Advances*, *2*(7), e1600584. https://doi.org/10.1126/sciadv.1600584

Papaioannou, G., Mirzamohammadi, F., Lisse, T. S., Nishimori, S., Wein, M. N., & Kobayashi, T. (2015). MicroRNA-140 Provides Robustness to the Regulation of Hypertrophic Chondrocyte Differentiation by the PTHrP-HDAC4 Pathway. *Journal of Bone and Mineral Research*, *30*(6), 1044-1052. https://doi.org/10.1002/jbmr.2438

Park, Y.-E., Hayashi, Y. K., Bonne, G., Arimura, T., Noguchi, S., Nonaka, I., & Nishino, I. (2009). Autophagic degradation of nuclear components in mammalian cells. *Autophagy*, *5*(6), 795-804. https://doi.org/10.4161/auto.8901

Paul, P., Chakraborty, A., Sarkar, D., Langthasa, M., Rahman, M., Bari, M., Singha, Rk. S., Malakar, A. K., & Chakraborty, S. (2018). Interplay between miRNAs and human diseases. *Journal of Cellular Physiology*, *233*(3), 2007-2018. https://doi.org/10.1002/jcp.25854

Pendás, A. M., Zhou, Z., Cadiñanos, J., Freije, J. M. P., Wang, J., Hultenby, K., Astudillo, A., Wernerson, A., Rodríguez, F., Tryggvason, K., & López-Otín, C. (2002). Defective prelamin A processing and

muscular and adipocyte alterations in Zmpste24 metalloproteinase–deficient mice. *Nature Genetics*, *31*(1), Article 1. https://doi.org/10.1038/ng871

Pickersgill, H., Kalverda, B., De Wit, E., Talhout, W., Fornerod, M., & Van Steensel, B. (2006). Characterization of the Drosophila melanogaster genome at the nuclear lamina. *Nature Genetics*, *38*(9), 1005-1014. https://doi.org/10.1038/ng1852

Piekarowicz, K., Machowska, M., Dzianisava, V., & Rzepecki, R. (2019). Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome—Current Status and Prospects for Gene Therapy Treatment. *Cells*, *8*(2), Article 2. https://doi.org/10.3390/cells8020088

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*, *105*(5), 1608-1613. https://doi.org/10.1073/pnas.0707594105

Poy, M. N., Eliasson, L., Krutzfeldt, J., Kuwajima, S., Ma, X., MacDonald, P. E., Pfeffer, S., Tuschl, T., Rajewsky, N., Rorsman, P., & Stoffel, M. (2004). A pancreatic islet-specific microRNA regulates insulin secretion. *Nature*, *432*(7014), 226-230. https://doi.org/10.1038/nature03076

Poy, M. N., Hausser, J., Trajkovski, M., Braun, M., Collins, S., Rorsman, P., Zavolan, M., & Stoffel, M. (2009). *miR-375* maintains normal pancreatic α- and β-cell mass. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *106*(14), 5813-5818. https://doi.org/10.1073/pnas.0810550106

Poy, M. N., Spranger, M., & Stoffel, M. (2007). microRNAs and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, *9*(s2), 67-73. https://doi.org/10.1111/j.1463-1326.2007.00775.x

Progeria Research Foundation. (2022, septembre 10). Progeria Research Foundation. https://www.progeriaresearch.org/

Puttaraju, M., Jackson, M., Klein, S., Shilo, A., Bennett, C. F., Gordon, L., Rigo, F., & Misteli, T. (2021). Systematic screening identifies therapeutic antisense oligonucleotides for Hutchinson–Gilford progeria syndrome. *Nature Medicine*, *27*(3), 526-535. https://doi.org/10.1038/s41591-021-01262-4

Ramos, F. J., Chen, S. C., Garelick, M. G., Dai, D.-F., Liao, C.-Y., Schreiber, K. H., MacKay, V. L., An, E. H., Strong, R., Ladiges, W. C., Rabinovitch, P. S., Kaeberlein, M., & Kennedy, B. K. (2012). Rapamycin Reverses Elevated mTORC1 Signaling in Lamin A/C–Deficient Mice, Rescues Cardiac and Skeletal Muscle Function, and Extends Survival. *Science Translational Medicine*, *4*(144). https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3003802

