

UNIVERSITE D'ÉVRY VAL D'ESSONE

École Doctorale « Des génomes aux organismes »



THESE

Présentée pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE D'ÉVRY VAL D'ESSONE

Mention « Biologie cellulaire et moléculaire »

par

Sophie BLONDEL

Utilisation des cellules souches induites à la pluripotence pour la modélisation pathologique du syndrome de Hutchinson Gilford



Soutenue le mercredi 4 septembre 2013 à 14h30 à Evry devant le jury composé de :

Pr Sylvain FISSON	Président du jury
Dr Gisèle BONNE	Rapporteur
Dr Jean-Marc LEMAITRE	Rapporteur
Dr Alexandre MÉJAT	Examinateur
Dr Annelise BENNACEUR	Examinateur
Pr Nicolas LEVY	Examinateur
Dr Xavier NISSAN	Co-Directeur de Thèse
Dr Marc PESCHANSKI	Co-Directeur de Thèse



Table des matières

<i>Avant propos</i>	4
<i>Remerciements</i>	5
<i>Abréviations</i>	7
<i>Index des figures</i>	10
<i>Index des tableaux</i>	12
<i>Résumé</i>	13
<i>Introduction</i>	15
I. Les laminopathies	17
I.1 Les lames : du gène à la fonction	17
I.2 Physiopathologie clinique des laminopathies	27
II. La progéria : Etat de l'art	38
II.1 Mécanismes physiopathologiques de la progéria	40
II.2 Tableau clinique des patients atteints par la progéria	46
II.3 Modèles d'étude de la pathologie	50
II.4 Approches thérapeutiques	59
III. Les cellules souches induites à la pluripotence : modèle d'étude de la progéria	77
III.1 Les cellules souches	77
III.2 Les cellules souches induites à la pluripotence ou iPSCs	83
III.3 Utilisation des cellules souches pluripotentes pour la modélisation pathologique et le criblage de petites molécules	98
IV. Objectifs de la thèse	113
<i>Résultats</i>	115
I. Découverte du rôle de miR-9 dans la protection des neurones dans la progéria	117
I.1 Contexte de l'étude	117
I.2 Mise en place d'un modèle iPSC de la progeria	117
I.3 Mise en évidence du rôle miR-9 dans la régulation de la lamin A	118
I.4 Etude du potentiel thérapeutique de miR-9	119
I.5 Conclusion	119
II. Utilisation des cellules souches pluripotentes pour l'exploration fonctionnelle des molécules actuellement à l'étude pour le traitement de la progeria	129
II.1 Contexte de l'étude	129
II.2 Caractérisation du modèle d'étude	130

II.3	Etude de l'effet des composés sur l'atteinte des MSC progeria	130
II.4	Conclusion.....	131
III.	Réalisation d'un criblage à haut contenu de 20657 composés sur des MSCs dérivées d'iPSCs de patients atteints par la progéria	159
III.1	Contexte de l'étude.....	159
III.2	Mise au point du test de criblage.....	159
III.3	Résultats du criblage	160
III.4	Conclusion	161
<i>Discussion et perspectives.....</i>	191	
I.	La modélisation pathologique de la progéria.....	193
I.1	Mise en place du modèle d'iPSCs progéria	193
I.2	Mécanismes moléculaires impliqués dans la physiopathologie de la progeria: émergence du rôle des microARNs.....	194
I.3	Mise en place d'un modèle pharmacologique de la progeria.....	197
II.	Le criblage à haut contenu, et ensuite ?	199
II.1	Le choix de la chimiothèque	200
II.2	Recherche du mécanisme d'action des molécules nouvellement identifiées	201
II.3	Optimisation chimique des hits	203
II.4	Apport du modèle iPSCs à d'autres points clés du développement des hits.....	204
III.	Autre piste thérapeutique : les modulateurs d'épissage alternatifs.....	206
III.1	Recherche de modulateurs d'épissage alternatifs dans la progéria	206
III.2	Mise en évidence de la metformine pour le traitement de la progeria.....	208
III.3	Conclusions et perspectives	210
IV.	Conclusion générale	211
<i>Annexes.....</i>	213	
<i>Index des annexes.....</i>	215	
I.	miR-9 : la sentinelle des neurones dans la progéria	217
II.	In vitro pathological modelling using patient-specific induced pluripotent stem cell: the case of progeria	221
III.	Metformin control of multiple alternative RNA splicing opens new therapeutic potentials	227
<i>Références bibliographiques</i>	255	

Avant propos

« Chercher n'est pas une chose et trouver une autre, mais le gain de la recherche, c'est la recherche même. »

Saint Grégoire de Nysse Vème siècle

« Dans les sciences, le chemin est plus important que le but. Les sciences n'ont pas de fin. »

Erwin Chargaff (1905-2002)

Bien qu'une unique personne rédige et signe un manuscrit de thèse, il est bien le fruit d'un travail collectif, alliant les compétences d'un chef d'orchestre et de ses musiciens. Le résultat d'une telle entreprise dépend, il est certain, de la chance mais également de l'investissement personnel qu'on a bien su, pu ou voulu lui accorder.

Ce sujet de recherche s'est approprié près de trois années de ma vie, mêlant des moments de joie et d'hésitation, au gré des petites découvertes qui ont rythmées cette période. Si l'objectif d'un travail de thèse peut être illustré par un vase qu'il faut remplir, alors à chaque petite avancée une goutte y a été versée, parfois, deux ou trois à la fois, en espérant le voir plein à l'issue du temps imparti. Mais à chaque fois, les résultats ont apporté la même satisfaction, la même étincelle, un petit moteur qui motive la poursuite de l'aventure. Au terme de cette expérience, je ressors un peu plus grandie (certain rirons à la lecture de cette expression), enrichie par les rencontres humaines et les connaissances acquises, et comblée par la petite contribution que j'ai pu apporter à ce projet.

Le périple de ma formation touche à sa fin, et c'est sans regret que je suivrais à nouveau le même parcours si le choix m'en était donné. Même si ces années ont été ponctuées de sacrifices, elles ont aussi été vécues, enrichissant ma mémoire de souvenirs uniques, me construisant progressivement vers l'être que je suis aujourd'hui. Mon apprentissage de la vie et de la science ne fait que commencer et j'aimerai mettre à profit cette formidable expérience au service des malades.

Remerciements

En premier lieu, je souhaiterais remercier très sincèrement Gisèle Bonne et Jean-Marc Lemaître d'avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail et d'y avoir consacré un temps que je sais précieux. Je présente mes sincères remerciements aux examinateurs qui me font l'honneur d'évaluer mes travaux de thèse Annelise Bennaceur, Alexandre Méjat et Nicolas Lévy. Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance et mes remerciements à Sylvain Fisson pour avoir accepté d'être le président du jury.

Mes remerciements s'adressent particulièrement à Marc Peschanski pour m'avoir donné cette formidable opportunité de réaliser ma thèse à I-Stem. Merci pour la confiance que tu m'as accordée, merci pour tes encouragements et les multiples discussions scientifiques de bon matin. Je garderai en mémoire deux petites phrases que tu aimes à utiliser pour dynamiser le travail au quotidien : je cite « Alors ça avance ? », « Cet article, il est fini ? ».

Je voudrais témoigner ma reconnaissance à Xavier Nissan pour m'avoir guidée dans ce projet passionnant. Merci pour ton encadrement de qualité, ta disponibilité, ta réactivité et surtout ton enthousiasme pour la recherche, merci pour les multiples discussions scientifiques captivantes, parfois animées mais toujours formatrices. Je voudrais sincèrement te remercier pour la grande autonomie que tu m'as laissée et pour m'avoir accordé la possibilité de conserver mon activité officinale tout au long de cette thèse.

Mes remerciements s'adressent aussi à Gille Lemaître pour ses conseils avisés et l'aide qu'il m'a apportée dans la rédaction de ce manuscrit. C'est toujours un plaisir d'échanger avec toi.

Un grand merci à Delphine Laustriat pour son dynamisme, sa rigueur et ses précieux conseils. J'ai beaucoup appris à tes côtés et ce fut un réel plaisir de travailler avec toi !

Je tiens à remercier les membres de l'équipe progéria : Anne-Laure Jaskoviack, Anne-Laure Egesip et Amélie LeCorf qui nous ont progressivement rejoints au cours de cette dernière année, apportant chacune leurs compétences et leurs petites touches personnelles.

Je tiens à remercier mes voisins de bureau pour les agréables moments partagés, notamment Yves, le fantôme du bureau ! Merci pour tout le temps que tu m'as consacré lors de mes nombreuses galères à l'Array Scan. Stéphane, les profondes discussions que nous avions tard le soir me manquent déjà... Emeline, la dernière arrivée mais la plus studieuse, merci pour ta bonne humeur et Pascal pour tous ces délicieux gâteaux, bonbons et autres chocolats partagés, toujours dévoué pour participer au goûter. Claire, Aurélie, Pauline et Cécile, mes voisines de bureau prolongé, merci pour toutes ces discussions existentielles, ces franches rigolades et l'atmosphère sympathique que vous faites régner dans ce petit espace.

Un énorme merci à mes voisins de secteur qui m'ont accueillie successivement. Tout a commencé avec Manoubia, Jennifer, Sophie et Yolande, merci pour tous les fous rires partagés, les discussions variées et l'ambiance conviviale. Je serais bien restée un peu plus longtemps ! Benjamin et Johanna, merci pour vos compétences en robotique, l'aide apportée à ce travail et votre disponibilité. Nous n'avons pas cohabité longtemps mais ces quelques mois ont été un véritable plaisir, toujours en musique !

Merci à tous ceux qui constituent I-Stem. Je pense particulièrement à Valérie, merci pour tes petites anecdotes entre deux manips. Au fait, j'ai une question : dit-on « médicament candidat » ou « candidat médicamenteux » ? Jacquie, ton sourire et ta bonne humeur étaient chaque jour ce long couloir d'I-Stem. Alex, merci pour les œufs frais que tu nous ramènes chaque lundi et tous ces repas animés du midi. Walter, ton accent italien chantant me fera toujours sourire. Delphine Peric, merci pour ta gentillesse quotidienne et le partage de nos écueils communs avec nos stagiaires. Laetitia, je ne te remercierai jamais assez pour tes coups de main sur Endnote ! Christine, à quand la prochaine séance de TP ensemble ?

Mes amis proches Dorothée, Loïc, Nelly, Rémy, Amandine, Diane, merci de m'avoir encouragée tout au long de cette période, vous avez été formidables ! Anne-Laure, notre première thèse, nous l'avions écrite en même temps mais pour la deuxième, désolée de ne pas t'avoir attendue... c'est sûr qu'une thèse de sciences c'est plus court que de reprendre médecine ! J'ai une pensée pour Pierre, le roi du sommaire automatique ! Sans toi ce manuscrit n'aurait pas une mise en page aussi travaillée !

Je remercie de tout cœur ma mère et mon père qui m'ont toujours soutenue dans mes projets, encouragée à faire ce qui me plaisait. Grâce à vous, je suis parvenue à ce que j'espérais et aucun mot ne sera jamais assez fort pour exprimer toute ma gratitude. Fanny et Sacha, merci pour vos encouragements, vous avez joué un rôle crucial dans mon équilibre. Enorme merci à Binou pour tes connaissances hors pair en règles de grammaire qui m'ont été d'un grand secours dans la rédaction et le temps que tu as consacré à la lecture et relecture de ces « quelques » pages. Mémé, heureusement que tu as été là pour nous héberger pendant la quasi-totalité de ma thèse, sans toi, j'aurais dû dormir au labo... Sergio et Cricri, merci de m'avoir laissée emmener votre fils dans cette aventure et d'avoir cru en ma démarche.

Mes ultimes remerciements s'adressent à Stéphane qui a eu la patience de m'attendre pendant toutes ces années. Tu as su me mettre dans un véritable cocon, comme tu le dis si bien, tout en me soutenant et m'encourageant quelques soient les circonstances. MERCI !

Abréviations

- AAT : Alpha-1-antitrypsine
- ADME : Administration Distribution Metabolisme Elimination
- ADN : Acide désoxyribonucléique
- AMM : Autorisation de mise sur le marché
- AMP : Adénosine monophosphate
- ARN(m) : Acide ribonucléique (messager)
- ATM : Ataxia telangiectasia mutated
- ATR : ATM- and Rad3-related
- BAC : Bacterial artificial chromosome
- BAF : Barrier to autointegration factor
- CAMTA1 : Calmodulin binding transcription activator 1
- Cdk-2 : Cycline-dependent kinase
- CMT : Craboxyméthyl transférase
- CNV : Copies number variation
- CREB : C-AMP response element-binding protein
- DCM : Cardiomyopathies dilatées
- DM1 : Dystrophie myotonique de type 1
- DNAPKcs : DNA-dependant protein kinase catalytic subunit
- EB : Embryoïde body
- EBNA : Espstein-Barr nuclear antigen
- ECG : Electrocardiographie
- EDMD : Dystrophie musculaire d'Emery-Dreifuss
- Erk : Extracellular signal-regulated kinase
- ESCs : Cellules souches embryonnaires
- FDA : Food and drug administration
- FTI : Farnesyltransferase inhibitor
- FPLD : lipodystrophie partielle familiale de type Dunnigan
- GFP : Green fluorescent protein
- GH : Growth hormone
- GMP : Good manufacturing practices
- H3Kxme3 : Histone 3 triméthylée sur la lysine x
- HCS : High content screening
- HDAdV : Helper-dependent adenoviral vector

HDL : High density lipoprotein
HGPS : Hutchinson Gilford progeria syndrome
HIF : Hypoxia inducible factors
HMG-CoA : Hydroxymethylglutaryl Coenzyme A
hnRNP : Heterogenous ribonucleoprotein
HOS : Holt-Oram syndrome
HTS : High throughput screening
ICMT : Isoprenylcystein carboxymethyl transferase
Ig : Immunoglobuline
IGF-1 : Insuline like growth factor
iPSC : Induced pluripotent stem cell
JNK : c-Jun Nterminal kinase
KLF4 : Krüppel-like transcription factor 4
K.O. : Knock Out
LAD : Lamin associated domain
LDL : Low density lipoprotein
LGMD1B : Dystrophie musculaire des ceintures de type 1B
LMN : Lamine
MAD : Dysplasie acromandibulaire
MAP : Mono-aminopyrimidine
MEF : Mouse embryonic fibroblast
miR : Micro ARN
MAP : Mono-aminopyrimidine
MAPK : Mitogen-actived protein kinase
MEF : Mouse embryonic fibroblast
miR : MicroARN
MSC :Mesenchymal stem cell
MOI : Multiplicity of infection
MOK : MAP/MAK/MRK overlapping kinase
mTOR :Mammalian target of rapamycin
NK: Natural killer
NLS : Nuclear localization signal
NSC : Neural stem cell
OCT4 : Octamer-binding transcription factor 4
OMIM : Online mendelian inheritance in man

PK : Protein kinase
PPAR : Peroxisome proliferator-activated receptor
PRF : Progeria research foundation
Rb : Rétinoblastome
rh : recombinant humaine
ROS : Reactive oxygene species
SAR : Structure activity relationship
siRNA : Small interfering ribonucleic acid
SKP : Skin derived precursor
SL : Stem loop
SOD : Superoxyde dismutase
SOX2 : SRY-box containing gene 2
SRSF : Serine arginine splicing factor
SS : Splice site
SSEA-3/4 : Stage specific embryonic antigen 3/4
SREBP : Sterol regulatory element-binding protein
SRSF : Serine-arginine splicing factor
TBP : TATA binding protein
TBX5 : T-box transcription factor 5
Terc : télomérase RNA component
Tert : télomérase réverse transcriptase
TGF : Transforming growth factor
TP53BP1 : Tumor protein p53-binding protein 1
Tra-1-60/81 : Tumor rejection antigen 60/81
UTR : Untranslated region
VSMC : Vascular smooth muscle cell
WS : Werner syndrome
Zmpste24 : Zinc métallopeptidase protéine homologue à STE24
ZoPra : Zoledronate pravastatine

Index des figures

- Figure 1 :** Localisation de la lamina nucléaire
- Figure 2 :** Assemblage des lamines
- Figure 3 :** Structure du gène *LMNA* et localisation des mutations à l'origine des laminopathies
- Figure 4 :** Mutations associées aux laminopathies systémiques
- Figure 5 :** Répartition des cas de progéria diagnostiqués en 2013
- Figure 6 :** Représentation schématique de la mutation à l'origine de la progéria et de sa conséquence au niveau de l'épissage du gène LMNA
- Figure 7 :** Défaut de maturation de la prélamine A dans la progéria.
- Figure 8 :** Principaux défauts cellulaires et moléculaires caractéristiques de la progéria
- Figure 9 :** Déformation de l'enveloppe nucléaire d'un fibroblaste de patient progéria
- Figure 10 :** Principaux signes cliniques caractéristiques de la progéria
- Figure 11 :** Voie de synthèse du cholestérol ciblée dans les stratégies thérapeutiques anti-progéria
- Figure 12 :** Effet des inhibiteurs de la farnésyltransférase *in vitro* et *in vivo*
- Figure 13 :** Formule chimique du lonafarnib
- Figure 14 :** Le lonafarnib permet une amélioration de certains symptômes chez les patients atteints de progéria typique
- Figure 15 :** Formule chimique de la pravastatine et du zolédonate
- Figure 16 :** Effet du ZoPra sur les phénotypes pathologiques de la progéria
- Figure 17 :** Représentation schématique de la stratégie de modulation de l'épissage alternatif du gène *LMNA*, basée sur l'utilisation d'oligonucléotides morpholinos
- Figure 18 :** Mécanisme d'action de la rapamycine sur la progérine
- Figure 19 :** Effet de la rapamycine sur la production de progérine
- Figure 20 :** Mécanisme d'action du resvératrol dans les cellules Zmpste24-/-

- Figure 21 :** Mécanisme d'action des ICMT
- Figure 22 :** Caractéristiques des cellules souches
- Figure 23 :** Génération et potentiel de différenciation de lignée de cellules souches embryonnaires humaines
- Figure 24 :** Principe de la génération d'iPSCs : de l'étude princeps chez la souris à l'essai sur des cellules humaines
- Figure 25 :** Induction d'iPSCs à partir de fibroblastes dermiques adultes
- Figure 26 :** Processus de dérivation d'une lignée iPSC
- Figure 27 :** Stratégies de reprogrammation de cellules somatiques en iPSCs
- Figure 28 :** Evolution des techniques de culture des iPSCs
- Figure 29:** Anomalies fonctionnelles des MSCs dérivées d'iPSCs progéria
- Figure 30 :** Caractérisation des défauts des cellules musculaires lisses (SMCs) dérivées d'iPSCs progéria
- Figure 31 :** Représentation schématique de l'approche de correction génique utilisée avec les iPSCs porteuses d'une laminopathie
- Figure 32 :** Répression de la transcription de régulateurs adipogéniques par la progérine
- Figure 33 :** Processus de la découverte d'un médicament en partant d'un criblage de molécules chimiques
- Figure 34 :** Utilisation des iPSCs pour la recherche de médicaments
- Figure 35 :** Objectifs de la thèse
- Figure 36 :** Formules chimiques des MAPs isolées du criblage
- Figure 37 :** Effet de la metformine sur l'expression

Indexe des tableaux

Tableau 1 : Liste des laminopathies

Tableau 2 : Modèles d'étude *in vivo* de la progéria

Tableau 3 : Action principale des nouvelles pistes thérapeutiques contre la progéria

Tableau 4 : Liste des petites molécules utilisées pour améliorer la reprogrammation des cellules somatiques humaines

Tableau 5 : Liste des types cellulaires humains reprogrammés efficacement en iPSCs

Résumé

La progéria est une maladie génétique rare caractérisée par un vieillissement global, prématué et accéléré entraînant le décès des enfants atteints aux alentours de l'âge de 13 ans. La compréhension des mécanismes moléculaires à l'origine de ce syndrome ont récemment permis de démarrer deux protocoles d'essai clinique, avec un objectif commun : ralentir la progression de la maladie en bloquant la maturation de la protéine mutée. Cependant, l'identification de nouvelles voies thérapeutiques reste encore, pour cette pathologie, un défi à relever. L'objectif de ce travail de thèse a consisté à utiliser le potentiel unique des cellules souches induites à la pluripotence (iPSCs) pour explorer les mécanismes cellulaires et moléculaires de ce syndrome, identifier de nouvelles cibles thérapeutiques et proposer des pistes innovantes de traitement.

La première étape de cette thèse s'est consacrée à la dérivation et la caractérisation des lignées d'iPSCs à partir de cellules de patients atteints par ce syndrome. De manière surprenante, cette étude a mis en évidence une préservation des neurones générés à partir d'iPSCs de patients progeria. L'étude des mécanismes moléculaires à l'origine de cette protection neuronale a par la suite permis d'identifier l'implication d'un microARN, miR-9, capable de réguler l'expression de la progérine et de protéger les neurones de ce vieillissement accéléré.

La seconde partie de ces travaux de thèse s'est attachée à explorer le potentiel de ces cellules pour étudier l'efficacité des composés proposés aux patients dans le cadre des différents essais cliniques réalisés ces dernières années. Bien que l'ensemble des molécules testées améliore de façon significative les défauts de structuration de l'enveloppe nucléaire, nos travaux soulignent un certain nombre de différences fonctionnelles tant au niveau de leurs effets sur la prolifération cellulaire que sur la différentiation ostéogénique ou encore le métabolisme énergétique.

Enfin, sur la base de ce travail de modélisation pathologique, la dernière partie de ce projet de thèse a eu pour objectif de développer et réaliser un criblage à haut contenu de plus de vingt mille petites molécules pouvant réguler le processus de maturation de la prélamine A. Au cours de cette étude, onze composés à fort potentiel thérapeutique ont été identifiés, dont trois appartenant à la même famille chimique, les mono-aminopyrimidines, ouvrant de nouvelles perspectives thérapeutiques dans la progéria.

Mots clés : cellules souches induites à la pluripotence, progéria, syndrome de Hutchinson-Gildord, criblage à haut débit, modélisation pathologique, miR-9, metformine.

Introduction

I. Les laminopathies

Une maladie est considérée comme orpheline lorsqu'elle atteint moins d'une personne sur deux mille, en Europe. A ce jour, il existe près de huit mille maladies rares ou orphelines différentes. En dépit du faible nombre de personnes touchées par chaque pathologie, la fondation pour les maladies rares estime entre vingt-sept et trente six millions le nombre d'europeens affectés. La recherche d'un traitement pour certaine de ces pathologies a un intérêt au-delà de la maladie en question, mais leurs applications peuvent être étendues à des maladies plus communes, ouvrant des perspectives thérapeutiques à une population beaucoup plus large. Dans le cadre de ce projet de thèse, nous nous sommes intéressés à une de ces maladies rares, la progéria pour laquelle la lamine A est défaillante. Plus qu'une simple protéine de structure, la lamine A, lorsqu'elle fait défaut, est à l'origine de nombreuses pathologies regroupées sous le générique de laminopathies. De par sa structure complexe et ses multiples interactions, la perturbation de son expression a des conséquences délétères sans précédent, directement visibles chez les patients atteints par la progéria. Dans ce chapitre, l'implication de la lamine A dans la physiopathologie des laminopathies et plus particulièrement de la progéria ainsi que les répercussions liées à sa mutation seront décrites.