Renard, D., Fourcade, G., Milhaud, D., Bessis, D., Esteves-Vieira, V., Boyer, A., Roll, P., Bourgeois, P., Levy, N., & De Sandre-Giovannoli, A. (2009). Novel LMNA mutation in atypical Werner syndrome presenting with ischemic disease. *Stroke*, *40*(2), e11-14. https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.108.531780

Richards, S. A., Muter, J., Ritchie, P., Lattanzi, G., & 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*(20), Article 20. https://doi.org/10.1093/hmg/ddr327

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., & Andrés, V. (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. https://doi.org/10.1016/j.jprot.2013.08.008

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

Rokavec, M., Li, H., Jiang, L., & Hermeking, H. (2014). The p53/miR-34 axis in development and disease. *Journal of Molecular Cell Biology*, *6*(3), 214-230. https://doi.org/10.1093/jmcb/mju003

Romaine, S. P. R., Tomaszewski, M., Condorelli, G., & Samani, N. J. (2015). MicroRNAs in cardiovascular disease : An introduction for clinicians. *Heart*, *101*(12), Article 12. https://doi.org/10.1136/heartjnl-2013-305402

Rupaimoole, R., & Slack, F. J. (2017). MicroRNA therapeutics : Towards a new era for the management of cancer and other diseases. *Nature Reviews Drug Discovery*, *16*(3), 203-222. https://doi.org/10.1038/nrd.2016.246

Saliminejad, K., Khorram Khorshid, H. R., Soleymani Fard, S., & Ghaffari, S. H. (2019). An overview of microRNAs : Biology, functions, therapeutics, and analysis methods. *Journal of Cellular Physiology*, *234*(5), 5451-5465. https://doi.org/10.1002/jcp.27486

Sanchez, A., Lhuillier, J., Grosjean, G., Ayadi, L., & Maenner, S. (2023). The Long Non-Coding RNA ANRIL in Cancers. *Cancers*, *15*(16), 4160. https://doi.org/10.3390/cancers15164160

Santaris Pharma A/S. (2012). *A Phase 2a, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Ascending Multiple-Dose Study to Assess Safety, Tolerability, Pharmacokinetics and Antiviral Activity of SPC3649 (Miravirsen) Administered to Treatment-Naïve Subjects With Chronic Hepatitis C (CHC) Infection* (Clinical trial registration No. NCT01200420). clinicaltrials.gov. https://clinicaltrials.gov/study/NCT01200420

Santiago-Fernández, O., Osorio, F. G., Quesada, V., Rodríguez, F., Basso, S., Maeso, D., Rolas, L., Barkaway, A., Nourshargh, S., Folgueras, A. R., Freije, J. M. P., & López-Otín, C. (2019). Development of a CRISPR/Cas9-based therapy for Hutchinson–Gilford progeria syndrome. *Nature Medicine*, *25*(3), Article 3. https://doi.org/10.1038/s41591-018-0338-6

Scaffidi, P., & Misteli, T. (2005). Reversal of the cellular phenotype in the premature aging disease Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Nature Medicine*, *11*(4), 440-445. https://doi.org/10.1038/nm1204

Scaffidi, P., & Misteli, T. (2006). Lamin A-Dependent Nuclear Defects in Human Aging. *Science*, *312*(5776), 1059-1063. https://doi.org/10.1126/science.1127168

Schmitz, S. U., Grote, P., & Herrmann, B. G. (2016). Mechanisms of long noncoding RNA function in development and disease. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, *73*(13), 2491-2509. https://doi.org/10.1007/s00018-016-2174-5

Shan, Z.-X., Lin, Q.-X., Deng, C.-Y., Zhu, J.-N., Mai, L.-P., Liu, J.-L., Fu, Y.-H., Liu, X.-Y., Li, Y.-X., Zhang, Y.-Y., Lin, S.-G., & Yu, X.-Y. (2010). miR-1/miR-206 regulate Hsp60 expression contributing to glucose-mediated apoptosis in cardiomyocytes. *FEBS Letters*, *584*(16), 3592-3600. https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.07.027