I.1 Les lamines : du gène à la fonction

I.1.1 Les lamines dans la matrice nucléaire

Dans la cellule, la séparation du matériel génétique et du cytoplasme qui l'entoure est la caractéristique principale qui distingue les eucaryotes des procaryotes. L'apparition de l'enveloppe nucléaire dans tous les types cellulaires, à l'exception des érythrocytes et des thrombocytes, témoigne de l'évolution biologique. La partie principale de l'enveloppe nucléaire est constituée d'une bicouche lipidique constituant une barrière hermétique au passage des ions, des molécules hydrophiles et des macromolécules. Le feuillet externe de la membrane est en continuité avec le réticulum endoplasmique rugueux et comporte des ribosomes contrairement au feuillet interne qui en est dépourvu. Ponctuellement, les deux bicouches lipidiques fusionnent pour donner naissance aux pores nucléaires. Une cellule de mammifère possède approximativement 3000 pores nucléaires enchâssés dans sa membrane. Formés d'un ensemble complexe de protéines, ces tunnels biologiques régulent le trafic

d'acides nucléiques et des protéines de plus de 40-60 kDa entre les compartiments cytoplasmiques et nucléaires (Aaronson and Blobel, 1975); (Raices and D'Angelo, 2012).

Sur la face interne de la membrane nucléaire sont ancrées des protéines transmembranaires liées, dans le noyau à un réseau protéique filamentous appelé lamina nucléaire. Observées pour la première fois en 1966 (Fawcett, 1966), cette structure nucléaire élastique apporte une résistance au stress mécanique du noyau mais essentiellement un maintien de sa forme et de sa taille. Durant plusieurs années, la composition de la lamina est restée inexpliquée. C'est en 1978 que l'équipe de Larry Gerace révèle la présence de lamines dans la lamina nucléaire (Gerace et al., 1978) avant de démontrer quelles en étaient le composant majeur (Aebi et al., 1986).

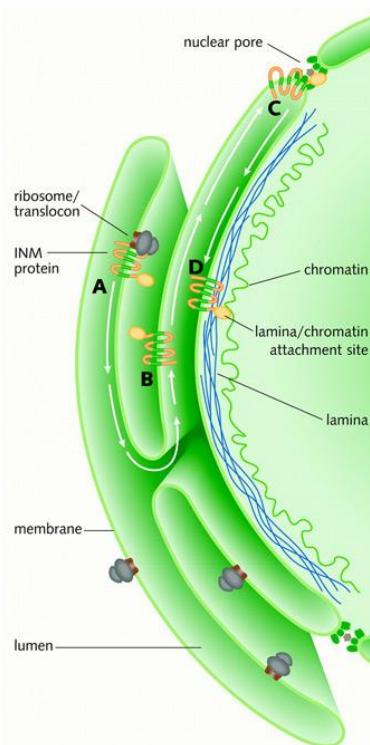


Figure 1 : Localisation de la lamina nucléaire

L'enveloppe nucléaire est constituée d'une bicoche lipidique en continuité avec le réticulum endoplasmique granuleux. Sur sa face interne, cette double membrane est tapissée par un réseau de lamines, associées à la chromatine, aux pores nucléaires ainsi qu'à des protéines transmembranaires. Schéma tiré du site internet : les cahiers de ChrisToBiLi <http://christobili.blogspot.fr/2007/12/ignralits-sur-le-noyau.html>

La lamina nucléaire fait partie intégrante de la matrice nucléaire (Figure 1), notion décrite tout d'abord par Zbarskii et al. (Zbarskii and Perevoshchikova, 1951), puis nommée comme tel en 1974 (Berezney and Coffey, 1974). Cependant, en fonction de la technique d'extraction utilisée pour l'isoler elle est aussi couramment appelée nucléosquelette ou encore échafaudage

nucléaire (Jackson and Cook, 1988). C'est une organisation filamenteuse complexe retrouvée dans le nucléoplasme constituée majoritairement de protéines de hnRNPs, de protéines dites structurales, de protéines liées au métabolisme de l'ADN ou encore de lamines liées à des fragments d'ADN et d'ARN (Mika and Rost, 2005). Outre ses fonctions structurales et organisationnelles du noyau, différentes études ont démontré que la matrice nucléaire jouait un rôle majeur dans les phénomènes de réparation de l'ADN (Balajee et al., 1998) ; (Okorokov et al., 2002), dans la réPLICATION (Collins and Chu, 1987), ainsi que la transcription et les phénomènes d'épissage (Vincent et al., 1996).

I.1.2 Les lamines de type A et B

I.1.2.1 Du gène à la protéine

Les lamines appartiennent à la famille des filaments intermédiaires et plus spécifiquement aux filaments intermédiaires nucléaires de type V (Fisher et al., 1986) (McKeon et al., 1986). Des analyses génétiques ont révélé que les lamines étaient étroitement conservées chez les métazoaires mais n'étaient pas présents chez les plantes ou les organismes unicellulaires (Dittmer and Misteli, 2011). Chez les vertébrés, quatre types de lamines différentes ont été recensées: les lamines A, B1, B2 et C. Ces isoformes sont classifiées en deux catégories : les lamines de type A qui sont acides et solubles dans le cytosol pendant la mitose et les lamines de type B qui sont isoélectriquement neutres et qui restent associées à la membrane nucléaire pendant la mitose (Krohne and Benavente, 1986). Les lamines A et C ainsi que deux autres variants la lamine A Δ 10 et la lamine C2 sont classés dans la famille des lamines de type A. Ces cinq lamines sont codées par le même gène *LMNA* situé en position 1q22 grâce à un épissage alternatif. Les lamines de type B, quant à elles, sont constituées des lamines B1, B2 et B3. Alors que le gène *LMNB1* code pour la lamine B1 uniquement, le gène *LMNB2* code à la fois pour les lamines B2 et B3. Cette dernière ne se distingue de la lamine B2 que par une extrémité N-terminale plus courte. Les gènes *LMNB1* et *LMNB2* sont situés sur deux chromosomes différents respectivement en position 5q23.2 et 19p13.3.

I.1.2.2 Structures des lamines

Les lamines partagent une homologie structurale, caractéristiques des filaments intermédiaires cytoplasmiques. Elles sont structurées en trois parties : une longue hélice α appelée « domaine rod », entourée de deux domaines globulaires situés en N- et C-terminale. Ce domaine hélicoïdal représente à lui seul près de la moitié de la protéine avec ses 350 acides aminés. Il est composé de quatre hélices α appelées 1A, 1B, 2A et 2B reliées les unes aux autres par des sous domaines notés L1, L12 et L2 (North et al., 1994).

Le domaine N-terminale des lamines est de taille variable oscillant de 40 à 100 acides aminés. Le domaine C-terminale contient un domaine de grande homologie avec immunoglobulines (Ig), une séquence de localisation nucléaire NLS leur permettant d'être adressées au noyau, ainsi qu'un motif de farnésylation CaaX (C pour cystéine, a pour acide aminé aliphatique et X pour n'importe quel acide aminé), absent de la lamine C (Dhe-Paganon et al., 2002). Dans les lamines A et C, la structure des domaines Ig est caractéristique et forme un sandwich β compact composé de 2 feuillets β formés par neuf brins β connectés par de courtes boucles (Krimm et al., 2002). Ce domaine de grande homologie avec les immunoglobulines est commun à de nombreuses protéines et intervient dans des interactions protéine-protéine ou protéine-ligand (Dhe-Paganon et al., 2002).

Bien qu'il ait été suggéré que la formation du réseau de lamines se fasse de manière autonome (Volkova et al., 2011), peu de choses sont connues de leur structuration au sein du noyau. Les lamines de types A et B sont des protéines qui se dimérisent grâce à leur domaine hélicoïdal. Alors que certaines zones sont hydrophobes (séquences a et d) d'autres contiennent des résidus chargés (séquences e et g) favorisant les interactions inter-lamines. Ces dimères de lamines ainsi formés s'assemblent les uns aux autres tête-bêche et de manière parallèle, formant des homodimères (Ben-Harush et al., 2009). Les homodimères de type A s'associent ensuite à des homodimères de type B pour former des hétéropolymères (Delbarre et al., 2006) tapissant ainsi la face interne de l'enveloppe nucléaire (Figure 2).

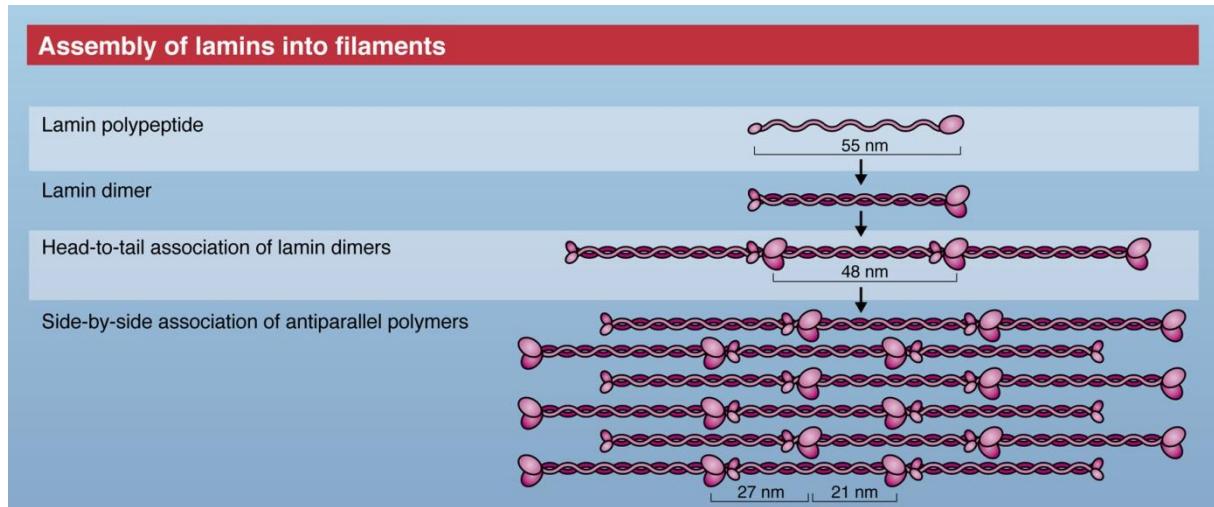


Figure 2 : Assemblage des lamines

Les lamines s'assemblent tout d'abord en dimère de lamines linéaires. Chaque dimère s'assemble avec un autre dimère créant une chaîne de lamine où le domaine N-terminale interagit avec le domaine C-terminale. Enfin, les filaments de lamines ainsi formés se structurent en polymères antiparallèles (Ho and Lammerding, 2012).

I.1.2.3 Spécificités d'expression des lamines

A l'exception des lamines B3, AΔ10 et C2, les lamines sont des protéines réputées être ubiquitaires (Benavente et al., 1985; Lehner et al., 1987). Ainsi la lamine B3 n'est exprimée uniquement dans les cellules germinales post-méiotiques masculines (Furukawa and Hotta, 1993), alors que la lamine AΔ10 n'a été exprimée que dans certaines lignées cancéreuses (Machiels et al., 1996) et que la lamine C2, isolée de la souris et du rat, est observée spécifiquement dans les spermatozoïdes (Furukawa and Hotta, 1993). Les lamines de types A sont, quant à elles, absentes des phases précoces du développement. Des études réalisées chez la souris ont ainsi démontré qu'elles commençaient à s'exprimer à partir du 8^{ème} jour de développement embryonnaire (Stewart and Burke, 1987), les rendant non indispensables dans les phases post-natales précoces. De la même manière, la lamine A n'est pas retrouvée dans les phases précoces de l'embryogénèse chez le poulet (Lehner et al., 1987). En 2006, Constantinescu et al. ont confirmé cette observation chez l'humain en démontrant que les cellules souches embryonnaires humaines n'exprimaient pas le transcript *LMNA* à l'état indifférencié (Constantinescu et al., 2006). Indépendamment de ces observations, une étude réalisée sur la différenciation neuronale de cellules NT2 a révélé que les cellules indifférenciées exprimaient la lamine B1 ainsi que les lamines A/C alors que dans les neurones terminaux, les lamines A/C étaient totalement absentes (Pierce et al., 1999).

I.1.2.4 Structure et fonction des lamines de type A

I.1.2.4.1 Structure du gène et de la protéine

En 1986, le clonage de l'ADN complémentaire du gène *LMNA* a révélé que ces les lamines A et C étaient codées par le même gène et qu'elles partageaient une homologie de séquence de près de 350 acides aminés (Fisher et al., 1986); (McKeon et al., 1986). Le gène *LMNA* comporte 12 exons séparés pas 11 introns. L'exon 1 spécifie les acides aminés 1 à 119 formant le domaine N-terminal ainsi qu'une partie hélicoïdale tandis que les exons 7 à 12 codent pour le second domaine globulaire.

Un site donneur d'épissage situé à l'extrémité de l'exon 10 (Lin and Worman, 1993) conduit à la production de deux isoformes : la lamine A et la lamine C. D'une part les exons 1 à 10 conduisent à la production de la lamine C, constituée de 574 acides aminés. D'autre part, les exons 1 à 12 mènent à la synthèse de la prélamine A forme, immature de la lamine A, comptabilisant 664 acides aminés (Bertrand et al., 2011). En 2012, l'équipe de Jamal Tazi a mis en évidence l'implication des deux facteurs d'épissage dans la régulation du site d'épissage de la lamine A SRSF1 (Serine arginine Splicing Factor) et SRSF6 (Lopez-Mejia et al., 2011). La différence majeure entre ces deux formes est la présence d'un motif CaaX en position C-terminale présente au niveau de la lamine A mais absente de la lamine C. Cette séquence est indispensable à la maturation post-traductionnelle de la lamine A.

Ainsi, après sa transcription, la lamine A est traduite sous forme de précurseur, la prélamine A et subit quatre modifications post-traductionnelles séquentielles sur la partie C-terminale et plus spécifiquement sur le motif CaaX. La première étape de ce processus consiste en l'isoprénylation de la lamine A par l'ajout d'un groupement farnésyl sur la cystéine du résidu CaaX, étape catalysée par la farnésyl-transférase (Lutz et al., 1992). Ce motif de prénylation permet à la prélamine A de s'ancrer au feuillet externe de la membrane du réticulum endoplasmique, lieu où elle peut subir les trois autres étapes menant à sa maturation terminale (Beck et al., 1990). L'étape suivante de cette maturation consiste au clivage des trois derniers acides aminés aaX du précurseur grâce à l'enzyme FACE1 (FArnésylated-proteins Converting Enzyme 1) également appelée ZMPSTE24 (Zinc Metallopeptidase Protéine homologue à STE24) (Bergo et al., 2002; Freije et al., 1999). Grâce à ses sept domaines transmembranaires, cette enzyme est située dans la membrane du réticulum endoplasmique avec son site actif orienté du côté cytosolique. La troisième étape de maturation est une méthylation de la cystéine par l'ICMT (Isoprenylcystein CarboxylMethylTransferase) (Bergo

et al., 2002). De par la nature de l'enzyme, la fixation du groupement méthyle est conditionnée par la présence du groupement farnésyl sur la cystéine. Enfin, la dernière étape de ce processus est le clivage des 15 acides aminés C-terminaux par l'enzyme FACE1, libérant la lamine A du réticulum endoplasmique et donnant naissance à la lamine A mature (Corrigan et al., 2005). La lamine A ainsi produite peut, grâce à son domaine NLS, pénétrer dans le noyau pour former la lamina nucléaire.

I.1.2.4.2 Fonctions de la lamine A

Les éléments de la littérature sont variés pour expliquer l'implication des lamines dans le contrôle de nombreux processus biologiques tels que la prolifération cellulaire, la sénescence réplicative, le développement ou le fonctionnement de certains organes (Butin-Israeli et al., 2012). En effet, de par son organisation et ses nombreuses interactions, la lamina nucléaire participe à la stabilité mécanique du noyau et ainsi au contrôle de la différenciation et la migration des cellules mais également à la réponse aux dommages à l'ADN ainsi qu'à la transcription génique.

I.1.2.4.2.1 Structure du noyau interphasique

L'élaboration complexe de la structure de la lamina nucléaire confère à l'enveloppe nucléaire une résistance physique particulière, supérieure à celle de la membrane plasmique. Ce réseau de lamine, grâce aux domaines rod interconnectés, donne au noyau une élasticité qui lui permet d'absorber les chocs mécaniques (Dahl et al., 2004). Les lamines de type A jouent un rôle majeur dans cette résistance puisqu'une altération de ces protéines impact directement sur les noyaux. En effet, des souris déficientes en *Lmna* (KO *Lmna*) présentent une résistance réduite au stress mécanique (Lammerding et al., 2004). Ces capacités structurales de la lamina nucléaire sont, par ailleurs, permises par les multiples interactions des lamines avec des protéines nucléaires (Lammerding et al., 2005). C'est le cas par exemple de l'émerine, protéine ancrée dans le feuillet interne de l'enveloppe nucléaire connue pour interagir avec les lamines de type A (Clements et al., 2000), dont la délétion chez les souris entraîne une diminution de la résistante aux stimuli mécaniques (Lammerding et al., 2005).

Les lamines de type A ne sont pas uniquement présentes dans la lamina nucléaire. Elles s'organisent également dans le nucléoplasme sous forme de foci dont le nombre varie de 0 à 10 par noyau, ou sous forme soluble dans le nucléoplasme (Broers et al., 2006; Echevarria et al., 2003). Ces foci correspondent à une double invagination de l'enveloppe nucléaire dans le nucléoplasme ou à une invagination du feuillet interne uniquement (Echevarria et al., 2003).

Au sein de ces structures, les lamines créent des interactions avec d'autres protéines (Fricker et al., 1997) et peuvent être le point d'ancrage des lamines pour des facteurs de réPLICATION (Kennedy et al., 2000; Spann et al., 1997) ou des facteurs d'épissage (Jagatheesan et al., 1999). Ces observations laissent supposer d'autres rôles des lamines qui viendraient s'additionner à leur rôle structural évident.

I.1.2.4.2.2 Cycle cellulaire

Au cours de la mitose, l'enveloppe nucléaire est désassemblée, libérant le matériel génétique dans le cytoplasme des cellules. Deux phénomènes entrent en jeu dans cette désorganisation de l'enveloppe nucléaire : la dépolymérisation de la lamina nucléaire et les forces exercées sur le noyau par les microtubules (Beaudouin et al., 2002; Georgatos et al., 1997). Les lamines de type A dépolymérisées se dispersent dans le compartiment cytoplasmique de la métaphase à l'anaphase. La dépolymérisation résulte d'une série de phosphorylation des lamines impliquant la kinase cdc2 (Peter et al., 1991). Au stade de la télophase, la lamina se réassemble pour former deux noyaux au sein de la même cellule.

Par ailleurs, la protéine Rb (RétinoBlastoma) est un suppresseur de tumeur agissant comme un régulateur du cycle cellulaire. Cette protéine, sous sa forme hypophosphorylée, est liée à la matrice nucléaire pendant la phase G1 du cycle cellulaire (Mancini et al., 1994; Marji et al., 2010). Plus spécifiquement, la liaison à la matrice se fait à la périphérie nucléaire avec les lamines A et C. De la même manière, E2F1 colocalise avec le complexe lamine A/C-Rb dans le noyau interphasique en phase G1 (Kennedy et al., 2000). Ces résultats suggèrent que les interactions entre les protéines Rb et E2F avec les lamines aient un rôle dans la progression du cycle cellulaire (Mancini et al., 1994).

I.1.2.4.2.3 Réparation de l'ADN

L'inactivation du gène *LMNA* dans des fibroblastes embryonnaires de souris ainsi que dans des fibroblastes adultes a montré que la lamine A jouait un rôle dans le maintien de l'intégrité des télomères et dans la réponse aux cassures de l'ADN (Gonzalez-Suarez et al., 2009). En outre, les mutations dans le gène *LMNA*, notamment dans la progéria, entraînent une augmentation des cassures de l'ADN associé à un défaut d'assemblage du complexe de réparation (Scaffidi and Misteli, 2006); (Manju et al., 2006). Plus récemment, une étude menée sur des cellules de mammifère s'est intéressée aux interactions biochimiques et dynamiques des lamines A et C après dommage à l'ADN (Mahen et al., 2013). Les résultats qui en découlent révèlent d'une part que la mobilité de la lamine A est réduite lors de cassures

de l'ADN et d'autre part que l'histone H2AX ainsi que sa forme phosphorylée γ H2AX, recrutée sur les sites de cassures, se lient à la lamine A. Également, lorsque la lamine A est inactivée, la stabilité du complexe de réparation de l'ADN est diminuée, indiquant que la lamine A participe au système de réparation des cassures de l'ADN (Mahen et al., 2013). L'ensemble de ces observations démontrent que la lamine A est impliquée dans la réparation de l'ADN ainsi que dans le maintien de l'intégrité des télomères.

1.1.2.4.2.4 Signalisation cellulaire

Les lamines de types A et les protéines auxquelles elles sont associées sont engagées dans une grande variété d'interactions moléculaires qui affectent la transduction de voie de signalisation. Elles sont spécifiquement impliquées dans les voies MAPK, Wnt- β -catenin, TGF- β et Notch (Andres and Gonzalez, 2009). Le premier exemple de ce rôle de la lamine A dans les cascades de signalisation est la perturbation de la voie des MAPK, de par une activation exacerbée de ERK et JNK, dans les cardiomyopathies dilatées et la dystrophie musculaire d'Emery Dreifuss (Muchir et al., 2007). Des preuves directes impliquent la lamine A dans cette voie de signalisation montrant une liaison de ERK1 et 2 aux lamines situées en périphérie de l'enveloppe nucléaire (Gonzalez et al., 2008). Ces affections de la lamine A entraînent, par l'activation constitutive de la voie des MAPK, une hyperprolifération, une augmentation de la migration ainsi qu'une polarisation de la cellule.

La protéine kinase C α (PKC α) est une sérine thréonine kinase qui peut être activée par le second messager lipidique DAG (DiAcylGlycérol) et l'acide 12(S)-hydroxyeicosatetraenoïque afin de moduler la survie, la prolifération, la migration et l'apoptose. En 2002, Martelli et al. ont ainsi démontré que cette protéine pouvait se lier à la partie C-terminale des lamines A/C, mettant en avant l'intérêt d'inhiber cette interaction dans des indications anti-cancéreuses (Martelli et al., 2002).

1.1.2.4.2.5 Implication de la lamine A dans les phénomènes de transcription

Il existe plusieurs arguments dans la littérature qui justifient le rôle prépondérant de la lamine A dans la régulation du processus de transcription (Andres and Gonzalez, 2009; Prokocimer et al., 2013). Le processus de régulation de l'expression génique fait intervenir l'organisation chromatinienne avec les différentes interactions entre la lamina nucléaire et la chromatine, les microRNAs, la séquestration de facteurs de transcription ainsi que les interactions avec la polymérase de type II (Prokocimer et al., 2013). De manière générale, la lamine A peut se lier

directement ou indirectement à la chromatine *via* des protéines telles que LAP α (Lamin-Associated-Protein 2B), BAF (Barrier to Autointegration Factor), l'émerine, aux histones, aux facteurs de transcription (SREBP-1, MOK2) (Vlcek and Foisner, 2007). La lamine A se lie à la chromatine grâce à des domaines d'association aux lamines LADs (Lamin-Associated-Domains). Ces domaines sont considérés comme étant des répresseurs de la transcription (Puckelwartz et al., 2011). D'autre part, en 2010, Dan Simon et al. ont démontré que les filaments d'actine possédaient deux sites de liaison sur la partie C-terminale des lamines de type A et B. Ils ont souligné que la liaison était nettement moins efficace avec la prélamine A. Sachant que l'actine participe à la transcription, à l'export nucléaire, au remodelage chromatinien, aux mouvements de la chromatine ou encore à l'assemblage nucléaire, cette interaction suggère que la lamine A soit impliquée dans la régulation de la transcription affectant la polymérisation de l'actine (Simon and Wilson, 2011; Simon et al., 2010).

Par ailleurs, en 2002, Goldman et al. ont démontré que la surexpression d'un mutant dominant négatif de la lamine A, qui ne possédait pas de domaine N-terminale dans des cellules de mammifères et des cellules embryonnaires de xénope, entraînait la désorganisation de la lamina nucléaire et l'inhibition de l'ARN polymérase de type II, mais pas des ARN polymérasées de type I et III. Les auteurs suggèrent que les lamines ne se lient aux TBP (TATA Binding Protein) qu'indirectement *via* d'autres facteurs spécifiques de l'ARN polymérase de type II tels que les composants du facteur de transcription basal TFIID (Spann et al., 2002).

De surcroit, différentes études ont montré que l'expression de formes mutantes de la lamine A affectait la localisation de facteurs de transcription. C'est le cas par exemple de SREBP1 (Sterol Regulatory Element-Binding Protein 1), un facteur de transcription qui régule l'expression de gènes impliqués dans la biosynthèse du cholestérol et dans la différenciation adipogénique (Raghow et al., 2008). Ce facteur de transcription est retenu dans l'enveloppe nucléaire de fibroblastes de patients atteints par un syndrome de Werner, une dysplasie acromandibulaire ou une lipodystrophie partielle familiale de type Dunnigan (Capanni et al., 2005; Lloyd et al., 2002).

Ces exemples des fonctions des lamines, bien que non exhaustifs, illustrent leur implication dans un grand nombre de processus physiologiques indispensables à l'homéostasie cellulaire. Ainsi, si l'une des lamines est anormalement synthétisée, comme c'est le cas dans les laminopathies, les répercussions cliniques sont majeures.

I.2 Physiopathologie clinique des laminopathies

I.2.1 Corrélation génotype/phénotype au sein des laminopathies

Les laminopathies regroupent l'ensemble des maladies génétiques associées à des mutations du gène *LMNA*. Regroupant 2251 sujets diagnostiqués dont des porteurs asymptomatiques (www.umd.be/LMNA), ces pathologies illustrent, de façon exemplaire, la complexité des relations génotypes-phénotype qui caractérisent certaines maladies génétiques (Schreiber and Kennedy, 2013). En effet, la spécificité tissulaire des atteintes cliniques contrastent avec le type d'expression quasi ubiquitaire des lamine A/C. Alors que certaines laminopathies affectent les tissus de manière ciblée comme c'est le cas des muscles striés, du tissu adipeux ou encore des nerfs périphériques, d'autres touchent l'organisme de manière systémique générant un vieillissement accéléré des patients. En outre, cette hétérogénéité phénotypique est associée à une multitude de mutations de ce même gène au nombre de 464 réparties le long du gène (www.umd.be/LMNA) qui peuvent être hiérarchisées en une douzaine de maladies (Tableau 1). Ainsi, ces laminopathies sont habituellement classifiées en sous type de laminopathies en fonction du tissu spécifiquement affecté : les laminopathies du muscle strié, les laminopathies du tissu adipeux, les laminopathies du nerf périphérique et les laminopathies systémiques (Bertrand et al., 2011).

Maladie	Références OMIM	Localisation des mutations
Dystrophie musculaire d'Emery-Dreifuss	181350	Dispersées le long du gène
Dystrophie musculaire des ceintures de type IB	159001	Domaine Rod et queue
Cardiomyopathies dilatées	115200	Dispersé le long du gène
Dystrophie musculaire congénitale	613205	Dispersées le long du gène
Syndrome cœur main	142900	Queue (domaine Ig)
Lipodystrophie partielle familiale de Dunnigan	151660	Queue (domaine Ig)
Dysplasie acromandibulaire	24.8370	Queue (domaine Ig)
Neuropathie axonale de Charcot-Marie-Tooth	605588	Domaine Rod
Syndrome atypique de Werner	277700	Domaine Rod et queue
Dermopathie restrictive	275210	Queue
Syndrome de Hutchinson Gilford	176670	En C-terminale

Tableau 1 : Liste des laminopathies

Chaque maladie est associée à une mutation localisée, la plupart du temps, dans un domaine spécifique du gène *LMNA*. Elle est alors référencée dans une base de donnée internationale qui répertorie les phénotypes génétiques ainsi que les gènes humains (Online Mendelian Inheritance in Man : OMIM).

La relation génotype-phénotype a souvent été investiguée de manière à prédire l'atteinte tissulaire et l'âge du début de la maladie en fonction de la localisation de la mutation (Bertrand et al., 2011; Cattin et al., 2013). Ainsi en 2005, Hegele et al. ont analysé 91 cas de mutations *LMNA* en fonction de leur localisation en amont ou en aval du signal NLS (Hegele, 2005). Cette étude a révélé que les mutations qui affectaient la séquence avant le signal de localisation nucléaire NLS causaient principalement des atteintes du muscle squelettique, alors que les mutations situées après ce signal causaient essentiellement des lipodystrophies et des syndromes de vieillissement systémique. La région en amont du site NLS est constituée du domaine « rod » essentiel à l'assemblage des lamines et à la construction du réseau de lamina nucléaire. A l'inverse, les régions situées en aval de la séquence NLS interagissent principalement avec la chromatine et les facteurs de transcription mais très peu avec les protéines de structure. Ainsi, ce travail a suggéré que les laminopathies affectant le muscle squelettique résultaient d'une altération du réseau de lamines et de ses conséquences mécaniques, tandis que les lipodystrophies et les syndromes progéroïdes associés à des laminopathies étaient principalement dus à des défauts d'interaction avec la chromatine ou de régulation de voie de signalisation cellulaire (Hegele, 2005). Cependant, cette relation génotype/phénotype n'est pas statistiquement significative, sous-entendant que les mécanismes biologiques sont plus complexes.

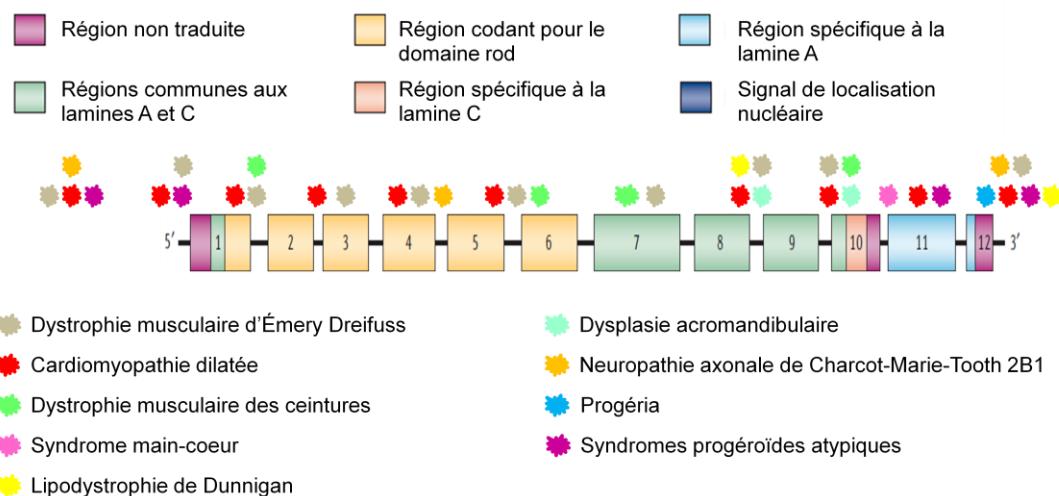


Figure 3 : Structure du gène *LMNA* et localisation des mutations à l'origine des laminopathies

Une autre étude menée sur 28 variants s'est principalement intéressée à la corrélation entre le début de la maladie et la localisation de la mutation dans le muscle strié (Benedetti et al., 2007). Ce travail a révélé que 89 % des débuts précoces de la maladie étaient observés chez

des patients porteurs d'une mutation qui conservait le cadre ouvert de lecture, compatible avec la synthèse de toute la longueur de la lamine A, telles que des mutations faux sens, ou des délétions en phase. Ces mutations ont été identifiées dans 35 % des cas au niveau du domaine Ig entre l'exon 7 et 10 ainsi que dans la boucle 2A entre l'exon 4 et 5 dans 24 % des cas. Ces mutations, de par leur localisation, sont à l'origine de problème d'interaction des lamines avec leurs partenaires, expliquant la symptomatologie précoce chez ces patients. A l'inverse, 37 % des atteintes tardives sont liées à l'apparition d'une protéine tronquée. Dans 60 % des cas, la mutation a lieu au niveau de la boucle 2B de l'exon 6 menant à une perte de fonction de la protéine et ainsi à une haploinsuffisance. Les lamines codées par l'allèle normale compensent la perte en lamines causée par l'expression de l'allèle muté, d'où le début retardé des symptômes (Benedetti et al., 2007). Ainsi, cette stratification qui différencie des phénotypes tardifs dus à une haploinsuffisance, des phénotypes précoces dus à un gain de fonction毒ique ou à un dominant négatif, facilite la prise en charge des malades. De manière globale, les études menées pour comprendre la relation génotype/phénotype montrent la complexité physiopathologique de ces mutations qui est d'autant obscurcie par la variabilité phénotypique intrafamiliale couramment observée avec ces mutations (Figure 3) (Brodsky et al., 2000).

I.2.2 Laminopathies musculaires

I.2.2.1 La dystrophie musculaire d'Emery-Dreifuss

Historiquement, la première mutation du gène *LMNA* a été décrite en 1999 par l'équipe de Gisèle Bonne (Bonne et al., 1999). L'étude a été réalisée sur une famille française de 54 individus dont 17 patients présentant un phénotype associé à la Dystrophie Musculaire d'Emery-Dreifuss (EDMD) (OMIM#181350) ainsi que sur quatre autres familles. Le locus étudié était 1q11-1q23, zone comprenant le gène *LMNA* (1q21.2-1q21.3) (Wydner et al., 1996). L'analyse de ce locus a révélé quatre mutations faux sens :

- transition C vers T dans l'exon 1 transformant la glutamine 6 en codon stop
- une autre transition C vers T dans l'exon 7 échangeant une arginine en position 453 par un tryptophane
- une transition T vers C changeant la leucine 530 par une proline

- une transversion G vers C provoquant le remplacement d'une arginine en position 527 par une proline

Bien que cette pathologie ait été décrite pour la première fois comme étant causée par des mutations du gène *STA* codant pour l'émerine (Emery, 1966), d'autres origines génétiques peuvent expliquer cette pathologie. L'EDMD est soit une maladie génétique récessive liée à l'X soit une maladie à transmission autosomique dominante affectant le gène *LMNA* (Bione et al., 1994; Bonne et al., 1999). Cliniquement, cette pathologie est caractérisée par une triade de symptômes caractéristiques qui débutent dans la petite enfance et qui évoluent relativement lentement (Emery, 2000). Des rétractions précoces au niveau des coudes, des muscles cervicaux ou encore du tendon d'Achille limitent les mouvements des membres. Les symptômes débutent par une flexion du cou limitée et s'aggravent jusqu'à paralyser les mouvements de la colonne vertébrale dans son ensemble. Le deuxième tissu affecté est le tissu musculaire squelettique. Les patients souffrent d'une faiblesse musculaire qui progressivement évolue vers une dégénérescence des muscles aussi bien au niveau proximal dans des muscles des membres supérieurs que distal au niveau des muscles des membres inférieurs. Le troisième tissu touché est le tissu cardiaque. Des troubles de la conduction cardiaque associés à une bradycardie sinusale, une tachycardie et une fibrillation ventriculaire (Dello Russo et al., 2009) ainsi qu'une hétérogénéité de la repolarisation ventriculaire avec une préservation des fonctions systoliques et diastoliques sont fréquemment décrits (Russo et al., 2012). Cette cardiomyopathie est la manifestation clinique qui apparaît la plus tardivement dans l'évolution de la maladie

D'un point de vue de la prise en charge thérapeutique, il n'existe aucun traitement curatif pour cette pathologie. L'objectif des thérapeutiques utilisées est de limiter les douleurs dues aux rétractions musculaires et à la scoliose et dans cet objectif, une canne voire un fauteuil roulants peuvent être proposés pour les déplacements (Bonne et al., 2004). Certaines douleurs dues notamment aux rétractions musculaires peuvent être apaisées par des gestes chirurgicaux dans des situations précises. La cause principale de décès chez ces patients étant l'arythmie cardiaque, le point crucial de la gestion du traitement est le diagnostic précoce (Menezes et al., 2012) ainsi que la détection en amont des troubles de la conduction cardiaque. L'insertion d'un défibrillateur implantable associée à des antiarythmiques est alors nécessaire pour normaliser le rythme cardiaque et retarder la mort des patients (Dell'Amore et al., 2007). Une transplantation cardiaque peut être envisagée en dernier recours. Pour l'heure, les espoirs sont

tournés vers le développement de thérapie génique pour apporter une solution nouvelle à ces patients.

I.2.2.2 La dystrophie musculaire des ceintures de type 1B

La dystrophie musculaire des ceintures de type 1B également appelée LGMD1B (OMIM#159001) est provoquée par une mutation dans le gène *LMNA* au niveau du locus 1q11-q21 (Muchir et al., 2000). Initialement, trois mutations ont été mises en évidence dans cette maladie. Deux de ces mutations, une délétion dans l'exon 3 (delK208) et une mutation faux sens dans l'exon 6 (R377H), sont localisées dans le domaine rod impliqué dans la dimérisation des lamines. L'hypothèse la plus probable est que la mutation empêche les lamines de s'organiser dans la lamina nucléaire. La troisième mutation identifiée dans cette étude est une transversion dans le site donneur d'épissage situé dans l'intron 9. Cette mutation a pour conséquence la rétention de l'intron 9 qui conduit à l'apparition d'un codon stop et de fait à des lamines A/ C tronquées dans leur partie C-terminale (Muchir et al., 2000). De manière générale, les mutations associées à LGMD1B provoquent une altération structurale de l'enveloppe nucléaire et du noyau dans son ensemble.

Chez les individus affectés, les signes cliniques commencent à apparaître avant l'âge de 20 ans avec une hypotonie des muscles proximaux des membres inférieurs. Contrairement à l'EDMD, il n'y a pas de rétraction au niveau de la colonne vertébrale, des coudes et du tendon d'Achille ou du moins elles sont minimes et tardives. En revanche, progressivement, les muscles des membres supérieurs sont atteints à partir de 30-40 ans. Concernant les anomalies cardiaques, elles sont observées chez 62,5 % des patients. La dystrophie musculaire des ceintures de type 1B provoque une perturbation de la conduction atrioventriculaire, une bradycardie menant à des syncopes fatales vers l'âge de 50 ans (Benedetti et al., 2007; Gruber et al., 1986; Mercuri et al., 2004; Rudnik-Schoneborn et al., 2007; van der Kooi et al., 1997)

Un cas de LGMD1B a également été associé avec une lipodystrophie caractérisée par une accumulation de graisse sous-cutanée dans le dos, les régions du visage, le cou et les extrémités, qui contrastent avec une perte adipocitaire au niveau des membres. Chez cette même patiente, des contractures au niveau des coudes, des doigts, de la colonne vertébrale et des tendons d'Achille étaient exacerbées associées aux désordres cardiaques caractéristiques de la pathologie, ainsi qu'à une insuffisance respiratoire (Mercuri et al., 2004). La description

de cette patiente témoigne de l'extrême variabilité phénotypique des patients atteints de laminopathies et de la notion de continuum (Bertrand et al., 2011).

I.2.2.3 Les cardiomyopathies dilatées

Des mutations du gène *LMNA* ont également été identifiées dans des atteintes cardiaques sans atteinte musculaire squelettique. C'est notamment le cas des cardiomyopathies dilatées également appelées DCM-CD ou CMD1A (OMIM#115200). Ces maladies sont caractérisées par une dilatation du ventricule gauche ou droit associée à une anomalie de la fonction systolique. Ces pathologies forment la famille des cardiomyopathies les plus fréquentes et représentent plus de la moitié des transplantations cardiaques réalisées chez les enfants de 1 à 10 ans (Levitas et al., 2010). Certaines cardiomyopathies dilatées (35 % des cas) sont d'origine génétique, provoquées par une grande variété de mutations hétérozygotes du gène *LMNA* (Fatkin et al., 1999; Saj et al., 2013; Taylor et al., 2003). Les cardiomyopathies dilatées représentent la cause majeure d'arrêt cardiaque soudain. Cette corrélation entre les troubles cardiaques et la mutation du gène *LMNA* apporte un argument pour dire que les lamines A/C a un impact dans la conduction et la contractilité cardiaque.

Une étude prospective a suivi 19 patients porteurs d'une mutation dans le gène *LMNA* dont 8 souffrant d'une cardiomyopathie dilatée. Ces huit patients ont reçu, pendant la période de l'étude (34 mois en moyenne), des décharges bénéfiques délivrées par un défibrillateur implantable dans le cas de fibrillation ventriculaire (Meune et al., 2006). Si ces décharges n'avaient pas été délivrées, les fibrillations auraient pu être fatales pour les patients. Afin de prévenir la mort subite due aux tachycardies ventriculaires, Meune et al, ont ainsi démontré en 2006, l'intérêt de la pose d'un défibrillateur chez ces patients à la place d'un pacemaker (Meune et al., 2006).

I.2.2.4 La dystrophie musculaire congénitale

Les formes de dystrophie musculaire congénitale (OMIM#613205) également dénommées L-CMD ont été décrites pour la première fois par deux équipes en 2004. La dystrophie musculaire congénitale liée aux lamines est due à une mutation *de novo* hétérozygote du gène *LMNA*. Cette maladie est caractérisée par une atteinte des muscles squelettiques précoce qui débute dans les premiers mois de la vie, sans atteinte cardiaque dominante. La symptomatologie d'une enfant de 21 mois, détaillée par Mercuri et al., présente un

affaiblissement des muscles axiaux et notamment ceux du cou qui empêche l'enfant de tenir sa tête (syndrome de la « tête tombante ») et de se retourner spontanément (Mercuri et al., 2004). D'autres descriptions, notamment celle de l'équipe de D'Amico et de Quijano-Roy, soulignent une faiblesse et une atrophie des muscles proximaux supérieurs et distaux des membres inférieurs conduisant à une absence totale de développement moteur. Les enfants parviennent à marcher avant la deuxième année de vie mais perdent rapidement la tonicité musculaire nécessaire et finissent par ne plus pouvoir se tenir debout. Plus tardivement vont apparaître des rétractions tendineuses, une rigidité de la colonne vertébrale associée à une lordose thoracique qui vont amplifier le handicap du patient. A cela vient s'ajouter une atteinte respiratoire qui met en jeu la survie des patients et qui nécessite une prise en charge particulière (D'Amico et al., 2005; Quijano-Roy et al., 2008). De manière intéressante, le cas d'une patiente qui présente une myopathie précoce associée à un syndrome progéroïde, soulève une nouvelle fois la question de continuum au sein des laminopathies (Kirschner et al., 2004).

I.2.2.5 Le syndrome cœur-main

Le syndrome cœur-main ou Holt-Oram Syndrome (HOS), du nom de ses deux découvreurs (OMIM#142900), est une pathologie hétérogène qui provoque à la fois des malformations des membres et une cardiomyopathie (Holt, 1960). Initialement, ce syndrome a été décrit comme la conséquence de la mutation du gène *TBX5* (Li et al., 1997) mais plus récemment, une mutation dans le gène *LMNA* a été reporté dans une famille slovénienne (Renou et al., 2008). Sept des douze membres de la famille étudiés expriment un variant du gène *LMNA* dans l'intron 9 (c.1609-12 ou IVS9-12, T vers G) à l'origine de la production d'une forme tronquée des lamines A et C. Chez les patients identifiés dans cette étude les premiers symptômes de la maladie sont apparus à l'âge adulte avec une cardiomyopathie dilatée, une conduction cardiaque progressivement altérée se traduisant par des tachycardies ventriculaires ayant comme répercussion un arrêt cardiaque brutal létal. Parallèlement à cette cardiopathie, les muscles squelettiques sont également touchés chez deux membres de cette famille avec une faiblesse des muscles proximaux des membres supérieurs. De manière intrigante, une brachydactylie des doigts mais surtout des orteilles a été soulignée. Ce phénotype particulier apportant un nouvel argument en faveur de l'hypothèse du continuum pathologique car il rappelle les observations faites dans les cas de dysplasie acromandibulaire (Novelli et al., 2002) ou encore dans le syndrome progeria de Hutchinson-Gilford (Hennekam, 2006).

I.2.3 Les lipodystrophies

Les lipodystrophies sont des maladies hétérogènes caractérisées par une perte sélective de la graisse sous cutanée. Acquises ou d'origines génétiques, elles mènent à une prédisposition à des désordres métaboliques dont la sévérité est corrélée à l'étendue de la perte adipeuse (Garg, 2011).

I.2.3.1 La lipodystrophie partielle familiale de Dunnigan

La lipodystrophie partielle familiale de type Dunnigan ou FPLD2 (OMIM#151660) est une maladie métabolique caractérisée par une distribution anormale des graisses sous cutanées qui débute à l'adolescence. Les individus affectés perdent graduellement la graisse au niveau des extrémités aussi bien des membres inférieurs que du tronc, ainsi que des régions axiales. A l'inverse, le tissu adipeux s'accumule au niveau du cou et du visage de manière similaire à des patients traités par des glucocorticoïdes au long court (Garg et al., 1999; Monteiro et al., 2012). Parallèlement, les individus FPLD2 ont une hypertrophie musculaire apparente. Ce syndrome comporte également des anomalies métaboliques de type insulino-résistant accompagnées d'une hyperinsulinémie et d'*acanthosis nigricans* entraînant un diabète (Bidault et al., 2011). Une hypertriglycéridémie est également un des signes biochimique caractéristique de la pathologie, adjointe à une diminution des HDL (High-Density-Lipoprotein)-cholestérol, de la lipoprotéine et de l'adiponectine menant à des complications de type hépatique. En effet, des stéatoses hépatiques peuvent se compliquer en cirrhose hépatique dans certains cas. De même, cette dyslipidémie aggravée par une augmentation de la tension artérielle mène à une athérosclérose prémature à l'origine du décès précoce de ces patients (Agarwal and Garg, 2006). De manière spécifique, des signes d'hyperandrogénisme sont généralement présents chez la femme bien que la sévérité soit variable. L'expression de la maladie est variable entre les hommes et les femmes. Tout d'abord, la distribution anormale des graisses est moins flagrante chez l'homme que chez la femme, et ce phénomène est d'autant plus marqué chez un homme mince. De la même manière, l'insulino-résistance et l'hypertriglycéridémie sont généralement moins sévères chez la femme (Burn and Baraitser, 1986; Mory et al., 2012; Vigouroux et al., 2000).

Dans 90 % des cas, les patients présentent une mutation faux-sens hétérozygotes (substitution d'un acide aminé basique par un acide aminé neutre) au niveau du codon 482 du gène *LMNA*. Cette mutation, au niveau d'un domaine de liaison à l'ADN, modifie les interactions de la

lamine A avec la chromatine et perturbe en conséquence la transcription de certains gènes (Stierle et al., 2003; Vigouroux et al., 2000; Weterings et al., 2013). La transmission se fait de manière autosomique dominante.

I.2.3.2 La dysplasie acromandibulaire

La perte de tissu adipeux est également observée chez les patients souffrant de dysplasie acromandibulaire ou MAD (OMIM#24,8370). Cette pathologie peut être classée en deux sous types : la MAD de type A pour laquelle la perte de graisse sous-cutanée est restreinte aux extrémités et la MAD de type B pour laquelle la diminution du tissu adipeux est généralisée aussi bien au niveau du visage, du tronc ou des extrémités (Simha and Garg, 2002). Ce syndrome est également caractérisé par une hypoplasie de la mâchoire, des clavicules et une résorption osseuse des phalanges terminales. D'autres signes aident également au diagnostic notamment un retard de fermeture des fontanelles, des contractures articulaires, une peau marbrée par des tâches pigmentaires ou encore une petite taille. Concernant les atteintes métaboliques (hyperinsulinémie, résistance à l'insuline, intolérance au glucose, diabète mellitus, hyperlipidémie), elles sont moins prononcées que dans les lipodystrophies partielles familiales de type Dunnigan mais couramment reportées (Agarwal and Garg, 2006). La dysplasie acromandibulaire est une maladie autosomique récessive rare caractérisée dans la plus part des cas par une mutation homozygote faux-sens dans le gène *LMNA* de type c.1580G>A, p.Arg527His cause de la transition G vers A en position 1580 (Novelli et al., 2002). Cependant, d'autres mutations homozygotes faux-sens sont également décrites (c.1586C>T, p.Ala529Val ; c.1580G>T, p.Arg527Leu) (Al-Haggar et al., 2012; Garg et al., 2005). Ces mutations seraient à l'origine d'une instabilité de la lamine A qui aurait tendance à s'agréger, diminuant les interactions avec les autres protéines.