Shanmugam, N., Reddy, M. A., & Natarajan, R. (2008). Distinct Roles of Heterogeneous Nuclear Ribonuclear Protein K and microRNA-16 in Cyclooxygenase-2 RNA Stability Induced by S100b, a Ligand of the Receptor for Advanced Glycation End Products*. *Journal of Biological Chemistry*, *283*(52), 36221-36233. https://doi.org/10.1074/jbc.M806322200

Shimi, T., Kittisopikul, M., Tran, J., Goldman, A. E., Adam, S. A., Zheng, Y., Jaqaman, K., & Goldman, R. D. (2015). Structural organization of nuclear lamins A, C, B1, and B2 revealed by superresolution microscopy. *Molecular Biology of the Cell*, *26*(22), 4075-4086. https://doi.org/10.1091/mbc.E15-07-0461

Shimi, T., Pfleghaar, K., Kojima, S., Pack, C.-G., Solovei, I., Goldman, A. E., Adam, S. A., Shumaker, D. K., Kinjo, M., Cremer, T., & Goldman, R. D. (2008). The A- and B-type nuclear lamin networks : Microdomains involved in chromatin organization and transcription. *Genes & Development*, *22*(24), 3409-3421. https://doi.org/10.1101/gad.1735208

Shin, J.-Y., & Worman, H. J. (2022). Molecular Pathology of Laminopathies. *Annual Review of Pathology*, *17*, 159-180. https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-042220-034240

Small, E. M., & Olson, E. N. (2011). Pervasive roles of microRNAs in cardiovascular biology. *Nature*, *469*(7330), 336-342. https://doi.org/10.1038/nature09783

Starr, D. A., & Fridolfsson, H. N. (2010). Interactions Between Nuclei and the Cytoskeleton Are Mediated by SUN-KASH Nuclear-Envelope Bridges. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, *26*(1), 421-444. https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-100109-104037

Strandgren, C., Revêchon, G., Carvajal, A. S., & Eriksson, M. (2017). Emerging candidate treatment strategies for Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Biochemical Society Transactions*, *45*(6), 1279-1293. https://doi.org/10.1042/BST20170141

Sullivan, T., Escalante-Alcalde, D., Bhatt, H., Anver, M., Bhat, N., Nagashima, K., Stewart, C. L., & Burke, B. (1999). Loss of a-Type Lamin Expression Compromises Nuclear Envelope Integrity Leading to Muscular Dystrophy. *The Journal of Cell Biology*, *147*(5), 913-920. https://doi.org/10.1083/jcb.147.5.913

Sun, C.-C., Li, L., Jiang, Z.-C., Liu, Z.-C., Wang, L., & Wang, H.-J. (2023). The Functional Role of LncRNA UCA1 in Pancreatic Cancer : A mini-review. *Journal of Cancer*, *14*(2), 275-280. https://doi.org/10.7150/jca.79171

Sun, H., Peng, G., Wu, H., Liu, M., Mao, G., Ning, X., Yang, H., & Deng, J. (2020). Long non-coding RNA MEG3 is involved in osteogenic differentiation and bone diseases (Review). *Biomedical Reports*, *13*(1), 15-21. https://doi.org/10.3892/br.2020.1305

Suzuki, M., Jeng, L. J. B., Chefo, S., Wang, Y., Price, D., Li, X., Wang, J., Li, R.-J., Ma, L., Yang, Y., Zhang, X., Zheng, N., Zhang, K., Joseph, D. B., Shroff, H., Doan, J., Pacanowski, M., Smpokou, P., Donohue, K., & Joffe, H. V. (2023). FDA approval summary for lonafarnib (Zokinvy) for the treatment of Hutchinson-Gilford progeria syndrome and processing-deficient progeroid laminopathies. *Genetics in Medicine*, *25*(2), 100335. https://doi.org/10.1016/j.gim.2022.11.003

Swahari, V., Nakamura, A., Hollville, E., Hung, Y.-H., Kanke, M., Kurtz, C. L., Caravia, X. M., Roiz-Valle, D., He, S., Krishnamurthy, J., Kapoor, S., Prasad, V., Flowers, C., Beck, M., Baran-Gale, J., Sharpless, N., López-Otín, C., Sethupathy, P., & Deshmukh, M. (2024). miR-29 is an important driver of aging-related phenotypes. *Communications Biology*, *7*(1), 1055. https://doi.org/10.1038/s42003-024-06735-z