I.2.4 La neuropathie axonale de Charcot-Marie-Tooth

La neuropathie axonale de Charcot-Marie-Tooth de type 2B1 (OMIM#605588) est une laminopathie qui affecte les nerfs périphériques. Elle est caractérisée par une déformation des pieds, une dystrophie musculaire distale des quatre membres qui débute dès l'enfance avec une réflexologie ostéotendineuse abolie (De Sandre-Giovannoli et al., 2002). Alors que l'exploration électromyographique est normale, une raréfaction des fibres axonales

myélinisées est visible sur les coupes histologiques de biopsies musculaires de patients (Chaouch et al., 2003; Tazir et al., 2004).

Cette neuropathie est causée par une mutation homozygote dans le gène *LMNA*. Historiquement, elle a été décrite par l'équipe de Nicolas Levy dans une famille consanguine algérienne. De transmission autosomique récessive, cette mutation conduit à la substitution R298C dans le domaine rod des lamines A/C ce qui modifie les interactions des lamines A/C avec ses interlocuteurs (De Sandre-Giovannoli et al., 2002). Comme pour de nombreuses autres laminopathies, d'autres mutations ont été décrites pour cette maladie et notamment les mutations hétérozygotes R571C (Benedetti et al., 2005) et E33D (Goizet et al., 2004) montrant qu'un même phénotype peut être dû à une altération dans une région différente de la protéine.

1.2.5 Les laminopathies systémiques

Appelées également syndromes de vieillissement prématué ou laminopathies progéroïdes, les laminopathies systémiques sont liées par une maturation post traductionnelle anormale de la prélamine A, laquelle provoque des anomalies de structures de l'enveloppe nucléaire et une toxicité cellulaire sévère (Hutchison, 2011) (Figure 4).

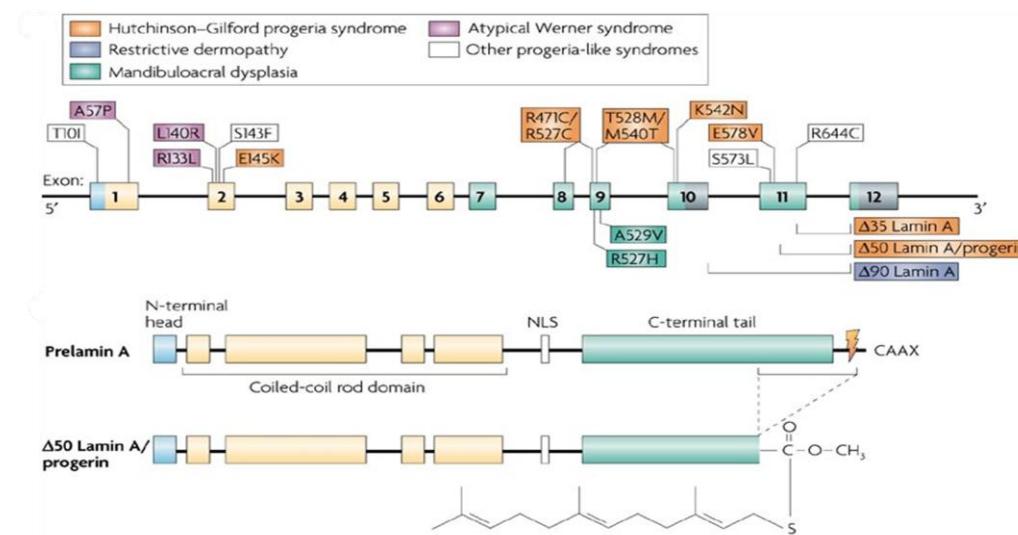


Figure 4 : Mutations associées aux laminopathies systémiques

Les mutations des laminopathies systémiques sont essentiellement localisées en position C-terminale du gène *LMNA*. A l'inverse, les mutations associées au syndrome de Werner se trouvent préférentiellement dans le domaine N-terminale. La progéride est le mutant de la lamine A produit dans la progéridie. Cette protéine est déletée de 50 acides aminés situés dans la queue de la lamine A (Brian et al., 2007).

I.2.5.1 Les syndromes progéroïdes

Différentes pathologies provoquant un vieillissement généralisé sont regroupées dans la famille des syndromes progéroïdes, le syndrome de Werner, la dermopathie restrictive et les syndromes progéroïdes typiques et atypiques.

I.2.5.1.1 Le syndrome atypique de Werner

Le syndrome de Werner ou WS (OMIM#277700) est une maladie autosomique récessive qui a souvent été résumée comme étant une caricature du vieillissement (Epstein, 1966 ; (Goto, 1997). Les patients atteints par cette pathologie présentent une symptomatologie de vieillissement prématué débutant à la fin de l'adolescence. Les deux sexes sont affectés de la même manière avec un facies typique dit en bec d'oiseau, un retard de croissance staturo-pondérale, un blanchissement des cheveux, une cataracte juvénile bilatérale, des ulcérations cutanées, un diabète insulino-résistant ainsi que d'une athérosclérose (Takemoto et al., 2013). Les causes principales de décès chez ces individus sont d'une part les répercussions du développement de tumeurs malignes et d'autre part les infarctus du myocarde. Plusieurs mutations faux sens du gène *LMNA* ont été associées à ce syndrome notamment A57P, L140R (Chen et al., 2003), R133L (Caux et al., 2003), et D300N (Renard et al., 2009).

I.2.5.1.2 La dermopathie restrictive

La dermopathie restrictive ou RD OMIM#275210 (Navarro et al., 2004) est caractérisée par un retard de croissance intra-utérin qui conduit à une mort néonatale au cours de la première semaine de vie des suites d'une hypoplasie pulmonaire profonde. Les patients présentent des atteintes cutanées (une peau tendue et rigide avec des érosions et une hyperkératose), une absence de cils et de sourcils, un défaut de minéralisation des os du crâne et des rétractions articulaires (Broers et al., 2006). Cette maladie est due à une mutation hétérozygote qui cause une perte partielle de l'exon 11 du gène *LMNA*, entraînant la production d'une prélamine A tronquée. D'autres formes de DR sont dues à une insertion hétérozygote dans le gène *ZMPSTE24* menant à son inactivation. Dans les deux cas, le phénotype est identique, la lamine A ne peut pas être maturée correctement.

I.2.5.1.3 Les syndromes progéroïdes atypiques

Les premiers symptômes débutent majoritairement entre 20 et 30 ans. Les patients présentent des signes cliniques caractéristiques qui aident au diagnostic. De petite stature, ils présentent

un visage en bec d'oiseau avec des anomalies cutanées diverses (sclérodermie, atrophie de l'épiderme, trouble de la pigmentation, ulcération) et une voie aigue. Ils souffrent précocement de dégénérescence habituellement constatée dans le vieillissement physiologique avec des cheveux qui blanchissent, une cataracte, une lipoatrophie des membres, une ostéoporose ainsi qu'une athérosclérose. De manière sporadique, certains patients souffrent de malformation dentaire, de pied plat ou encore de calcification des tissus mous.

Il existe un grand nombre d'autres mutations à l'origine de ce tableau clinique caractéristique de syndrome progéroïde. Les substitutions c.1968G>A (Hisama et al., 2011) et c.1868C>G (Fukuchi et al., 2004; Shalev et al., 2007) ainsi que les insertions c.1968+1G>C (Navarro et al., 2004), c.1968+5G>C (Hisama et al., 2011) et c.1968+2T>A; en sont cinq exemples dans lesquels une quantité plus ou moins élevée de progérine ou d'une isoforme de la prélamine A tronquée a été mise en évidence. Les patients affectés par ces mutations présentent un syndrome de progéria atypique. Il existe également des mutations qui ne conduisent pas à la production de progérine ou d'isoformes tronquées de la prélamine A. C'est le cas notamment des mutations hétérozygotes p.C588R (Garg et al., 2009) et p.D300N (Renard et al., 2009), ainsi que la mutation hétérozygote composite p.T528M / p.M540T (Verstraeten et al., 2006).

I.2.5.2 La progéria typique de Hutchinson Gilford

La progéria ou syndrome de Hutchinson Gilford est une maladie rare extrêmement rare entraînant un vieillissement prématûr chez les patients qui en sont atteints. La suite de ce manuscrit sera consacrée à la présentation des mécanismes physiopathologiques sous-jacents, au tableau clinique des patients, aux modèles d'études de la progéria ainsi qu'aux solutions thérapeutiques proposées aux malades.

II. La progéria : Etat de l'art

La progéria, également appelée syndrome de Hutchinson Gilford, est une forme rare de laminopathie qui provoque un vieillissement prématûr des patients qui en sont atteints. L'appellation progeria provient de la combinaison grecque des mots *pro* qui signifie « avant » et *geras* qui veut dire « vieil âge », cette association aboutissant au mot *progeros* soit « vieux prématûrement ». Le premier cas de patient atteint de ce syndrome a été décrit en 1886 en Angleterre par le Dr Hutchinson (Hutchinson, 1886) puis le second au début du XX^{ème} siècle par le Dr Gilford (Gilford, 1904).

Le dernier recensement de patients atteints par la progéria mené par l'association pour la recherche sur la progéria (PRF pour Progeria Research Foundation) mentionne quatre-vingt-dix cas à travers le monde, plus treize cas présentant une laminopathie progéroïde soit cent trois cas au total (Figure 5). Ces enfants sont répartis dans trente-sept pays différents avec trente-trois patients en Europe dont deux français (www.progeriaresearch.org). La progéria touche, de la même façon, les filles et les garçons, avec un sexe-ratio de l'ordre de 1.2-1.5/1 en défaveur des garçons (Hennekam, 2006). Il est difficile d'évaluer l'incidence de cette pathologie étant donné que jusqu'en 2003, date de la découverte de la mutation causale de ce syndrome, le diagnostic ne reposait que sur la symptomatologie clinique. Cependant, entre 1915 et 1967, DeBusk et al. ont comptabilisé dix-huit patients atteints par la progéria aux Etats-Unis sur les 145 000 000 naissances pendant cette période. Le taux d'incidence représentait ainsi une naissance sur 8 000 000 (DeBusk, 1972). Un autre calcul a été réalisé aux Pays-Bas où cinq cas ont été recensés sur 19 981 000 naissances entre 1900 et 2005. Le ratio donne une incidence de près de une naissance sur 4 000 000 (Hennekam, 2006), en accord avec les chiffres proposés par Brown et al. en 1985 (Brown et al., 1985). Ces indications nous permettent d'affirmer que la progéria est une maladie orpheline. Même si la majorité des cas décrits sont des patients de type caucasien, toutes les communautés ethniques sont affectées par cette pathologie.



Figure 5 : Répartition des cas de progéria diagnostiqués en 2013
(<http://www.progeriaresearch.org>)

Bien que la mutation à l'origine de ce syndrome soit présente dès la naissance, cette pathologie est caractérisée par une symptomatologie tardive qui débute entre la première et la deuxième année de vie avec un âge médian de diagnostic à dix-neuf mois (Merideth et al., 2008). Les individus atteints présentent un vieillissement prématué généralisé. Il est estimé qu'ils vieillissent environ sept fois plus vite qu'une personne normale.

II.1 Mécanismes physiopathologiques de la progéria

II.1.1 Caractéristiques de la mutation

La progéria est causée par une mutation ponctuelle faux sens dans le gène *LMNA*, qui consiste en la transition d'une cytosine par une thymine en position 1824 (c.1824C>T) (De Sandre-Giovannoli et al., 2003). Silencieuse au niveau protéique, cette mutation sporadique active un site cryptique d'épissage en 5'(5'SS) de l'exon 11, causant la délétion en phase de 150 paires de base au niveau de cet exon (Figure 6).

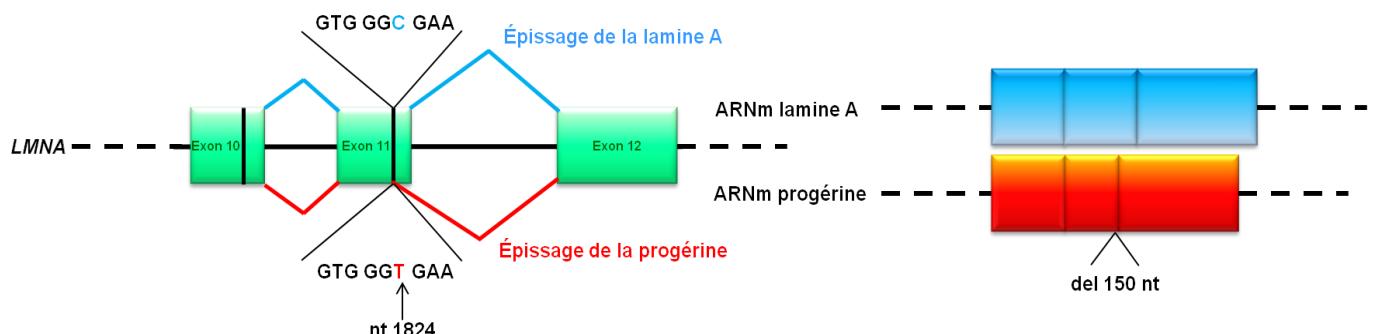


Figure 6 : Représentation schématique de la mutation à l'origine de la progéria et de sa conséquence au niveau de l'épissage du gène *LMNA*

nt : nucléotide ; del : délétion

La protéine produite alors est délétée de 50 acides aminés dans sa partie C-terminale et ne possède pas le site de reconnaissance de ZMPSTE24 (FACE 1), nécessaire à la maturation post-traductionnelle de la lamine A. Cette protéine, nommée progéria, restant carboxyméthylée et farnésylée reste ancrée à la membrane interne de l'enveloppe nucléaire, l'empêchant de remplir ses fonctions biologiques (Young et al., 2013) (Figure 6).

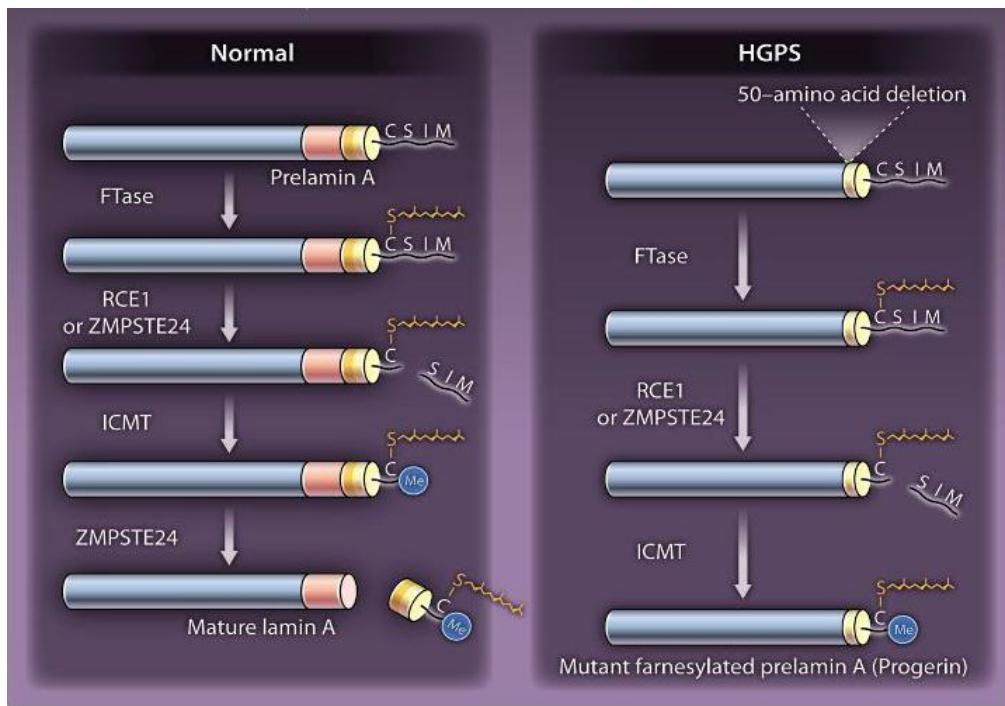


Figure 7 : Défaut de maturation de la prélamine A dans la progéria

Dans les conditions physiologiques, la lamine A est synthétisée sous forme d'un précurseur, la prélamine A qui devient lamine A après 4 étapes de maturation post-traductionnelle (panel de gauche). Dans le cas de la progéria, la prélamine A est déletée de 50 acides aminés. De fait, elle va subir les trois premières étapes de maturation mais restera farnésylée et carboxyméthylée en position C-terminale (Young et al., 2013).

Il existe néanmoins d'autres mutations, plus rares, à l'origine de la progéria qui activent également ce site cryptique d'épissage et conduisent à la production de progérine. Parmi ces mutations, la mutation c.1822G>A affecte le même acide aminé en position 608 sans changement de la séquence peptidique (Eriksson et al., 2003). De même, la mutation c.1821G>A affecte l'acide aminé 607 (V607V) (Reunert et al., 2012). Deux autres mutations hétérozygotes ont été rapportées comme étant associées à la progéria incluant les substitutions c.433G>A (E145K) et c.1960C>T (R654X) (Denecke et al., 2006; Eriksson et al., 2003). Toutes trois conduisent à la production d'une protéine tronquée qui ne peut pas subir une maturation normale. De manière intrigante, le rapport d'une patiente homozygote pour la mutation faux sens c.1626G>C (K542N) dans le gène *LMNA* a permis d'identifier le seul cas de transmission autosomique récessive de la progéria, preuve de la non-pénétrance de cette mutation (Plasilova et al., 2004).

II.1.2 Impacts fonctionnels de la mutation

Les mutations à l'origine de ce syndrome ont un impact majeur sur l'homéostasie nucléaire et des répercussions dans le fonctionnement cellulaire. Ces défauts ne sont pas la cause d'une haploinsuffisance de la lamine A mais sont provoqués par la présence de la progérine avec un gain de fonction toxique (Figure 8).

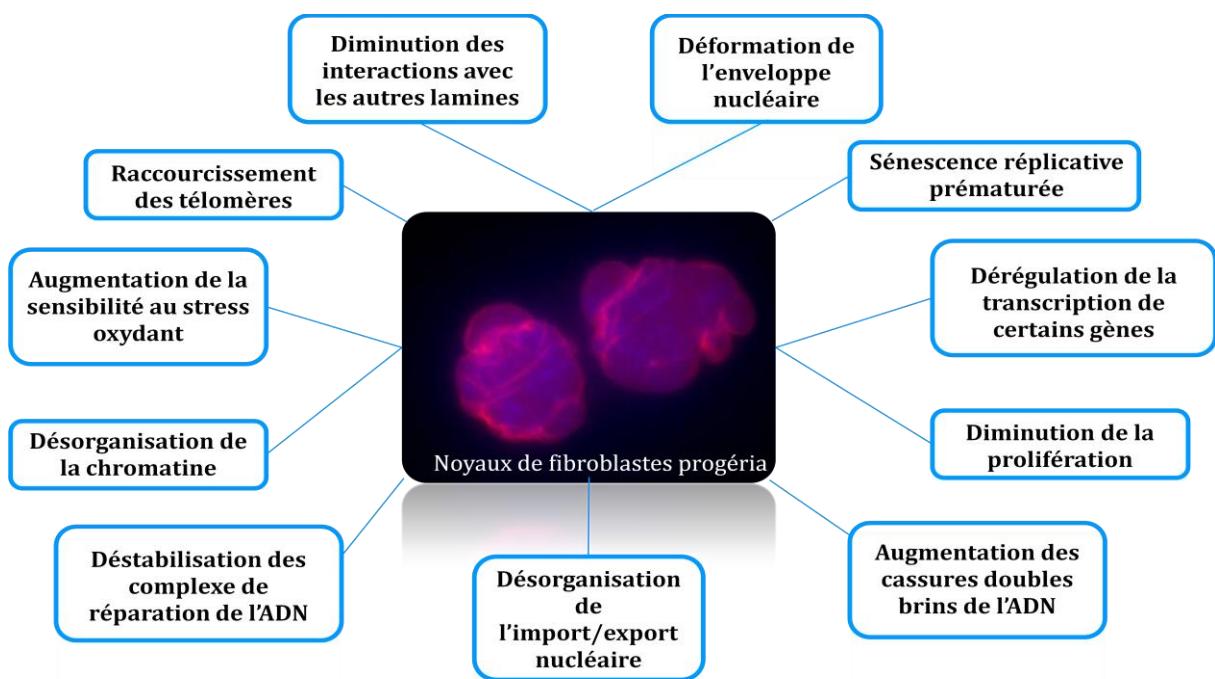


Figure 8 : Principaux défauts cellulaires et moléculaires caractéristiques de la progéria

II.1.2.1 Désorganisation de l'enveloppe nucléaire

La production de progérine a un impact direct sur l'architecture de l'enveloppe nucléaire (De Sandre-Giovannoli et al., 2003; Eriksson et al., 2003). Son accumulation provoque une désorganisation de la lamina nucléaire, réduisant les interactions notamment avec les lamines de types B (Goldman et al., 2004). En conséquence, les noyaux des cellules de patients présentent de nombreuses irrégularités provoquées par des invaginations du réticulum endoplasmique à l'intérieur du noyau (Figure 9). En outre, ces noyaux présentent une taille supérieure à la normale et peuvent prendre des formes appelées donut-shaped (Verstraeten et al., 2011). Ces déformations de l'enveloppe nucléaire s'aggravent au cours de la culture des cellules *in vitro*, et ont été montrées comme étant directement corrélées à l'augmentation de la synthèse de progérine (Goldman et al., 2004).

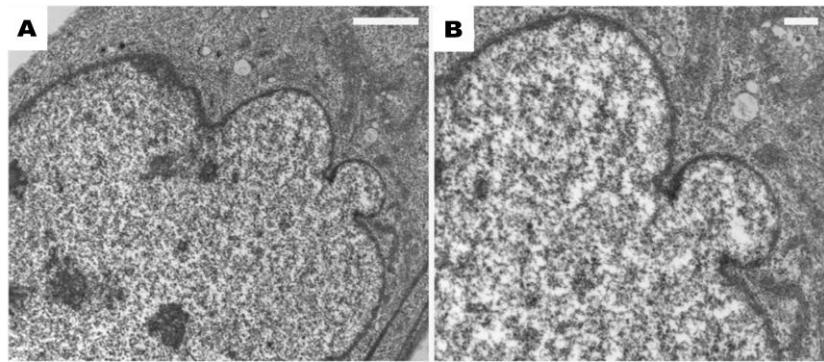


Figure 9 : Déformation de l'enveloppe nucléaire d'un fibroblaste de patient progéria

L'analyse de l'ultrastructure de l'enveloppe nucléaire d'un fibroblaste de patient progéria révèle des hernies qui viennent déformer le noyau, créant des bulles caractéristiques de la pathologie. La barre d'échelle représente 2 μ m dans le panel de gauche et 500 nm dans le panel de droite qui est un zoom du panel de gauche (Adapté de (Paradisi et al., 2005)).

Par ailleurs, un regroupement des pores nucléaires dans de petites régions a été mis en évidence (Goldman et al., 2004). Cette distribution anormale des complexes des pores nucléaires, observée aux passages élevés, peut-être expliquée par une perte d'interaction de la lamine A avec la nucléoporine 153 (Smythe et al., 2000), affectant les échanges divers de protéines et d'ARN entre le cytoplasme et le noyau. Cette perturbation du trafic nucléocytoplasmique peut être la cause d'un certain nombre d'effets physiologiques.

II.1.2.2 Altération de la transcription

L'expression et l'accumulation de progérine entraînent une perte de la chromatine dans les zones périphériques du noyau et dans certains cas, une perte de l'hétérochromatine au centre du noyau (Goldman et al., 2004). La lamine A étant impliquée dans l'activité transcriptionnelle de l'ARN polymérase II et indispensable aux protéines Rb et TBP (Shumaker et al., 2003), cette observation suggère que la lamine A mutée soit impliquée dans la régulation anormale de l'expression de nombreux gènes.

De surcroit, il a été observé par des équipes indépendantes, une diminution de l'expression de H3K9me3 (Histone 3 triméthylée sur la lysine 9), marque constitutive de l'hétérochromatine péricentrique, et de l'expression de H3K27me3 (Histone 3 triméthylée sur la lysine 27), marque facultative de l'hétérochromatine (Columbaro et al., 2005; Scaffidi and Misteli, 2006; Shumaker et al., 2006). La méthyltransférase responsable de cette méthylation, EZH2, est elle-même diminuée dans les cellules progéria (Shumaker et al., 2006). De plus, la protéine

HP1 α , physiologiquement associée à H3K9me3, est diminuée et partiellement dissociée dans les cellules progéria (Liu et al., 2011a; Scaffidi and Misteli, 2005; Shumaker et al., 2006). Ainsi, cette désorganisation de l'hétérochromatine périphérique induit des anomalies épigénétiques importantes lesquelles influencent la transcription génique.

II.1.2.3 Instabilité génomique

Les lamines de type A sont essentielles au maintien des complexes de réparation de l'ADN sur le site de cassure de la double hélice (Mahen et al., 2013; Musich and Zou, 2009). Dans le cas de la progeria, différentes études ont montré que les cellules primaires de patients (principalement des fibroblastes) présentaient une augmentation des cassures double brin de l'ADN ainsi qu'un défaut d'assemblage des complexes de réparations de l'ADN (Constantinescu et al., 2010; Liu et al., 2005; Manju et al., 2006). L'accumulation de progérine, entraîne l'activation d'un point de contrôle qui va permettre de phosphoryler les kinases ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated) et ATR (ATM- and Rad3-related). ATM est activé spécifiquement par les cassures double brin de l'ADN tandis qu'ATR est activé par un plus large spectre de cassures, notamment les cassures dues au stress répliquatif. Ainsi, Chk1 et Chk2 sont phosphorylés entraînant une cascade d'activation en aval à l'origine du ralentissement de la croissance des fibroblastes progéria en culture (Liu et al., 2006).

Cette instabilité génomique apparaît comme étant également liée une à reconnaissance anormale de ces dommages et peut s'expliquer par une anomalie de recrutement des facteurs de réparation Rad50 et Rad51 au niveau des sites de cassures double brin de l'ADN (Liu et al., 2008). A cette déficience de recrutement s'ajoute une localisation anormale de la protéine de réparation de l'ADN XPA (Xeroderma Pigmentosum groupe A), chargée d'éliminer des nucléotides endommagés dont la présence s'opposerait à la réparation des cassures de l'ADN (Liu et al., 2008).

Les cassures d'ADN n'étant pas réparées, les cellules de patients atteints de progéria entrent en apoptose (Musich and Zou, 2009). La fraction de cellules en apoptose est 4 à 8 fois plus importante dans les fibroblastes progéria que dans des cellules saines (Bridger and Kill, 2004) et ce défaut est exacerbé au cours des passages en culture.

II.1.2.4 Diminution de la prolifération

En 2004, une équipe britannique a révélé que le vieillissement cellulaire observé dans la progeria était dû à une hyperprolifération initiale des cellules, suivie d'une rapide perte de l'état prolifératif de 50 % par rapport à des cellules saines du même âge (Bridger and Kill, 2004). Par ailleurs, d'autres études ont démontré que les cellules de patients présentaient une altération de la réplication avec un blocage de la transition entre la phase précoce d'elongation de la chaîne d'ADN et la phase S tardive (Goldman et al., 2004). De même, une diminution d'expression de la protéine Rb ou de son statut phosphorylé a été souligné (Marji et al., 2010). Plus récemment, il a été prouvé que la progérine provoquait un défaut de séparation des chromosomes ayant pour conséquence un retard dans la progression de la mitose (Cao et al., 2007) et l'augmentation de cellules binucléées (Cao et al., 2007; Xiong et al., 2013). De surcroit, la voie de signalisation dépendante de p53 s'est révélée être activée de manière constitutive (Varela et al., 2005). L'ensemble de ces défauts du système de réplication observés dans les cellules progéria se traduit par une entrée en sénescence réplicative de manière prématuée.

II.1.2.5 Intégrité télomérique

La réduction de la taille des télomères est un autre paramètre impliqué dans la capacité réplicative des cellules (Allsopp et al., 1992; Huang et al., 2008). Les télomères sont des séquences d'ADN répétées (TTAGGG)_n situées à l'extrémité des chromosomes. A chaque réplication de l'ADN, l'extrémité de ces télomères ne peut pas être copiée par l'ADN polymérase, raccourcissant les télomères progressivement (Harley et al., 1990). Ces dernières années, différentes études ont montré un raccourcissement des télomères dans des fibroblastes de patients progéria, suggérant qu'un défaut de la lamine A était en cause dans cette pathologie. En 2009, Decker et al. ont, par ailleurs, démontré que les fibroblastes issus de patients progéria présentaient un raccourcissement des télomères, mais que les télomères des cellules hématopoïétiques étaient de longueur similaire aux contrôles (Decker et al., 2009). D'autres études ont révélé une perte de la stabilité de la protéine de réparation de l'ADN, 53BP1, ainsi qu'une diminution de son expression dans des fibroblastes embryonnaires de souris (MEF pour Mouse Embryonic Fibroblast) *Lmna*^{-/-}. Outre un raccourcissement des télomères, ces études ont également mis en évidence une distribution anormale des télomères à la périphérie nucléaire, corrélant ce défaut avec l'accumulation de l'histone phosphorylée H2AX dans ces zones (Dimitrova et al., 2008; Gonzalez-Suarez et al., 2009).

II.1.2.6 Stress oxydant

Une étude a démontré que les fibroblastes issus de patients progéria, ainsi que des MEF exprimant la progérine, présentaient une augmentation du taux d'espèces réactives de l'oxygène (ou ROS) en comparaison avec des cellules contrôles. En réponse à ce stress oxydatif, les cellules progéria exprimant davantage de MnSOD (Super oxyde Dismutatse), et ce, de manière amplifiée au cours des passages, ont présenté une quantité d'ATP diminuée de 50 % par rapport aux cellules saines. Ces données expérimentales prouvent que les fibroblastes issus de patients progéria ont une sensibilité au stress oxydatif augmentée à cause de la présence de progérine (Viteri et al., 2010).

La génération de ROS étant une cause majeure de cassures de l'ADN (Lee and Pervaiz, 2011), leur présence exacerbée dans les cellules progéria pourrait être une des causes de l'accumulation et la persistance de ces dommages à l'ADN caractéristiques de la pathologie (Richards et al., 2011). En effet, des cassures induites par des ROS ne sont pas réparées dans des fibroblastes de patients progéria alors que celles induites par des agents génotoxiques tels que l'étoposide le sont (Richards et al., 2011). Les résultats de cette étude suggèrent que l'impact des ROS soit directement corrélé au phénotype pathologique associé à la progéria.

II.2 Tableau clinique des patients atteints par la progéria

L'ensemble des anomalies mentionnées ci-dessus présentent l'étendue des dommages causés par la progérine au niveau moléculaire et cellulaire. A l'échelle de l'organisme entier, la progérine engendre un grand nombre de symptômes extrêmement délétères pour les patients, allant jusqu'à causer leur décès prématurément à l'adolescence (Figure 10).

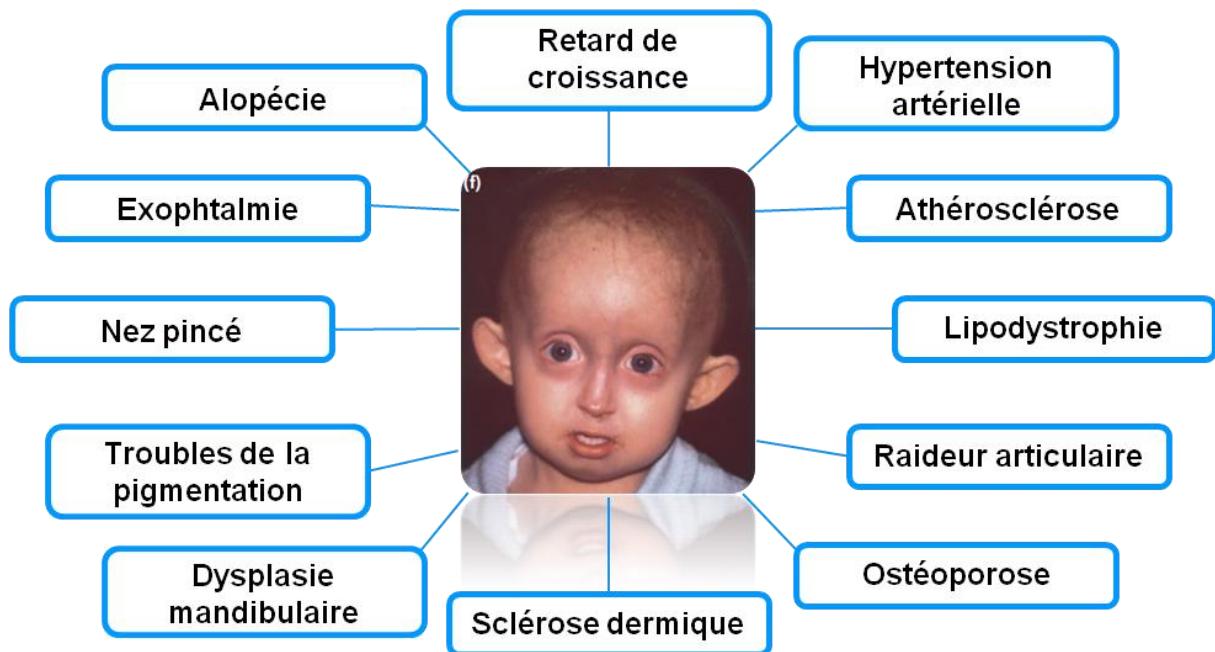


Figure 10 : Principaux signes cliniques caractéristiques de la progéria

Photo provenant de (Doubaj et al., 2011; Mazereeuw-Hautier et al., 2007)

II.2.1 Caractéristiques faciales

Les enfants présentent une dysmorphie faciale caractéristique, présentant de grands yeux sans réelle exophthalmie, un nez pincé avec une pointe fine et des lèvres minces souvent cyanosées (Doubaj et al., 2011). Les zones du visage sont disproportionnées avec une dysplasie mandibulaire, un front proéminent, ainsi qu'une diminution de la taille du menton et des lobes d'oreilles (Agarwal et al., 2010b).

II.2.2 Retard de croissance

A la naissance, le poids moyen d'un enfant progéria est de 2,980 kg (moyenne établie sur 42 enfants), sensiblement identique au poids moyen d'un nourrisson en bonne santé de 2,995 kg (Hennekam, 2006). En revanche, leur développement est ralenti et le retard staturo-pondéral est souvent l'un des facteurs qui oriente le diagnostic de la progéria. Alors que la moyenne de croissance des enfants en bonne santé entre 2 à 10 ans est de 5.84 cm/an, les mesures faites sur dix enfants atteints par la progéria montrent un taux moyen de 3.58 cm/an. La courbe de poids est également affectée avec une moyenne de 0,65 kg/an contre 1,80 kg/an chez les sujets sains (Meredith, 2008). De manière générale, le développement des caractères sexuels

primaires est normal mais les caractères sexuels secondaires n'apparaissent pas (Doubaj et al., 2011; Hennekam, 2006). Les enfants présentent également un retard dans la croissance des dents (Arai and Yamashita, 2002; Nguyen and Mayhew, 2001).

II.2.3 Atteintes cardiovasculaires

Au cours du vieillissement physiologique, les atteintes de la fonction vasculaire sont courantes et peuvent mener à des complications mettant en danger la vie du sujet. Dans la progéria, les manifestations sont très semblables à celle observées dans le vieillissement normal. Un grand nombre de patients présente une élévation de la tension artérielle, aussi bien systolique que diastolique souvent associée à une tachycardie qui fatigue le cœur (Merideth et al., 2008). Cette hypertension est causée par une rigidité des artères due à une désorganisation des fibres élastiques de la paroi artérielle, une calcification et un épaississement de l'aventice voire de l'intima-média, participant à la sténose des artères carotides et des valves aortiques et mitrales (Gonzalez-Quereda et al., 2011; Hanumanthappa et al., 2011; Leopold, 2013; Merideth et al., 2008). Les artères des patients commencent à se rigidifier avant même les premiers stades d'athérosclérose et les premiers changements morphologiques (Varady et al., 2010). Des sténoses du tronc aortique, des artères carotides et des valves aortiques et mitrales dues à la formation de plaques d'athérome avec des dépôts de matrice extracellulaire, sont également majoritairement observées. Cette athérosclérose est majorée par un bilan lipidique anormal avec une augmentation du LDL-cholestérol fréquemment associée à une diminution du HDL-cholestérol, une augmentation anormale du nombre de plaquettes et du taux de prothrombine. Des anomalies du rythme peuvent être également détectées par un électrocardiogramme révélant un court intervalle PR, une augmentation de l'intervalle QT, et une onde Q profonde (Merideth et al., 2008). Une hypertrophie ventriculaire est couramment mentionnée ainsi qu'un épaississement de la valve aortique. De manière globale, les anomalies morphologiques conduisent à une contraction inefficace du cœur du fait des régurgitations aortiques et mitrales qu'elles entraînent. En conséquence, les enfants souffrent d'une insuffisance coronarienne, font de multiples ischémies cardiaques menant à un infarctus fatal ou à un accident vasculaire cérébral à l'âge moyen de 13 ans (Hanumanthappa et al., 2011; Merideth et al., 2008).

II.2.4 Atteintes ostéoarticulaires

Les atteintes ostéoarticulaires sont les plus handicapantes pour les patients. Le défaut d'ossification est tout d'abord visible au niveau de la fontanelle antérieure. Cette dernière reste ouverte jusqu'à l'enfance, voir même l'adolescence (Hennekam, 2006). Les enfants souffrent d'ostéolyses qui touchent les phalanges distales (Jansen and Romiti, 2000), avec un début vers deux ans au niveau de l'index puis qui s'étend aux autres doigts (de Paula Rodrigues et al., 2002; Mazereeuw-Hautier et al., 2007). Les clavicules, la mandibule et le crâne sont également ciblés par ce défaut d'ossification. Une raideur des articulations conjointe à des déformations limite le mouvement des enfants au niveau des coudes, des poignets, des épaules des hanches et de la colonne vertébrale. Une ostéoartrite de la hanche, des dislocations de l'épaule (Espandar et al., 2012; Sowa, 2009), des scolioses (de Paula Rodrigues et al., 2002; Xiong et al., 2013) sont également couramment mentionnées dans les cas cliniques. Plusieurs études suggèrent que les anomalies osseuses sont dues à un trouble du développement osseux et à une dysplasie (Uitto, 2002), alors que d'autres soutiennent la thèse qu'elles sont dues à un vieillissement prématûr qui bloque la formation osseuse entraînant une ostéoporose (Moen, 1982).

II.2.5 Atteintes de la peau et les phanères

Bien que ce ne soient pas les affections qui invalident le plus les patients, l'ensemble des cas cliniques reportent des atteintes cutanées. L'épiderme et le derme sont touchés avec un amincissement général du derme, un dessèchement causé par une diminution du nombre de glandes sudoripares et sébacées et une peau ridée. Le tégument est ponctué de plaques sclérotiques épaisses et rigides (Erdem et al., 1994; Kim et al., 2011). Les biopsies de lésions scléreuses en phase aiguë montrent une hypertrophie du collagène et une infiltration lymphocytaire qui s'étend jusque dans l'hypoderme (d'Erme et al., 2012; Hennekam, 2006). Un cas de calcinose cutanée généralisée sur l'ensemble du corps a également été décrit de manière sporadique (Nakamura et al., 2007). A ces manifestations s'ajoutent parfois des troubles de la pigmentation, allant de la tache de rousseur, à des zones dépigmentées ou hyperpigmentées donnant un aspect marbré à la peau, associés à des télangiectasies superficielles (Hennekam, 2006). Récemment, une équipe indienne a décrit une diminution de la pigmentation localisée au niveau de la plante des mains, du pubis et du tronc (Kar and Satapathy, 2013). Par ailleurs, une atrophie de la graisse sous cutanée, s'aggravant au cours de

la vie des patients, est systématiquement rapportée. De la même manière, les phanères ne sont pas épargnés. Une alopécie sévère touchant les cheveux, les cils, les sourcils affecte les patients (Jansen and Romiti, 2000), ainsi qu'une dystrophie des ongles (Agarwal et al., 2010b).

II.2.6 Autres atteintes

Outre l'exophtalmie et l'absence de cils, les patients atteints de progéria présentent des manifestations oculaires caractéristiques. Une rétraction de la paupière supérieure provoque souvent une lagophthalmie qui soumet la cornée aux agressions extérieures en permanence (Chandravanshi et al., 2011). Par ailleurs, des atteintes oculaires rares ont également été rapportées dans la progéria tel que le syndrome des yeux secs, des kératopathies, une opacité de la cornée voire une cataracte, un nystagmus, des strabismes, des myopies ou des hypermétropies (Hennekam, 2006; Iordanescu et al., 1995; Merideth et al., 2008).

De manière surprenante, les individus atteints par la progéria ne développent pas de cancer. Seul le cas d'une petite fille de 11 ans qui présente la mutation c.1868C>G (p.T623S) a révélé un osteosarcome (Shalev et al., 2007).

Par ailleurs, les patients présentent des capacités cognitives intactes. L'examen neurologique et l'électroencéphalogramme ne révèlent pas d'anomalies (Doubaj et al., 2011; Hennekam, 2006; Jansen and Romiti, 2000).

Afin de reproduire *in vitro* et *in vivo* les atteintes cliniques précédemment mentionnées, plusieurs modèles ont été développés.

II.3 Modèles d'étude de la pathologie

II.3.1 Modèles *in vitro* de la progéria

II.3.1.1 Biopsies de patients

Bien qu'impératif pour comprendre la physiopathologie de la maladie, l'accès aux tissus de patients progéria est singulièrement limité pour deux raisons principales. Tout d'abord, du fait de la faiblesse du nombre de patients et d'autre part de leur extrême fragilité, rendant limitée

la possibilité de réaliser des prélèvements. Ces prélèvements sont prioritairement utilisés en clinique pour le diagnostic, le suivi des traitements et de leur état physique avant d'être donnés à des fins de recherche.

II.3.1.1.1 Prélèvement sanguin

Le prélèvement sanguin est un moyen simple pour obtenir des cellules de patients. Ces échantillons à partir desquels sont extraits les lymphocytes, ne sont mentionnés dans la littérature que dans le cadre d'analyses génomiques (Paradisi et al., 2005).

II.3.1.1.2 Biopsie cutanée

Les deux seules études réalisées sur des coupes de peau de patients atteints par la progéria ont été publiées par l'équipe de Karima Djabali (McClintock et al., 2007; Wenzel et al., 2012). En 2007, les auteurs de cette étude ont utilisé des biopsies cutanées avec pour objectif d'étudier le rôle et la localisation de la progérine au niveau de l'épiderme de patients mais également d'épiderme de personnes âgées (McClintock et al., 2007). Cette étude a ainsi démontré que la progérine était préférentiellement exprimée par les kératinocytes des couches superficielles de l'épiderme et plus précisément dans la couche granulaire qui correspondent à des cellules en phase terminale de différenciation. A l'opposé, ces travaux ont montré que les kératinocytes de la couche basale de l'épiderme, qui contient les progéniteurs épidermiques, n'exprimaient pas de progérine. Des marquages sporadiques ont également été détectés dans le derme autour des vaisseaux sanguins et au niveau de kératinocytes interfolliculaires dermiques et des muscles érecteurs du poil (McClintock et al., 2007).

Plus récemment, la même équipe a mis en évidence une population particulière au niveau de la peau (Wenzel et al., 2012). Ces cellules, nommées SKP (SKin-derived Precursor) possédaient des caractéristiques typiques de cellules souches adultes. Ces cellules expriment des marqueurs de multipotence tels qu'Oct4, Sox2, Nanog, nestin et TG30 et présentent la capacité de s'autorenouveler et de proliférer activement. Dans cette étude, les SKP ont été présentées comme étant des cellules multipotentes car elles ont pu se différencier aussi bien en cellules musculaires lisses qu'en fibroblastes. Ces travaux ont par ailleurs démontré que leur différenciation en cellules musculaires lisses était affectée lorsque ces cellules provenaient de patients atteints de progeria en comparaison de cellules provenant de sujets sains. Par ailleurs, les SKP étaient beaucoup moins nombreuses dans des coupes de peau provenant de patient atteints par la progéria que dans des coupes de tissus témoins, suggérant

une déplétion en cellules souches adultes et la détérioration progressive des fonctions tissulaires dans cette pathologie (Wenzel et al., 2012).

II.3.1.2 Cultures primaires de fibroblastes dermiques de patients

La culture primaire de fibroblastes de patients est le modèle cellulaire le plus utilisé dans les études *in vitro* de la progéria, tant pour des études mécanistiques, afin de comprendre la physiopathologie de la maladie, que pour des études pharmacologiques afin de mettre en avant l'intérêt d'utiliser certaines molécules (Cao et al., 2007; Cao et al., 2011; Capell et al., 2005; Constantinescu et al., 2010; Marji et al., 2010; Paradisi et al., 2005; Scaffidi and Misteli, 2006, 2008). Cette ressource biologique présente cependant l'inconvénient d'être prématulement sénescente et d'être variable en fonction de l'âge et de la localisation du prélèvement.

II.3.1.3 Cellules transgéniques : transfection d'un plasmide GFP-progérine

Ces dernières années des cellules HeLa, NIH 3T3, HEK293 ou des fibroblastes ont été transfectées avec différentes constructions permettant la surexpression de progérine (Capell et al., 2005; Glynn and Glover, 2005; Goldman et al., 2004; Mallampalli et al., 2005). Bien que présentant l'inconvénient de surexprimer une quantité non maîtrisée de progérine, ces constructions ont constitué un outil d'étude majeur pour la compréhension du processus de prénylation de la prélamine A et l'évaluation de certains traitements (Cao et al., 2007; Constantinescu et al., 2010; Scaffidi and Misteli, 2008).

II.3.2 Les modèles animaux de la progéria

Au cours de ces dix dernières années, plusieurs modèles murins de la progéria ont été développés, apportant de précieuses informations sur les mécanismes moléculaires impliqués dans la pathologie et sur les stratégies thérapeutiques anti-progéria. Alors que certains modèles présentent des atteintes ciblées sur un tissu unique, d'autres regroupent des symptômes plus variés, l'objectif étant toujours de se rapprocher, le plus objectivement, de la physiologie humaine (Tableau 2).