Tajik, A., Zhang, Y., Wei, F., Sun, J., Jia, Q., Zhou, W., Singh, R., Khanna, N., Belmont, A. S., & Wang, N. (2016). Transcription upregulation via force-induced direct stretching of chromatin. *Nature Materials*, *15*(12), 1287-1296. https://doi.org/10.1038/nmat4729

Tang, C. W., Maya-Mendoza, A., Martin, C., Zeng, K., Chen, S., Feret, D., Wilson, S. A., & Jackson, D. A. (2008). The integrity of a lamin-B1-dependent nucleoskeleton is a fundamental determinant of RNA synthesis in human cells. *Journal of Cell Science*, *121*(7), 1014-1024. https://doi.org/10.1242/jcs.020982

Tang, Y., Zhou, T., Yu, X., Xue, Z., & Shen, N. (2017). The role of long non-coding RNAs in rheumatic diseases. *Nature Reviews Rheumatology*, *13*(11), 657-669. https://doi.org/10.1038/nrrheum.2017.162

Tazawa, H., Tsuchiya, N., Izumiya, M., & Nakagama, H. (2007). Tumor-suppressive *miR-34a* induces senescence-like growth arrest through modulation of the E2F pathway in human colon cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *104*(39), 15472-15477. https://doi.org/10.1073/pnas.0707351104

Toth, J. I., Yang, S. H., Qiao, X., Beigneux, A. P., Gelb, M. H., Moulson, C. L., Miner, J. H., Young, S. G., & Fong, L. G. (2005). Blocking protein farnesyltransferase improves nuclear shape in fibroblasts from humans with progeroid syndromes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *102*(36), 12873-12878. https://doi.org/10.1073/pnas.0505767102

Turgay, Y., Eibauer, M., Goldman, A. E., Shimi, T., Khayat, M., Ben-Harush, K., Dubrovsky-Gaupp, A., Sapra, K. T., Goldman, R. D., & 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., Ramsay, A. J., De La Rosa, J., Varela, I., Mariño, G., Cadiñanos, J., Lu, J., Freije, J. M., & López-Otín, C. (2011). Aging and chronic DNA damage response activate a regulatory pathway

involving miR-29 and p53 : Regulatory circuitry 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. In *Handbook of Clinical Neurology* (Vol. 132, p. 249-264). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-444-62702-5.00018-4

Vahabikashi, A., Adam, S. A., Medalia, O., & Goldman, R. D. (2022). Nuclear lamins : Structure and function in mechanobiology. *APL Bioengineering*, *6*(1), 011503. https://doi.org/10.1063/5.0082656

Van Skike, C. E., DeRosa, N., Galvan, V., & Hussong, S. A. (2023). Rapamycin restores peripheral blood flow in aged mice and in mouse models of atherosclerosis and Alzheimer's disease. *GeroScience*, *45*(3), 1987-1996. https://doi.org/10.1007/s11357-023-00786-6

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

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., Tryggvason, K., Freije, J. M. P., & López-Otín, C. (2005). Accelerated ageing in mice deficient in Zmpste24 protease is linked to p53 signalling activation. *Nature*, *437*(7058), 564-568. https://doi.org/10.1038/nature04019

Varela, I., Pereira, S., Ugalde, A. P., Navarro, C. L., Suárez, M. F., Cau, P., Cadiñanos, J., Osorio, F. G., Foray, N., Cobo, J., De Carlos, F., Lévy, N., Freije, J. M. P., & López-Otín, C. (2008). Combined treatment with statins and aminobisphosphonates extends longevity in a mouse model of human premature aging. *Nature Medicine*, *14*(7), 767-772. https://doi.org/10.1038/nm1786

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

Vidak, S., & Foisner, R. (2016). Molecular insights into the premature aging disease progeria. *Histochemistry and Cell Biology*, *145*(4), Article 4. https://doi.org/10.1007/s00418-016-1411-1

Visel, A., Zhu, Y., May, D., Afzal, V., Gong, E., Attanasio, C., Blow, M. J., Cohen, J. C., Rubin, E. M., & Pennacchio, L. A. (2010). Targeted deletion of the 9p21 non-coding coronary artery disease risk interval in mice. *Nature*, *464*(7287), 409-412. https://doi.org/10.1038/nature08801