	Symptômes et caractéristiques	Références
<i>Lmna</i> ^{-/-}	<ul style="list-style-type: none"> - Exprimant ni la lamine A ni la lamine C - Phénotype de dystrophie musculaire - Durée de vie courte : huit semaines 	- Sullivan et al., 1999
<i>Zmpste24</i> ^{-/-}	<ul style="list-style-type: none"> - Exprimant la lamine C et une prélamine A farnésylée - Faiblesse musculaire - Ralentissement de la courbe de poids - Atteintes cardiovasculaires - Atteintes ostéoarticulaires - Forme hétérozygote moins atteinte - Durée de vie raccourcie : six mois 	<ul style="list-style-type: none"> - Bergo et al., 2002 - Pendas et al., 2002 - Fong et al., 2006 - Varela et al., 2008 - Liu et al., 2012a
<i>Lmna</i> ^{HG/+}	<ul style="list-style-type: none"> - N'expriment pas la lamine C, uniquement une prélamine A farnésylée - Phénotype de type progéria - Pas d'atteinte cardiovasculaire - Forme homozygote plus atteinte - Forme <i>Lmna</i>^{nHG/+} qui exprime une forme de prélamine A non farnésylée qui donne les mêmes symptômes 	- Yang et al., 2005
<i>Lmna</i> ^{nPLAO/nPLAO}	<ul style="list-style-type: none"> - N'expriment pas la lamine C, uniquement la prélamine A mutée non maturée en lamine A - Présentent un phénotype de cardiomyopathie - Sur le même principe, les souris <i>Lmna</i>^{PLAO/PLAO} n'expriment que la prélamine A maturée en lamine A mature, les souris <i>Lmna</i>^{LAO/LAO} expriment une forme de lamine A mature et les souris <i>Lmna</i>^{LCO/LCO} expriment uniquement la lamine C, présentent toutes trois un phénotype normal 	<ul style="list-style-type: none"> - Davies et al., 2010 - Coffinier et al., 2010
K14-progérine	<ul style="list-style-type: none"> - Expression de la progérine humaine sous le contrôle du promoteur de la kératine 14 - Anomalie de la morphologie nucléaire des kératinocytes - Pas d'anomalie de la cicatrisation, de la qualité du pelage 	<ul style="list-style-type: none"> - Wang et al., 2008 - Rosengardten et al., 2011
G608G	<ul style="list-style-type: none"> - Exprimant la progérine à l'état homozygote ou hétérozygote la forme homozygote étant la plus affectée - Phénotype de type progéria - Pas d'atteinte ostéoarticulaire - Pas de diminution de la durée de vie des souris 	- Varga et al., 2006
Tetop-<i>Lmna</i>^{G608G}	<ul style="list-style-type: none"> - Même caractéristiques cliniques que les souris G608G - Particularité dans l'induction de l'expression de la mutation au moment désiré 	- Sagelius et al., 2008
G609G	<ul style="list-style-type: none"> - Mutation qui correspond chez l'homme à la mutation G608G - Ralentissement de la courbe de croissance, perte de la graisse sous cutanée, atteintes ostéoarticulaires, hypoglycémie, altérations cardiovasculaires, mort prématurée 	<ul style="list-style-type: none"> - Osorio et al., 2011 - Villa-Bellosta et al., 2013

Tableau 2 : Modèles d'étude *in vivo* de la progéria

II.3.2.1 Lignées de souris déficientes pour la *Zmpste24*

La protéine *Zmpste24* est une métalloprotéinase membranaire du réticulum endoplasmique qui clive la partie C-terminale de la prélamine A lors de la dernière étape de maturation post-traductionnelle (Freije et al., 1999). En 2002, Bergo et al. et Pendas et al. ont décrit, les premiers modèles *Zmpste24^{+/−}* et *Zmpste24^{−/−}*. Dans cette étude, les auteurs ont démontré que les cellules de ces souris n'exprimaient pas la lamine A mature, mais une prélamine A farnésylée au niveau de l'enveloppe nucléaire (Bergo et al., 2002; Pendas et al., 2002). Dans le modèle développé par Bergo et al., l'exon 8 qui code pour le domaine de liaison au zinc est remplacé par une cassette de résistance à la néomycine (Bergo et al., 2002). Dans le modèle développé par Pendas et al., la séquence du gène *Zmpste24* est interrompue après le codon 39 (Pendas et al., 2002). Alors que les animaux naissent normaux, ils développent des signes de vieillissement accéléré progressivement au cours de la croissance. Les souris hétérozygotes ont un phénotype pathologique moins prononcé que les souris homozygotes, avec un début des symptômes vers trois-quatre semaines. La courbe de poids est ralentie, les animaux perdent leurs poils progressivement et présentent une faiblesse musculaire au niveau des extrémités supérieures et inférieures (Bergo et al., 2002). Les souris deviennent moins mobiles et, lorsqu'elles déplacent, écartent les pattes arrière (Pendas et al., 2002). Au bout de six-huit mois de vie, les souris développent des anomalies ostéoarticulaires caractérisées par une cyphose de la colonne vertébrale, des fractures osseuses spontanées avec une ostéogénèse défective conduisant à une diminution du volume des os corticaux et trabéculaires. Vers 20-24 semaines de vie, pratiquement toutes les côtes des souris sont cassées au niveau de la jonction entre la côte et la conne vertébrale. Le phénotype est progressif et conduit à la mort des souris vers six-sept mois (Bergo et al., 2002). Le modèle de Pendas présente également une cardiomyopathie dilatée des deux ventricules associée à un amincissement des parois ventriculaires, ainsi qu'une lipodystrophie avec une perte totale de la graisse sous cutanée après seize semaines de vie (Pendas et al., 2002).

Les phénotypes pathologiques détaillés dans les deux modèles suggèrent que l'accumulation de prélamine A farnésylée contribue à la physiopathologie de la maladie. C'est pour cela que la majorité des études ont utilisé ce modèle pour investiguer, plus avant, l'effet des différentes molécules proposées pour traiter la progeria (Fong et al., 2006; Liu et al., 2012a; Varela et al., 2008).

II.3.2.2 Lignées de souris qui expriment la progérine

Dans l'optique de créer un modèle qui présente les caractéristiques phénotypiques de la progéria les plus proches de la physiologie, l'équipe américaine de Loren Fong a généré une lignée qui exprime la progérine (Yang et al., 2006). Dans cette étude, le gène *LMNA* a été déleté de l'intron 10, de l'intron 11 ainsi que les 150 derniers nucléotides de l'exon 11. De cette manière, les souris homozygotes pour ce mutant de la lamine A expriment la progérine mais pas la forme mature de la lamine A. Les fibroblastes embryonnaires issus de ces souris présentent des déformations nucléaires caractéristiques, caractérisés par des invaginations du réticulum endoplasmique et une accumulation de progérine.

Dans ce modèle, les souris homozygotes comme hétérozygotes présentent la plupart des signes cliniques de la progéria. Alors que les souris apparaissent normales à la naissance, elles commencent à perdre du poids vers la 6-8^{ème} semaine de vie. De plus, elles arborent une perte de graisse sous-cutanée et abdominale ainsi que des déformations osseuses de la colonne vertébrale avec notamment des cyphoses prononcées. Elles développent des lésions osseuses de type ostéolyse les prédisposant à des fractures spontanées particulièrement au niveau des côtes mais aussi des clavicules, de la scapulaire ou des mandibules. La caractéristique la plus sévère de ce modèle est une diminution de leur durée de vie qui rappelle la mort prématurée des patients atteints de progéria (Yang et al., 2008; Yang et al., 2006). Cependant, aucun défaut cardiovasculaire n'a été reporté dans ce modèle ce qui ne corrèle pas avec le tableau clinique de cette maladie. Cette constatation souligne la limite de la modélisation de la progéria avec ce modèle, notamment pour étudier la physiopathologie des lésions vasculaires, d'autant plus que les accidents cardiovasculaires représentent la première cause de décès chez les enfants atteints par la progéria.

II.3.2.3 Lignée de souris qui présente la mutation G608G

Afin de se rapprocher plus fidèlement de la physiopathologie de la progéria, l'équipe de Francis Collins a généré une lignée de souris transgénique qui porte un chromosome de bactérie artificiel linéarisé (BAC pour Bacterial Artificial Chromosome), contenant la mutation G608G spécifique de la maladie chez l'homme (Varga et al., 2006). Alors que la progérine est exprimée dans une grande variété de tissus, les auteurs de ces travaux ont démontré, dans ce modèle, que seules les cellules musculaires lisses vasculaires (VSMC pour Vascular Smooth Muscle Cell) étaient affectées. Les souris présentent une perte progressive

des VSMCs à partir de cinq mois, qui devient sévère vers les douze mois de vie. La matrice extracellulaire est également affectée avec des fibres élastiques sectionnées, une accumulation de protéoglycane et de collagène qui viennent combler les vides laissés par les VSMCs, sans toutefois d'inflammation détectée. L'adventice et la média se trouvent, de fait, épaissies et calcifiées, avec pour les artères les plus affectées, l'aorte descendante et les carotides. Selon les auteurs, cette localisation ciblée des défauts causés par la progérine est due au fait que les vaisseaux sont soumis à des stress mécaniques importants à cause du flux sanguin qui sensibiliseraient préférentiellement ces cellules. Contrairement aux autres modèles animaux, les souris G608G ne meurent pas prématurément rendant inadaptée l'évaluation de traitement potentiel de la progeria sur ce modèle. Les auteurs ne précisent pas l'âge moyen de leur décès mais décrivent des caractéristiques phénotypiques sur des souris à vingt mois de vie (Varga et al., 2006).

II.3.2.4 Lignée de souris qui présente la mutation G609G

Bien que les modèles précédemment décrits reproduisent certaines des altérations rencontrées dans la progéria, aucun d'entre eux n'a montré être capable de récapituler complètement la forme humaine de la pathologie. En 2011, l'équipe espagnole de Carlos López-Otín a générée des lignées murines homozygotes et hétérozygotes portant la mutation c.1827C>T ; p.Gly609Gly, équivalent de la mutation c.1824C>T ; p.Gly608Gly chez l'homme (Osorio et al., 2011; Villa-Bellosta et al., 2013). La lignée de souris hétérozygotes est moins atteinte que la lignée homozygote, mais toutes deux reprennent l'ensemble des caractéristiques cliniques majeures des patients atteints par la progéria. Alors qu'elles semblent normales jusqu'à trois semaines de vies, les souris *Lmna*^{G609G} sont infertiles et perdent progressivement du poids ainsi que leur graisse sous cutanée. Les souris présentent des déformations osseuses avec notamment une posture anormale associée à un lordocyphe cervicothoracique, une réduction de la densité osseuse et une augmentation de la porosité des os longs (Osorio et al., 2011). D'un point de vue sanguin, ces souris présentent une hypoglycémie extrême à partir de trois mois, liée à une diminution de l'IGF-1 (Insuline Growth Factor 1), de l'insuline et de la leptine et une augmentation concomitante d'adiponectine et de GH (Growth Hormone). D'autre part, les coupes de tissus de ces souris montrent une déformation majeure des noyaux, une augmentation des cassures double brin de l'ADN qui provoque une augmentation de p53 et d'ATM. Enfin, une sénescence prématurée est observée dans le foie et les reins des souris dès trois mois. Les souris souffrent d'importantes altérations cardiovasculaires qui ont été

caractérisées dans le détail (Osorio et al., 2011; Villa-Bellosta et al., 2013). Ainsi, alors que leur pression artérielle est normale, elles développent une bradycardie entre neuf et quinze semaines due à une défaillance dans la dépolarisation ventriculaire. La perte accrue de VSMCs observée chez les souris *Lmna*^{G60G} n'est par ailleurs détectée que dans les régions de la branche aortique soumise à de forts stress hémodynamiques chez les souris *Lmna*^{G609G} (Osorio et al., 2011). Chez les souris hétérozygotes, une calcification excessive de l'aorte associée à une hyperphosphatémie et une hypercalcémie, a été mise en évidence (Villa-Bellosta et al., 2013). Les VSMCs extraites de l'artère synthétisent moins d'ATP et présentent une fonction mitochondriale altérée. De plus, ces VSMCs expriment de manière excessive BMP2 et Runx2, deux marqueurs représentatifs de la calcification vasculaire. Ces données ont été corrélées à une augmentation de l'activité phosphatase deux fois plus forte et une diminution de la synthèse de pyrophosphate inorganique dans les cellules mutées par rapport aux cellules contrôles (Villa-Bellosta et al., 2013). Ces souris finissent par mourir prématurément vers 103 jours en comparaison avec les souris sauvages qui vivent jusqu'à deux ans (Osorio et al., 2011; Villa-Bellosta et al., 2013).

II.3.2.5 Lignées de souris permettant de comprendre la physiopathologie cutanée

II.3.2.5.1 Lignée *Tetop-LA*^{G608G} inductible

En 2008, l'équipe de Maria Eriksson a construit, un modèle de souris exprimant la lamine A et la progérine de manière inductible (Sagelius et al., 2008). Le minigène utilisé comporte la mutation 1824C>T humaine et son expression est ciblée dans les cellules qui expriment la kératine 5 grâce au croisement des lignées transgéniques tetop- LA^{G608G} et K5tTA (Diamond, 2000). Ainsi, cette construction n'est exprimée que dans les kératinocytes interfolliculaires épidermiques et les follicules des poils en absence de doxycycline (Sagelius et al., 2008). Cette lignée bitransgénique présente une fibrose dermique, un développement incomplet des glandes sébacées ainsi qu'une graisse sous cutanée. Par ailleurs, les animaux développent des troubles qui affectent d'autres tissus avec des problèmes dentaires, un pelage plus fin avec une diminution du nombre de follicules, un retard de croissance (expliqué par la diminution de la prise alimentaire causée par les problèmes dentaires) et une mort prématurée (Sagelius et al., 2008).

Dans le même modèle, la même équipe décrit que ces symptômes cutanés sont réversibles. En effet, lors de l'extinction du transgène par traitement à la doxycycline, les défauts cutanés commencent à diminuer après quatre semaines sans expression de progérine. Au bout de treize semaines, la peau des souris transgéniques est identique à la peau de souris sauvages (Sagelius et al., 2008). Ces résultats montrent que les dommages causés par la progérine ne sont pas irréversibles et insinuent que si un traitement contre la progéria était identifié, il pourrait être donné aux patients avec une chance de rectifier les effets néfastes de la progérine.

II.3.2.5.2 Lignée K14-progérine

La même année, une lignée transgénique de souris qui exprime la progérine humaine sous le contrôle du promoteur de la kératine 14 a été générée (Wang et al., 2008). Ce transgène est exprimé de manière sélective dans les mêmes tissus que le transgène Tetop-LA^{G608G} inductible. Les kératinocytes issus de ces souris, tout comme les kératinocytes observés sur les coupes de peau de souris, présentent, à plus de 80 %, des anomalies nucléaires typiques caractérisées par une augmentation de la surface du noyau de par les multiples anomalies de structures formées. Cependant, l'épiderme de ces souris ne présente pas de diminution de follicules pileux ou d'altération de la qualité du pelage ni de ralentissement de la cicatrisation comme le démontre le modèle de Maria Eriksson (Rosengardten et al., 2011; Wang et al., 2008).

II.3.2.6 Lignées de souris permettant de comprendre la maturation de la prélamine A

La découverte du lien entre la maturation de la prélamine A et les syndromes progéroïdes conduit à poser la question du rôle du groupement farnésyl greffé sur la prélamine A et de l'importance de la maturation de la lamine A (Capell and Collins, 2006; Capell et al., 2005). Ainsi, un certain nombre d'études suggèrent que cette chaîne hydrophobe soit un élément clé pour l'accrochage de la protéine à la membrane interne du noyau (Hennekes and Nigg, 1994; Sinensky et al., 1994). De manière surprenante, la prélamine A non farnésylée est localisée en périphérie de l'enveloppe nucléaire de manière identique à la lamine A mature (Davies et al., 2010; Lee et al., 2010). Ainsi, il semblerait que l'incorporation de prélamine A à la lamine nucléaire ne soit pas dépendante de l'état farnésylé (transitoire ou permanent) de la prélamine A. Alors que les souris qui n'expriment que la prélamine A *Lmna^{PLAO}* (PLAO : Prelamin A

Only) par délétion de l'intron 10, présentent un phénotype normal, cette prélamine A non farnésylée entraîne, chez ces souris mutées ($Lmna^{nPLAO}$), une cardiomyopathie mais sans syndrome progéroïde (Davies et al., 2010). De plus, des souris qui expriment une progérine non farnésylée ($Lmna^{nHG/+}$) présentent un phénotype pathologique progéria-like. Dans le but d'explorer plus avant l'importance des étapes de maturation de la lamine A, l'équipe de Coffinier a générée une lignée de souris capable de synthétiser la lamine A mature sans qu'elle ait besoin de subir les quatre étapes de maturation post-traductionnelle ($Lmna^{LAO/LAO}$) (LAO : Lamin A Only) (Coffinier et al., 2010). Bien que les fibroblastes isolés de ces souris présentent une déformation de leur enveloppe nucléaire, ces animaux présentent une courbe de poids normale ainsi qu'une courbe de survie physiologiquement identique à des souris saines (Coffinier et al., 2010). D'après ces résultats, il semblerait que les étapes de maturation de la prélamine A, pourtant fidèlement conservée au cours de l'évolution chez les vertébrés, ne soit pas indispensable à la bonne fonctionnalité de la lamine A mature. Cette même étude suggère que la lamine C n'est pas indispensable dans le développement et le fonctionnement des tissus de souris lorsque la lamine A mature est présente (Coffinier et al., 2010). A l'inverse, les souris $Lmna^{LCO/LCO}$ (LCO : Lamin C Only) ne produisent que de la lamine C sans lamine A et sans prélamine A grâce à la délétion de 150 nucléotides dans l'exon 11 et tout l'intron 11. Ces souris ne présentent pas de phénotype pathologique et une très faible altération de l'architecture nucléaire (Fong et al., 2006). Bien que la perte totale de lamines de type A soit létale pour les souris $Lmna^{-/-}$ au bout de seulement huit semaines de vie (Sullivan et al., 1999), l'ensemble de ces résultats suggèrent que, chez la souris du moins, indépendamment, ni la lamine A ni la lamine C sont indispensables.

II.4 Approches thérapeutiques

Bien que différentes stratégies thérapeutiques aient été évaluées cliniquement, il n'existe à ce jour aucun traitement curatif de la progeria. Actuellement, indépendamment des essais cliniques en cours d'investigation, la prise en charge des patients consiste à l'utilisation de traitements symptomatiques ponctuels, à la gestion de la douleur par des antalgiques, un régime alimentaire contrôlé et un suivi psychologique des patients eux-mêmes ainsi que de leur famille.

II.4.1 Les inhibiteurs de la farnésyltransférase et le ZoPra

II.4.1.1 Stratégies d'inhibition de la farnésylation

Les défauts associés à la progéria sont, dans la majorité des cas, associés à l'accumulation du précurseur farnésylé de la lamine A, la progérine (Glynn and Glover, 2005; Goldman et al., 2004). Le groupe de Carlos López-Otín a montré dès 2002 que le modèle murin *Zmpste24*^{-/-} dans lequel la prélamine A farnésylée s'accumulait, présentait un phénotype de vieillissement accéléré proche de la progeria (Pendas et al., 2002). Par la suite, en 2004, Fong et al. ont montré que les souris *Zmpste24*^{-/-}, qui possèdent un allèle normal de la lamine A (*Zmpste24*^{-/-} *Lmna*^{+/+}) présentaient moins de prélamine A farnésylée et une amélioration significative de leurs symptômes (Fong et al., 2004). C'est ainsi que par la suite différentes équipes ont cherché à bloquer, de manière systémique, la farnésylation de la prélamine A, estimant que cela pourrait être un traitement potentiel de la progéria.

Les premiers travaux dans ce sens ont été rapportés par Yang et al. démontrant que l'utilisation d'inhibiteur de la farnésyltransférase (FTI) pouvait restaurer les défauts de structuration de l'enveloppe nucléaire (Yang et al., 2005). Suite à ces résultats encourageants, les groupes de Susan Michaelis (Mallampalli, 2005), de Francis Colins (Capell et al., 2005) et de Thomas Glover (Glynn and Glover, 2005) ont conduit des expérimentations complémentaires démontrant l'intérêt de cette stratégie sur des fibroblastes issus de patients atteints par la progéria ainsi que sur des cellules surexprimant la progérine. Dans la continuité de ces travaux, l'équipe de Loren Fong a démontré que l'utilisation des FTIs avait un impact bénéfique sur des souris *Zmpste24*^{-/-} (Fong et al., 2006) démontrant une amélioration de certains phénotypes pathologiques après traitement. Par la suite d'autres études ont été menées afin d'explorer le potentiel des FTIs pour le traitement de la progéria (Sagelius et al., 2008; Wang et al., 2008; Yang et al., 2008; Yang et al., 2006).

Cependant, bien que ces FTIs semblent efficaces, tout du moins sur certains paramètres, cette stratégie présente cependant des limites qui peuvent être expliquées par le fait qu'ils n'inhibent que la farnésylation et pas la géanylgeanyloration de la progérine (Rusinol and Sinensky, 2006) (Figure 11). C'est ainsi, qu'en 2008, une autre stratégie thérapeutique utilisant la combinaison d'une statine et d'un aminobisphosphonate a été testée sur des fibroblastes issus de patients atteints de progéria et chez des souris *Zmpste24*^{-/-} (Varela et al., 2008). Capable d'inhiber à la fois la farnésylation et la géanylgeanyloration de la prélamine A,

cette association a permis l'amélioration de la pathogénèse de la maladie ainsi qu'un allongement de la durée de vie des souris (Varela et al., 2008).

Les FTIs, des statines et des aminobisphosphonates ayant déjà reçu des autorisations de mise sur le marché pour d'autres indications, des médicaments appartenant à ces classes thérapeutiques ont rapidement pu être testés cliniquement chez les patients atteints de progéria.

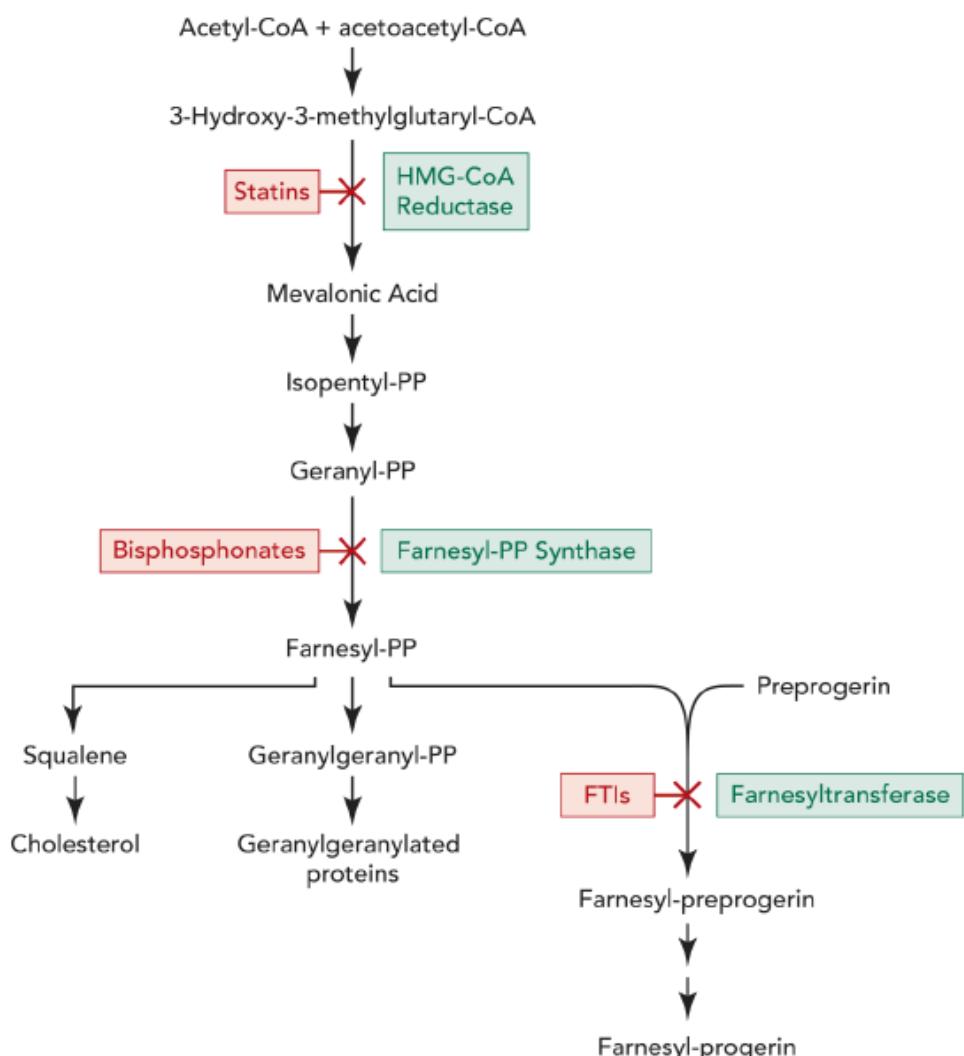


Figure 11 : Voie de synthèse du cholestérol ciblée dans les stratégies thérapeutiques anti-progéria

L'inhibition de la farnésylation de la progérine peut se faire soit en inhibant la farnésyltransférase par l'utilisation de FTIs soit en inhibant la farnésylpyrophosphate synthase par des aminobisphosphonates soit plus en amont en inhibant l'HMG-CoA réductase par les statines (<http://www.progeriaresearch.org/assets/files/pdf/PRF %20By %20the %20Numbers %20for %20Website.pdf>).

II.4.1.2 Les inhibiteurs de la farnésyltransférase

II.4.1.2.1 Généralités

Les inhibiteurs de la farnésyltransférase bloquent l'action de l'enzyme qui permet la synthèse de chaîne farnésyl à partir de farnésyl pyrophosphate. Initialement, les inhibiteurs de la farnésyltransférase ont été générés afin de bloquer la farnésylation de la protéine G monomérique Ras avec pour objectif de diminuer la progression tumorale (Ferguson et al., 2005; Sebti and Der, 2003). Secondairement, ils ont été utilisés dans la malaria pour leur capacité à inhiber la farnésyltransférase de *plasmodium falciparum* (Eastman et al., 2006; Gupta and Prabhakar, 2008; Nallan et al., 2005; Van Voorhis et al., 2007). Dès 2005, leur repositionnement pour le traitement de la progéria a été investigué par l'équipe de Loren Fong sur des cellules HeLa, HEK293 et NIH 3T3 qui expriment la progérine (Yang et al., 2005).

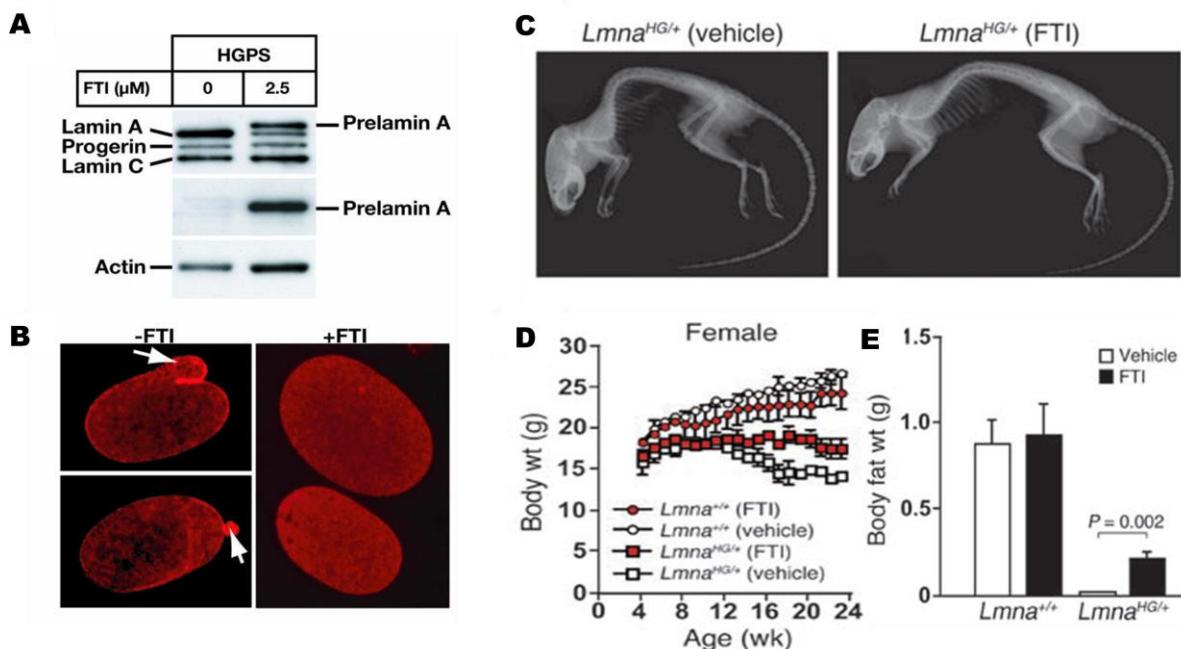


Figure 12 : Effet des inhibiteurs de la farnésyltransférase *in vitro* et *in vivo*

Un traitement au FTI provoque A) l'accumulation de prélamine A et la diminution de lamine A, B) la restauration d'une forme régulière de l'enveloppe nucléaire, C) une amélioration des atteintes ostéoarticulaires et notamment des déformations osseuses, D) une prise de poids des souris, E) une augmentation des graisses sous-cutanées adapté de (Yang et al., 2005).

Il est cependant difficile d'avoir une idée globale de l'utilisation des FTIs dans la progéria car les expériences réalisées sur cette classe médicamenteuse ont été réalisées sur des modèles cellulaires ou murins différents, avec des molécules différentes (tipifarnib, lonafarnib, FTI-

277, BMS214662, PD169541, PB43...) et des posologies dissemblables. Cependant, cette classe de médicaments permet de diminuer les défauts de structuration de l'enveloppe nucléaire classiquement observés dans la progéria (Figure 12). *In vivo*, ces molécules sont capables d'améliorer un certain nombre de symptômes notamment ostéoarticulaires (diminution des fractures des côtes, augmentation de la minéralisation osseuse) (Yang et al., 2006), mais également cardio-vasculaires (diminution de la perte des VSMCs, diminution de l'accumulation de protéoglycane) même si l'aspect fonctionnel n'a jamais été développé (Capell et al., 2008). De même, ces FTIs entraînent une augmentation de la prise de poids associée à l'augmentation du tissu adipeux et un allongement de la durée de vie des souris (Yang et al., 2006) (Figure 12).

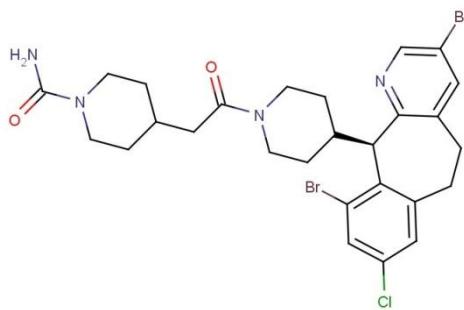


Figure 13 : Formule chimique du lonafarnib

L'inconvénient majeur de ce type de traitement est qu'il n'est pas spécifique de la progérine. Les FTIs diminuent également le niveau d'expression de la lamine A sauvage, augmentent le niveau de prélamine A non farnésylée et affectent la maturation post-traductionnelle d'une douzaine de protéines farnésylées (Resh, 2012). D'autre part, les effets pharmacologiques des FTIs sont freinés par le fait qu'ils n'inhibent pas la géranylgeranylation alternative de la progérine (Varela et al., 2008). Enfin, différentes études ont démontré que, outre leur effet sur la diminution de la prolifération cellulaire due notamment à l'inhibition de la farnésylation de Ras, ces FTIs ont une action inhibitrice du protéasome entraînant un arrêt du cycle cellulaire en phase G1 (Efuet and Keyomarsi, 2006).

II.4.1.2.2 Etude clinique du lonafarnib

Entre le mois de mai 2007 et octobre 2009, une étude clinique monocentrique de phase II a été menée à l'hôpital Boston enfants malades (NCT00425607) (Gordon et al., 2012). Dans

chez cette étude, vingt-six patients atteints de progéria classique venant de seize pays différents, allant de trois à seize ans, ont été traités. Dans cette étude, le lonafarnib (Figure 13), un inhibiteur de la farnésyltransférase (Kieran et al., 2007) a été administré aux patients par voie orale à la dose de $115\text{mg}/\text{m}^2$, durant les quatre premiers mois de l'essai, puis à $150\text{ mg}/\text{m}^2$ jusqu'à la fin. Le critère de jugement principal de cette étude a été la prise de poids des patients. N'ayant pas de référentiel commun, la prise de poids de chaque patient a été déterminée par pesée hebdomadaire, l'année qui a précédé le début de l'essai. Ainsi, le gain de poids de chaque enfant a été comparé à leur propre courbe pondérale de l'année précédente. Ainsi, les résultats de cette étude démontrent qu'au bout de deux ans de traitement, neuf patients sur les vingt six ont pris du poids, dix ont eu un poids stable et six ont présenté une diminution de poids (Figure 14). La réponse au traitement sur ce paramètre n'a donc été que de 34 %.

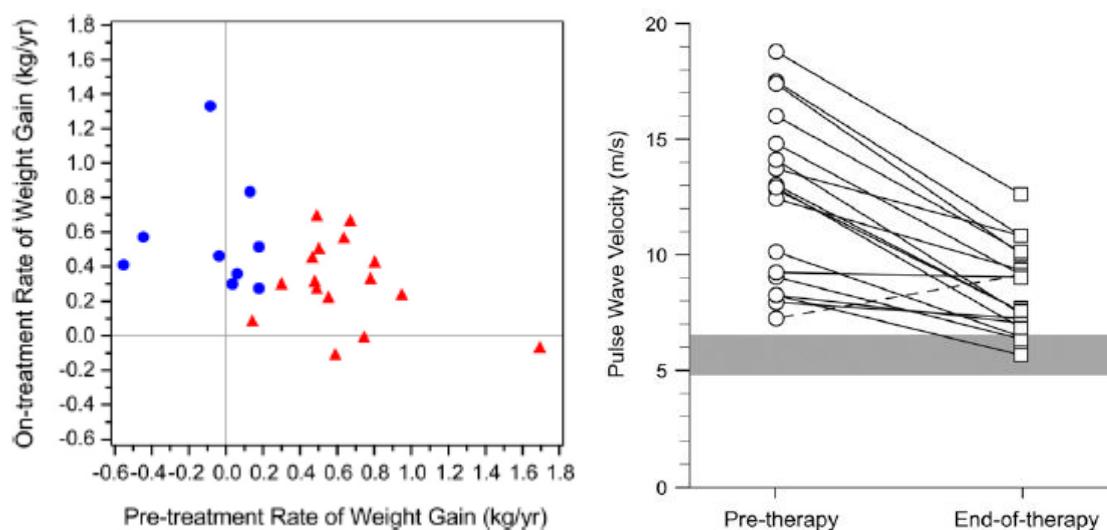


Figure 14 : Le lonafarnib permet une amélioration de certains symptômes chez les patients atteints de progéria typique

Le diagramme de gauche représente l'effet du lonafarnib sur la prise de poids des patients. Le graphique de droite illustre l'effet du lonafarnib sur la vitesse de propagation du pouls (Gordon et al., 2012).

Parmi les critères de jugement secondaires, les changements cardiovasculaires ont été pris en considération. La mesure de la rigidité artérielle a été évaluée en premier lieu par la vitesse de propagation du pouls sur dix-huit patients (Figure 14). Les résultats de ces travaux ont démontré que ce paramètre était diminué de 35 % à la fin du traitement. En second lieu, le manque d'élasticité a été apprécié par la mesure de la densité de la paroi artérielle, avec une

différence faite entre les différentes couches anatomiques de cette paroi. La densité moyenne de l'intima média et l'adventis lumineuse mesurée sur vingt-deux patients a été diminuée au cours du traitement. Comme précédemment discuté, une des principales caractéristiques pathologiques des patients est l'atteinte osseuse. Cette étude s'est donc intéressée à l'effet du traitement au lonafarnib sur la rigidité squelettique ainsi qu'à la densité minérale osseuse. Ainsi les résultats démontrent que parmi les vingt-cinq patients testés à la fin du traitement, seul onze patients ont présenté une augmentation de la rigidité squelettique de plus de 3 % alors que dix patients n'ont pas présenté de changement et quatre ont même eu une diminution. Le gain de densité osseuse a, lui aussi, été faible avec une augmentation supérieure ou égale à 3 % chez dix-neuf patients sur la durée totale du traitement. Enfin, bien que les auteurs de cette étude aient montré que ce critère ne faisait pas défaut chez les patients, la mesure de leur capacité auditive basse fréquence a révélé une amélioration de 10 dB en moyenne sur huit patients sur dix-huit (Gordon et al., 2012).

Cette étude a toutefois mis en évidence que de nombreux symptômes caractéristiques n'étaient pas améliorés, notamment la fréquence des anomalies de l'ECG, les rétractions articulaires, les anomalies dentaires, le niveau de leptine sérique, le taux de résistance à l'insuline et la pousse de cheveux. Plus important encore, un grand nombre d'effets indésirables ont été rapportés. Alors que la majorité des patients ont présenté une diarrhée, des vomissements, une fatigue, une diminution des polynucléaires neurotrophiles et une diminution du bicarbonate sérique de grade 1 qui les ont affaiblis, certains ont également présenté des effets secondaires de grade 3 et 4. Un patient a présenté une fièvre d'importance grade 4, et concernant la toxicité de grade 3, trois patients ont souffert de diarrhées et de vomissements s'accompagnant de déshydratation majeure, mais également d'une élévation des enzymes hépatiques ALAT et ASAT chez un patient et une hypokaliémie a menacé la fonction cardiaque de quatre patients. En conclusion de cette étude, le lonafarnib a conduit à l'amélioration de certains symptômes de manière modérée mais en contrepartie d'effets adverses majeurs, notamment dus à des doses élevées de FTIs. La réponse clinique est difficilement corrélée avec le marqueur de pharmacodynamie correspondant au niveau d'inhibition de la farnésylation de HDJ2. Ce traitement apparaît donc comme un traitement symptomatique partiel mais en aucun cas un traitement curatif. Suite à cet essai clinique, les auteurs de cette étude ont entrepris de combiner le traitement à base de lonafarnib au ZoPra pour tenter de potentialiser les effets des deux thérapeutiques voire de diminuer les doses de FTI qui présentent une toxicité indéniable. Cette étude pilote de phase II a débuté en mars

2009 et est menée par la même équipe (NCT00916747). Les résultats n'ont pour l'instant pas été communiqués.

II.4.1.3 Combinaison statine aminobisphosphonate

En 2008, des travaux parallèles menés par l'équipe de Carlos López-Otín conjointement avec celle de Nicolas Levy, ont eu pour objectif le développement d'une nouvelle stratégie thérapeutique permettant d'inhiber l'ensemble du processus de prénylation (Varela et al., 2008). Ces chercheurs ont ainsi démontré que suite au traitement avec un FTI - le FTI-277 - les fibroblastes de patients atteints de progéria accumulaient une forme géranylgeranylée de la progérine (Varela et al., 2008). En conséquence, ils ont cherché des molécules capables d'inhiber à la fois la farnésylation et la géranylgerylation. C'est ainsi qu'ils ont mis en évidence deux familles de molécules : les statines, connues pour leur capacité à inhiber l'HMG-CoA réductase et la famille des aminobisphosphonates, décrits pour leur action sur la farnélypyrophosphate synthase (Konstantinopoulos and Papavassiliou, 2007). En plus de leur action documentée sur la prénylation des protéines, les statines sont couramment indiquées dans les dyslipidémies pour abaisser la concentration sanguine de LDL-cholestérol et ainsi réduire l'athérosclérose (Lim et al., 2012). De même, les aminobisphosphonates ont été développés dans l'ostéoporose pour favoriser la reminéralisation osseuse (McClung et al., 2013), et sont également utilisés à la dose à laquelle ils inhibent la résorption osseuse, pour diminuer la calcification aortique observée dans l'athérosclérose (Lomashvili et al., 2009; Price et al., 2001). Or ces deux symptômes sont également présents chez les patients atteints par la progéria, justifiant d'autant plus l'intérêt de tester l'action pleiotropique de ces molécules dans cette pathologie. Ces molécules disposant d'autorisations de mise sur le marché, sont bien documentées, aussi bien en termes d'effets indésirables que pharmacologiques et leur accessibilité est aisée. De plus, une telle combinaison a déjà été testée à plusieurs reprises, à la fois *in vitro*, *in vivo* et cliniquement chez la femme, apportant des indications sur la toxicité de cette association et la synergie d'action engendrée, bien que les doses testées soient plus importantes et que les indications soient différentes (action anti-proliférative dans les cellules cancéreuses, évaluation d'un possible effet protecteur de la fluvastatin par rapport à la phase aiguë de réponse au zolédronate) (Issat et al., 2007; Schmidmaier et al., 2006; Thompson et al., 2011; Wang et al., 2011).

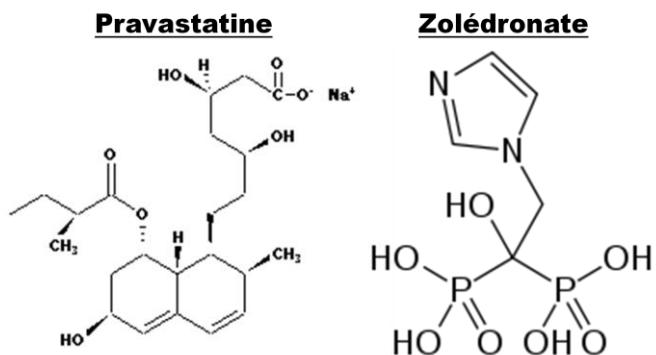


Figure 15 : Formule chimique de la pravastatine et du zolédonate

La pravastatine et l'acide zolédonique (combinaison nommée ZoPra) (Figure 15) ont été choisis pour réaliser cette étude. Après avoir prouvé l'efficacité de ces molécules sur la prénylation de la progérine, les résultats de ces travaux ont révélé qu'ils amélioraient l'architecture nucléaire (Figure 16). Également, la pravastatine et le zolédonate induisaient une accumulation nucléaire de la prélamine A non farnésylée et diminuaient les cassures doubles brin de l'ADN (Varela et al., 2008). Les auteurs ont ensuite évalué l'efficacité de leur combinaison sur un modèle progéroïde *Zmpste24^{-/-}* démontrant tout d'abord que la pravastatine et le zolédonate diminuaient l'expression de toutes les cibles de p53, donnant une information sur l'action anti-sénescence du traitement. De surcroit, une amélioration du phénotype ostéoarticulaire a ensuite été mise en évidence avec une réduction du degré de cyphose des souris et un accroissement de la densité et de la minéralisation osseuse. Cette étude a, de même, indiqué que le traitement au ZoPra augmentait la prise de poids des souris (Figure 16), provoquait une poussée des poils et allongeait leur durée de vie de manière conséquente (Varela et al., 2008) (Figure 16).

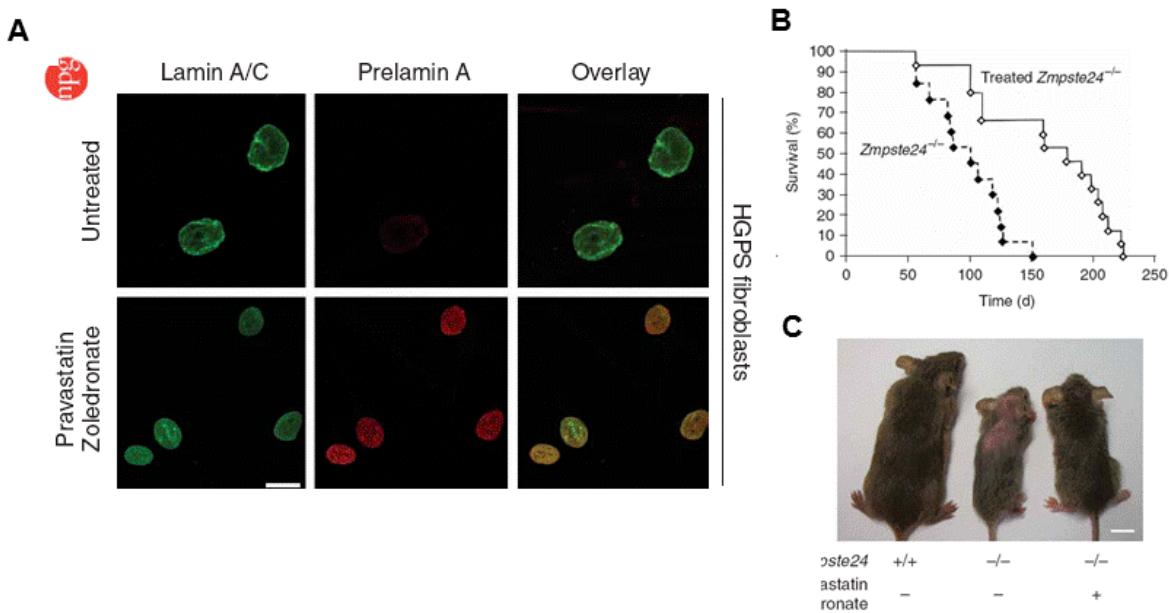


Figure 16 : Effet du ZoPra sur les phénotypes pathologiques de la progéria

Le panel de gauche représente un immunomarquage de la lamine A et de la prélamine A dans des fibroblastes progéria traités et non traités au ZoPra. Le graphique en haut à droite est la courbe de survie des souris *Zmpste24*^{-/-} obtenue après traitement au ZoPra. La photographie en bas à droite représente des souris *Zmpste24*^{+/+}, *Zmpste24*^{-/-} traitées ou pas au ZoPra (Varela et al., 2008).

Face à ces résultats encourageants, un essai clinique ouvert de phase II a débuté en 2008 afin de tester la tolérance et l'efficacité de la combinaison pravastatine et acide zolédonique chez les patients atteints de progéria classique (NCT00731016). La pravastatine (Vasten[®]) a été administrée par voie orale à la dose de 10 mg/jour et l'acide zolédonique (Zometa[®]) en trois perfusions intraveineuses tous les six mois respectivement à 0,0125 mg/kg, 0,025 mg/kg et 0,05 mg/kg la première année de traitement, puis trimestriellement la seconde année à la dose de 0,05mg/kg. Onze patients ont été inclus dans cet essai afin d'évaluer les critères principaux de jugement sur la prise de poids des patients et leur métabolisme osseux. Afin de réduire les éventuelles hypocalcémies provoquées par le zolédonate, les patients ont été supplémentés en calcium et vitamine D3. L'essai clinique s'est terminé en mars de cette année.

Bien que les résultats n'aient pas encore été publiés, il est possible de se référer à la littérature et notamment aux études cliniques réalisées avec ces molécules en pédiatrie afin prédire la tolérance de ce traitement. En 2011, Cadnapaphornchai et al. ont évalué l'effet de la pravastatine à 20 mg/jour pour les enfants de 8 à 12 ans et 40 mg/jour pour les enfants de plus de 13 ans dans la maladie polykystique rénale autosomique dominante (Cadnapaphornchai et al., 2011). Dans cette étude, aucun effet indésirable n'a été rapportée, ni douleurs musculaires,

ni rhabdomyolyse, pas d'élévation des transaminases. Concernant les bisphosphonates, un enfant de 6 mois souffrant d'une calcification de l'artère pulmonaire bilatérale a été traitée par le pamidronate à la dose de 0,25 mg/kg/jour, 3 jours consécutifs toutes les semaines jusqu'à la 6^{ème} semaine. Dans ce cas, aucun effet indésirable n'a également été rapporté (Cha et al., 2013). D'autres cas cliniques de traitements de courte durée ont été rapportés avec des bisphosphonates ne décrivant pas non plus d'effets indésirables associés (Galletti et al., 2011; Ramjan et al., 2009). Cependant, bien que les bisphosphonates semblent être bien tolérés chez l'enfant, le cas d'un traitement au long court chez l'adolescent, a révélé un allongement de la métaphyse des os longs et une minéralisation du cartilage de croissance qui pourrait, en conséquence, nuire à la croissance osseuse des patients progéria (Rauch et al., 2009). D'autre part, une étude réalisée sur des souris qui n'expriment pas l'apolipoprotéine E a démontré que les bisphosphonates induisaient une inflammation ainsi qu'une rupture de la plaque d'athérome (Shimshi et al., 2005) et des effets indésirables sur les os (Lomashvili et al., 2009; Price et al., 2004). Par ailleurs, un des effets indésirables attribués aux aminobisphosphonates est le risque de survenue d'ostéonécrose de la mâchoire qui peut éventuellement limiter leur utilisation (Beninati et al., 2013).