Viteri, G., Chung, Y. W., & 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*(1), Article 1. https://doi.org/10.1016/j.mad.2009.11.006

Völler, D., Reinders, J., Meister, G., & Bosserhoff, A.-K. (2013). Strong reduction of AGO2 expression in melanoma and cellular consequences. *British Journal of Cancer*, *109*(12), 3116-3124. https://doi.org/10.1038/bjc.2013.646

Von Muhlinen, N., Horikawa, I., Alam, F., Isogaya, K., Lissa, D., Vojtesek, B., Lane, D. P., & Harris, C. C. (2018). P53 isoforms regulate premature aging in human cells. *Oncogene*, *37*(18), 2379-2393. https://doi.org/10.1038/s41388-017-0101-3

Wahid, F., Shehzad, A., Khan, T., & Kim, Y. Y. (2010). MicroRNAs : Synthesis, mechanism, function, and recent clinical trials. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, *1803*(11), 1231-1243. https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2010.06.013

Wang, H., Wu, Q., Zhang, Y., Zhang, H.-N., Wang, Y.-B., & Wang, W. (2017). TGF-β1-induced epithelial–mesenchymal transition in lung cancer cells involves upregulation of miR-9 and downregulation of its target, E-cadherin. *Cellular & Molecular Biology Letters*, *22*(1), 22. https://doi.org/10.1186/s11658-017-0053-1

Wang, X., Qian, R., Zhang, W., Chen, S., Jin, H., & Hu, R. (2009). MicroRNA-320 EXPRESSION IN MYOCARDIAL MICROVASCULAR ENDOTHELIAL CELLS AND ITS RELATIONSHIP WITH INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR-1 IN TYPE 2 DIABETIC RATS. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, *36*(2), 181-188. https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.2008.05057.x

Wang, Y., Medvid, R., Melton, C., Jaenisch, R., & Blelloch, R. (2007). DGCR8 is essential for microRNA biogenesis and silencing of embryonic stem cell self-renewal. *Nature Genetics*, *39*(3), 380-385. https://doi.org/10.1038/ng1969

Weber, M., Kim, S., Patterson, N., Rooney, K., & Searles, C. D. (2014). MiRNA-155 targets myosin light chain kinase and modulates actin cytoskeleton organization in endothelial cells. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, *306*(8), H1192-H1203. https://doi.org/10.1152/ajpheart.00521.2013

Wood, A. M., Danielsen, J. M. R., Lucas, C. A., Rice, E. L., Scalzo, D., Shimi, T., Goldman, R. D., Smith, E. D., Le Beau, M. M., & Kosak, S. T. (2014). TRF2 and lamin A/C interact to facilitate the functional organization of chromosome ends. *Nature Communications*, *5*(1), Article 1. https://doi.org/10.1038/ncomms6467

Worman, H. J. (2012). Nuclear lamins and laminopathies. *The Journal of Pathology*, *226*(2), 316-325. https://doi.org/10.1002/path.2999

Xia, H.-Q., Pan, Y., Peng, J., & Lu, G.-X. (2011). Over-expression of miR375 reduces glucose-induced insulin secretion in Nit-1 cells. *Molecular Biology Reports*, *38*(5), 3061-3065. https://doi.org/10.1007/s11033-010-9973-9

Xie, W., Chojnowski, A., Boudier, T., Lim, J. S. Y., Ahmed, S., Ser, Z., Stewart, C., & Burke, B. (2016). A-type Lamins Form Distinct Filamentous Networks with Differential Nuclear Pore Complex Associations. *Current Biology*, *26*(19), 2651-2658. https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.07.049

Xie, W., Jiang, L., Huang, X., Shang, H., Gao, M., You, W., Tan, J., Yan, H., & Sun, W. (2021). lncRNA MEG8 is downregulated in osteoarthritis and regulates chondrocyte cell proliferation, apoptosis and inflammation. *Experimental and Therapeutic Medicine*, *22*(4), 1153. https://doi.org/10.3892/etm.2021.10587

Xiong, X., Jung, H. J., Gombar, S., Park, J. Y., Zhang, C., Zheng, H., Ruan, J., Li, J., Kaeberlein, M., Kennedy, B. K., Zhou, Z., Liu, X., & 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/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, *777*, 69-78. https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2015.04.010

Xiong, Z., Choi, J. Y., Wang, K., Zhang, H., Tariq, Z., Wu, D., Ko, E., LaDana, C., Sesaki, H., & Cao, K. (2016). Methylene blue alleviates nuclear and mitochondrial abnormalities in progeria. *Aging Cell*, *15*(2), Article 2. https://doi.org/10.1111/acel.12434

Yang, S. H. (2006). A farnesyltransferase inhibitor improves disease phenotypes in mice with a Hutchinson-Gilford progeria syndrome mutation. *Journal of Clinical Investigation*, *116*(8), Article 8. https://doi.org/10.1172/JCI28968

Yao, W., Kulyar, M. F.-A., Ding, Y., Du, H., Hong, J., Loon, K. S., Nawaz, S., & Li, J. (2023). The Effect of miR-140-5p with HDAC4 towards Growth and Differentiation Signaling of Chondrocytes in Thiram-Induced Tibial Dyschondroplasia. *International Journal of Molecular Sciences*, *24*(13), 10975. https://doi.org/10.3390/ijms241310975

Yeh, W. C., Bierer, B. E., & McKnight, S. L. (1995). Rapamycin inhibits clonal expansion and adipogenic differentiation of 3T3-L1 cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *92*(24), Article 24. https://doi.org/10.1073/pnas.92.24.11086

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

Ying, L., Huang, Y., Chen, H., Wang, Y., Xia, L., Chen, Y., Liu, Y., & Qiu, F. (2013). Downregulated MEG3 activates autophagy and increases cell proliferation in bladder cancer. *Molecular BioSystems*, *9*(3), 407. https://doi.org/10.1039/c2mb25386k

Yoshino, J., Mills, K. F., Yoon, M. J., & Imai, S. (2011). Nicotinamide Mononucleotide, a Key NAD+ Intermediate, Treats the Pathophysiology of Diet- and Age-Induced Diabetes in Mice. *Cell Metabolism*, *14*(4), 528-536. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.08.014

Yu, K.-R., Lee, S., Jung, J.-W., Hong, I.-S., Kim, H.-S., Seo, Y., Shin, T., & Kang, K.-S. (2013). MicroRNA-141-3p plays a role in human mesenchymal stem cell aging by directly targeting ZMPSTE24. *Journal of Cell Science*, jcs.133314. https://doi.org/10.1242/jcs.133314

Zeng, W., Ball Jr, A. R., & Yokomori, K. (2010). HP1 : Heterochromatin binding proteins working the genome. *Epigenetics*, *5*(4), 287-292. https://doi.org/10.4161/epi.5.4.11683

Zhang, B., Dong, Y., & Zhao, Z. (2019). LncRNA MEG8 regulates vascular smooth muscle cell proliferation, migration and apoptosis by targeting PPARα. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *510*(1), 171-176. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.01.074

Zhang, C.-L., Liu, X., He, Q.-J., Zheng, H., Xu, S., Xiong, X.-D., Yuan, Y., Ruan, J., Li, J.-B., Xing, Y., Zhou, Z., & Deng, S. (2017). miR-342-5p promotes Zmpste24-deficient mouse embryonic fibroblasts

proliferation by suppressing GAS2. *Molecular Medicine Reports*, *16*(6), 8944-8952. https://doi.org/10.3892/mmr.2017.7731

Zhang, J., Fan, X., Wang, C., Liu, B., Li, Q., & Zhou, X. (2013). Up-regulation of Ago2 expression in gastric carcinoma. *Medical Oncology*, *30*(3), 628. https://doi.org/10.1007/s12032-013-0628-2

Zhao, K., Harel, A., Stuurman, N., Guedalia, D., & Gruenbaum, Y. (1996). Binding of matrix attachment regions to nuclear lamin is mediated by the rod domain and depends on the lamin polymerization state. *FEBS Letters*, *380*(1-2), 161-164. https://doi.org/10.1016/0014-5793(96)00034-8

Zhao, W., Zhao, S.-P., & Zhao, Y.-H. (2015). MicroRNA-143/-145 in Cardiovascular Diseases. *BioMed Research International*, *2015*, 1-9. https://doi.org/10.1155/2015/531740