II.4.2 Nouvelles pistes thérapeutiques envisagées

II.4.2.1 Les oligonucléotides morpholinos anti-sens

Une alternative thérapeutique innovante a récemment été apportée par le groupe de Carlos López-Otín en collaboration avec celui de Nicolas Lévy. Cette stratégie a pour objectif de bloquer la production de progerin via l'utilisation d'ARN anti-sens (Osorio et al., 2011). Cette technique repose sur l'utilisation d'oligonucléotides morpholinos anti-sens, qui, en s'hybridant sur la séquence nucléotidique de la lamine A, créent un encombrement stérique sur le site d'épissage (Figure 17). De cette manière, les interactions entre le pré-ARN messager et les facteurs d'épissages – tels que les protéines de liaison à l'ARN, les petits ARNs nucléaires et les autres constituant du spliceosome- sont impossibles (Kole et al., 2012). Contrairement à d'autres techniques basées sur l'utilisation ARN anti-sens, cette méthode permet de bloquer l'épissage anormal de la lamine A sans affecter l'expression globale du gène *LMNA*. D'un point de vue structural, les morpholinos sont constitués de bases azotées fixées sur des cycles morpholines à la place de désoxyribooses, qui sont liés entre eux

par des fonctions phosphorodiamides au lieu des phosphates. Cette particularité les rend stables et ils ne peuvent pas être dégradés par les ribonucléases (Summerton, 1999).

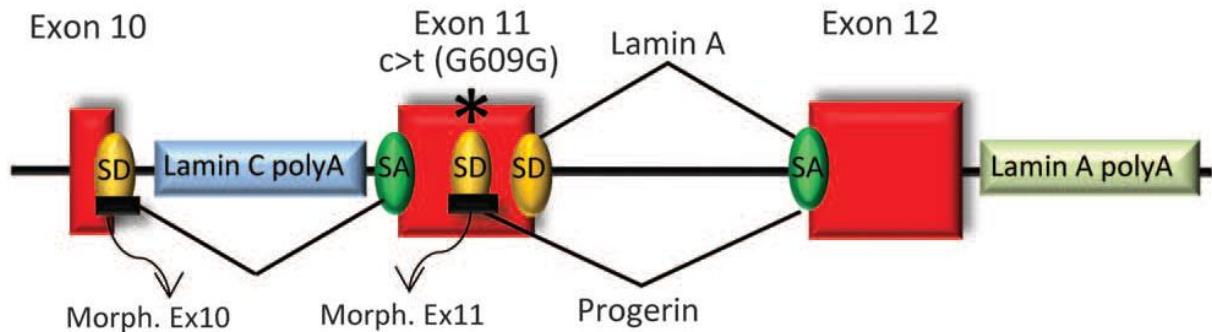


Figure 17 : Représentation schématique de la stratégie de modulation de l'épissage alternatif du gène LMNA, basée sur l'utilisation d'oligonucléotides morpholinos

Les rectangles rouges représentent les exons et les traits noirs les introns. Deux séquences nucléotidiques ont été créées, l'une se fixe sur l'exon 10 et l'autre se fixe sur l'exon 11 (Osorio et al., 2011).

Dans une première étude datant de 2005, l'équipe de Tom Misteli avait déjà développé une séquence de 25 nucléotides qui ciblait la mutation au niveau de l'exon 11 de ce type, avec pour objectif de bloquer l'accès au spliceosome (Scaffidi and Misteli, 2005). Cette construction avait été introduite dans des fibroblastes dermiques et des lymphocytes B de patients montrant une extinction de la progérine sans affecter le niveau d'expression de la lamine A mais augmentant légèrement celle de la lamine C. De manière intéressante, cet ARN anti-sens a permis de diminuer des anomalies nucléaires à plus de 90 %, ainsi qu'une restauration de l'expression d'un certain nombre de gènes dérégulés notamment la MMP3, MMP14, CCL8 et la TIMP3 (Scaffidi and Misteli, 2005).

Sur le même principe, plus récemment, deux séquences de 25 nucléotides morpholinos ont été décrites, le MmEx10 capable de se lier au site donneur d'épissage de l'exon 10 et le MmEx11 capable de se fixer sur la séquence contenant la mutation c.1827C>T au niveau de l'exon 11 (Osorio et al., 2011). L'efficacité de ces deux constructions a été évaluée seule ou en combinaison, montrant un effet plus importante lorsque les deux oligonucléotides morpholinos étaient associés. Ainsi, les études réalisées sur les fibroblastes issus des souris *Lmna*^{G609G/G609G}, ont révélé que ce traitement induisait une diminution dose dépendante de la progérine parvenant à un niveau non détectable à la plus forte concentration testée.

L'administration chez l'animal a également montré une diminution de progérine dans tous les tissus testés à l'exception du tissu musculaire squelettique. Par ailleurs les auteurs de cette étude ont démontré que le traitement induisait une augmentation de la glycémie et une diminution de l'involution du thymus et de la rate. La valence bénéfique de ce traitement est soulignée par l'augmentation de la prise de poids des souris associée à un épaississement de la graisse sous cutanée. L'allongement de la durée de vie des souris est cependant modérée passant de 111 jours en moyenne à 155 jours avec un maximum à 190 jours (Osorio et al., 2011).

Dans le but de transposer cette thérapie à l'homme, les auteurs ont par la suite modifié la séquence oligonucléotidique pour cibler la mutation humaine c.1824C>T ; p.Gly609Gly démontrant son efficacité *in vitro* sur des fibroblastes de patients atteints de progeria. La difficulté majeure liée à l'utilisation de cette stratégie est cependant le développement d'une technologie d'administration qui permette la distribution systémique des anti-sens, sans toxicité (Dirin and Winkler, 2013; Said Hassane et al., 2010).

II.4.2.2 La rapamycine

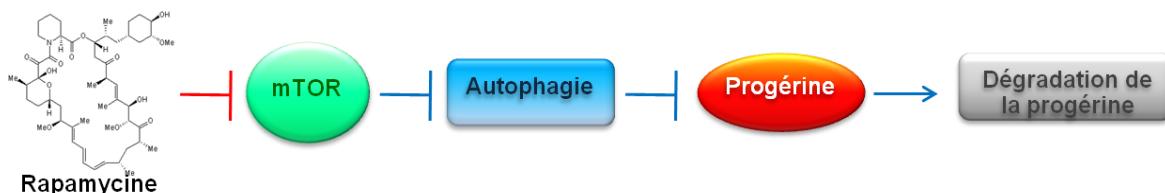


Figure 18 : Mécanisme d'action de la rapamycine sur la progérine

En inhibant mTOR, la rapamycine active l'autophagie. Ce processus de dégradation va prendre en charge l'élimination de la protéine mutée, diminuant son action délétère.

La rapamycine (Figure 18) est un antibiotique de la famille des macrolides, qui interagit avec un grand nombre de voies de signalisation, notamment en inhibant mTOR (mammalian Target Of Rapamycin) (Ryter et al., 2013). Ces dernières années, différentes études ont montré que le traitement à la rapamycine pouvait augmenter l'espérance de vie de levures, d'invertébrés et de certains mammifères (Bonawitz et al., 2007; Hansen et al., 2007; Harrison et al., 2009; Powers et al., 2006). Ainsi, en 2011, l'équipe de Francis Collins s'est intéressé à évaluer l'effet de la rapamycine sur des fibroblastes issus de patients atteints par la progeria.

Ces cellules ont été traitées à la forte dose de 680 μ M tous les jours pendant au minimum deux semaines et ce jusqu'à cent jours. La quantification des atteintes de l'enveloppe nucléaire révèle que dès dix jours de traitement, les noyaux récupèrent une morphologie identique à celle observée dans les fibroblastes contrôles (Figure 19). De manière intéressante, les auteurs ont montré que lorsque le traitement était réalisé sur des fibroblastes à haut passage, l'amélioration était identique, suggérant la possibilité de traiter la pathologie à des stades tardifs. Par ailleurs, la rapamycine permet de restaurer une distribution normale de H3K24me3, marqueur facultatif de l'hétérochromatine diminuée dans la progéria. Par ailleurs, cet immunosupresseur est capable de diminuer les cassures double brin de l'ADN comme le montre le nombre réduit de foci TP53BP1 (Tumor Protein p53-Binding Protein 1). Contrairement à ce qui était attendu, la prolifération des fibroblastes a été stimulée après soixante jours de traitement avec une augmentation du nombre de cellules en phase S et la sénescence a été ralentie comme en témoigne les marquages de la β -galactosidase. Parallèlement à ces observations, alors que la transcription de la progéride n'est pas altérée, il est fait état de la diminution de la progéride dans ces cellules après traitement (Cao et al., 2011) (Figure 19).

La rapamycine est connue pour stimuler le processus autophagique dans les cellules (Ryter et al., 2013). Dans cette étude, les auteurs ont ainsi pu mettre en relation la diminution de progéride avec une induction du processus d'autophagie. D'après les résultats de cette étude, lors d'un traitement à la rapamycine, la progéride est dégradée par le biais du processus de macroautophagique. Plusieurs éléments de preuve mènent à cette hypothèse. Tout d'abord, la progéride colocalise avec la protéine p62 liée aux chaînes polyubiquitylées reconnues par l'autophagosome. De plus, lorsque l'autophagie est inhibée, et ce à différents niveaux, la progéride augmente. En effet, l'inhibition de l'activité lysosomale par la bafilomycine, l'inhibition de la phosphatidyl-inositol-3-phosphate par la 3-méthyladenine et l'invalidation d'ATG7 provoquent, tous trois, une accumulation de la progéride dans les cellules traitées à la rapamycine (Cao et al., 2011).

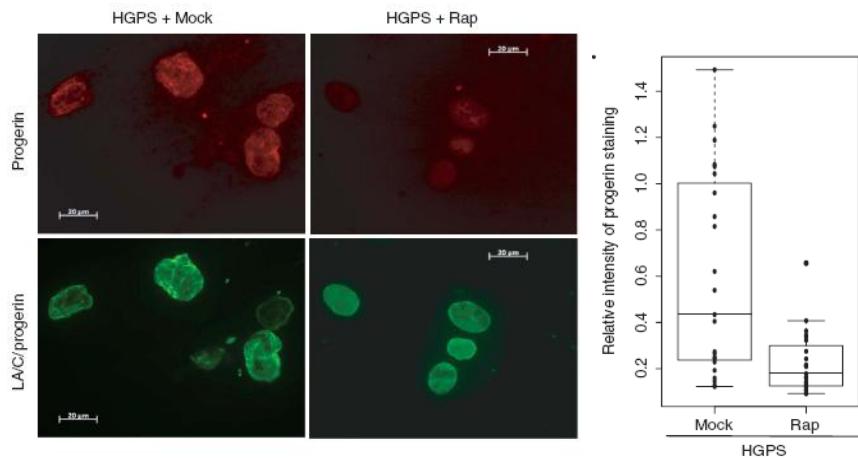


Figure 19 : Effet de la rapamycine sur la production de progéride

Le panel de gauche présente une immunofluorescence de la progéride et de la lamine A/C/progérine dans des fibroblastes progéria traités et non traités à la rapamycine. Le graphique de droite représente la mesure de l'intensité de fluorescence émise par un marquage anti-progéride dans des fibroblastes progéria traités et non traités à la rapamycine (Cao et al., 2011).

Face à ces données encourageantes, la PRF (Progeria Research Foundation) envisage de tester l'efficacité d'un analogue de la rapamycine, l'éverolimus, en quadrithérapie en association avec le lonafarnib et le ZoPra, chez les enfants atteints par la progéria. Cependant, à l'heure actuelle, aucun test *in vivo* n'a été réalisé pour prouver l'efficacité et l'absence de toxicité d'un tel traitement à l'échelle d'un organisme entier. Bien que ce ne soit pas un modèle pertinent de la progéria, l'efficacité de la rapamycine a été testée *in vivo* sur un modèle murin *Lmna*^{-/-}. Ces souris présentent une activation de la voie de signalisation de mTORC1 (mammalian Target Of Rapamycin Complex 1) dans les tissus cardiaques et musculaires squelettiques contribuant à la pathogénèse observée dans ce modèle (Ramos et al., 2012). Ainsi, cette étude a démontré que le traitement à la rapamycine contrecarrait les dysfonctionnements cardiaques et les altérations musculaires, allant jusqu'à augmenter l'espérance de vie des souris sans effets indésirables. Afin de diminuer la toxicité éventuelle de la rapamycine, les auteurs ont proposé de réduire la posologie soit en réduisant la fréquence d'administration à une fois par semaine soit en traitant sur une courte période d'une semaine. Ainsi, les souris traitées avec ce nouveau protocole ont également montré un allongement de la durée de vie, avec toutefois une efficacité moindre. Ces données indiquent que l'effet positif de la rapamycine est rapide après la première prise de traitement et est pérennisé (Ramos et al., 2012). Bien que ces résultats *in vitro* et *in vivo* soient encourageants les effets secondaires associés à ce type de traitement reste cependant majeurs et aucune

donnée ne permet à ce jour de prédire son effet sur des souris ou des patients atteints de progeria.

II.4.2.3 Le resvératrol

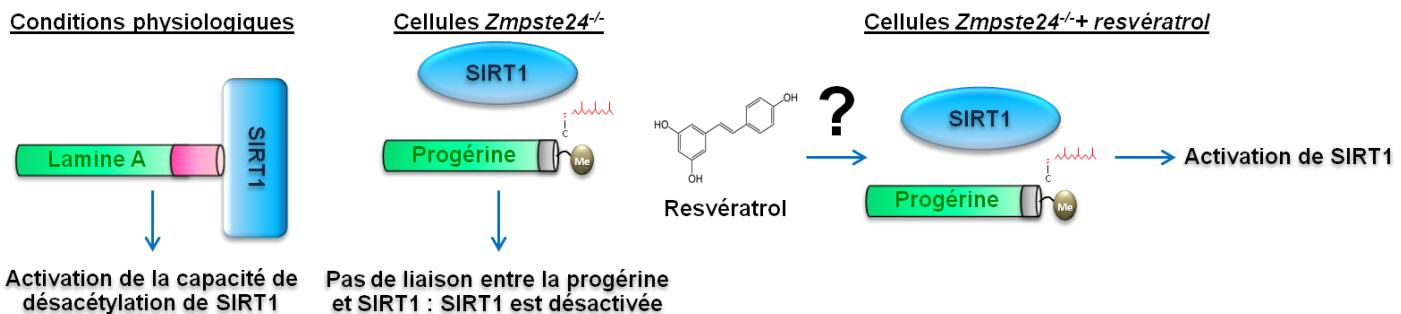


Figure 20 : Mécanisme d'action du resvératrol dans les cellules *Zmpste24*^{-/-}

Dans les conditions physiologiques, SIRT1 est lié à la lamine A ce qui active la capacité de désacétylation de SIRT1. Dans des cellules *Zmpste24*^{-/-}, SIRT1 ne peut pas se lier à progérine produite et reste désactivée. En traitant ces cellules au resvératrol, l'activité désacétylase de SIRT1 est restaurée. Le mécanisme qui permet son activation est inconnu.

Plus récemment, une nouvelle piste thérapeutique pour la progeria a été décrite en décembre 2012, avec pour cible la voie de régulation de SIRT1 (Liu et al., 2012a). SIRT1 est une désacétylase dépendant de NAD⁺, proche de Sir2 chez *Saccharomyces cerevisiae*, qui régule différentes voies métaboliques (Haigis and Sinclair, 2010). Elle est notamment capable de désacétyler des protéines de régulation de l'intégrité génomique, des protéines de l'inflammation, impliquées dans l'adipogénèse ou encore la résistance au stress, notamment Foxo3a, la catalase ou encore Gadd45 α (Brunet et al., 2004). Les auteurs de cette étude ont évalué l'impact d'un traitement au resvératrol (Figure 20), molécule appartenant à la classe des stibènes, en raison de sa capacité à activer SIRT1. Même si le lien direct entre ce polyphénol et cette enzyme n'a pas été établi (Baur, 2010), le resvératrol, via l'activation de SIRT1 est décrit comme une molécule capable d'augmenter la durée de vie des levures (Howitz et al., 2003), des vers (Wood et al., 2004) et des rongeurs (Baur et al., 2006).

Cette équipe a ainsi mis en lumière un certain nombre de défauts associés à SIRT1 dans des cellules issues de souris *Zmpste24*^{-/-} et plus précisément dans des cellules stromales de la moelle osseuse (BMSCs pour Bone Marrow Stromal Cells). Tout d'abord, la protéine SIRT1, qui est physiologiquement liée à la membrane nucléaire grâce aux interactions avec le domaine C-terminale de la lamine A, apparaît très nettement dissociée de celle-ci. De plus,

ces auteurs ont démontré que l'altération de la liaison de SIRT1 à la membrane nucléaire en diminuait son activité puisque Foxo3a se retrouvait hyperacétylée et l'expression de Gadd45 α et de la catalase, diminuée (Liu et al., 2012a). Ce défaut très spécifique peut être expliqué par la présence de progérine. En effet, dans des cellules HEK293 qui expriment de manière ectopique la prélamine A ou la progérine, les mêmes défauts peuvent être observés. Ni la prélamine A, ni la progérine ne se lient à SIRT1 et, de fait, SIRT1 ne se lie plus à la membrane nucléaire. En outre, les BMSCs de souris *Zmpste24*^{-/-} en culture présentent une prolifération réduite, une sénescence prématuée ainsi qu'une capacité à former des clones diminuée par rapport à des cellules contrôles.

De manière surprenante, dans cette étude, le resvératrol a été utilisé à des doses comprises entre 2 et 10 μ M, doses qui n'activent normalement pas l'AMPK mais qui ont démontré, néanmoins, l'amélioration d'un certain nombre de symptômes chez les souris *Zmpste24*^{-/-}. Tout d'abord, cette molécule a augmenté le potentiel clonogénique des BMSCs, bien qu'elle n'ait pas entraînée de diminution de la sénescence des fibroblastes embryonnaires de souris ni du taux de p16^{Ink4a}. Cette différence d'efficacité entre les cellules somatiques et les cellules souches adultes peut être expliquée par le fait que SIRT1 ait été fortement exprimée dans les cellules souches et progressivement moins exprimée au cours de la différenciation (Saunders et al., 2010). Par ailleurs, à l'échelle de l'organisme entier, quatre mois de traitement au resvératrol ont amélioré la structure, l'organisation et la densité des os trabéculaires. Cette molécule a ralenti la perte de poids des souris et allongé leur durée de vie de 27,5 à 35, 5 semaines au maximum (Liu et al., 2012a). Les résultats de cette étude ouvrent de nouvelles perspectives thérapeutiques *via* l'utilisation du resvératrol, ou de molécules ayant le même profil d'action, chez des patients atteints par la progéria. Même s'il reste des études complémentaires à entreprendre afin de mieux définir les mécanismes d'action impliqués dans l'effet pharmacologique du resvératrol, ce polyphénol semble présenter des vertus qui pourraient, du moins en association avec d'autres stratégies thérapeutiques, avoir un impact favorable sur la symptomatologie des patients.

II.4.2.4 Les inhibiteurs de la carboxyméthyl transférase (ICMT)

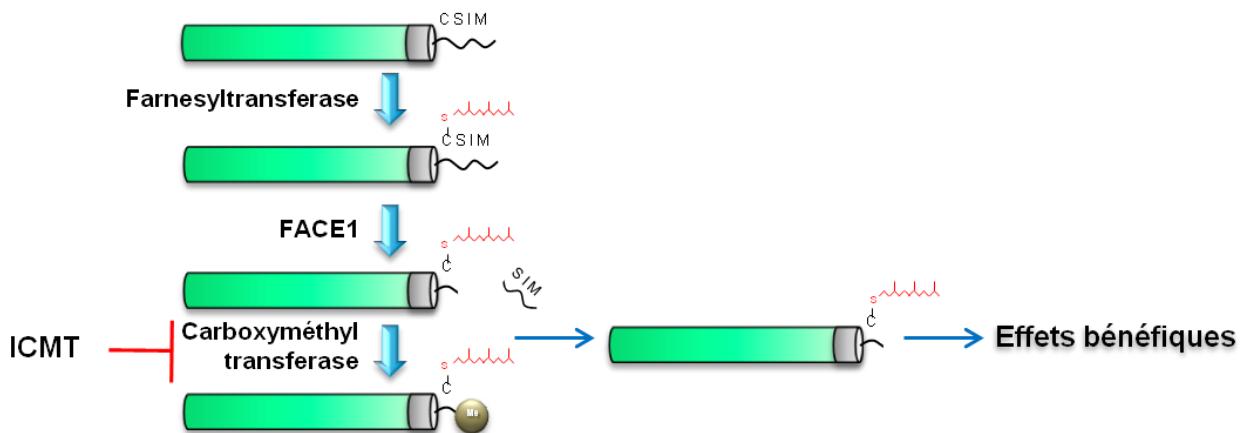


Figure 21 : Mécanisme d'action des ICMT

En inhibant la carboxyméthylationtransférase, les ICMT permettent de générer une prélamine A mutée non carboxyméthylée. Cette inhibition a une action positive sur le phénotype pathologique de la progéria.

La troisième étape de maturation post-traductionnelle de la lamine A consiste à méthylérer la cystéine du motif CAAX. Peu d'éléments permettent de comprendre le rôle de cette méthylation. En 2013, l'équipe de Martin Bergo a ainsi proposé d'investiguer l'effet de l'inhibition de cette méthylation sur la physiopathologie de la progéria (Ibrahim et al., 2013). Ces auteurs ont ainsi démontré que l'introduction d'un allèle hypomorphique *Icmt* dans le gène codant pour la carboxyméthytransférase (*Icmt^{hm}*) dans des souris *Zmpste24^{-/-}*, entraînait l'atténuation du phénotype progéroïde (Figure 21). Bien que la structure de l'enveloppe nucléaire soit restée inchangée après le traitement, les auteurs ont montré que la prélamine A produite n'était plus retenue à la membrane nucléaire. Les fibroblastes de ces souris présentent une augmentation de la signalisation AKT-mTOR, une diminution d'expression de p27 (p24^{KIP1} Inhibiteur de kinases dépendantes de cyclines), p21^{CIP1} et du suppresseur de tumeur p16^{INK4A}, l'ensemble contribuant à stimuler leur prolifération. D'un point de vue physiologique, ces souris *Zmpste24^{-/-} Icmt^{hm/hm}* présentent une amélioration de la courbe de croissance avec une augmentation du tissu adipeux, une absence de fractures des côtes associée à une augmentation du nombre d'ostéoblastes, un épaississement et une augmentation du volume des os trabéculaires. De plus, ces souris vivent plus longtemps et dans des conditions physiques meilleures que les souris *Zmpste24^{-/-}*. De la même manière, inhiber la CMT (CraboxyMéthyl Transférase) dans des fibroblastes issus de patients progéria, grâce à un shRNA qui réduit de 80 % l'expression de l'enzyme, améliore la prolifération des

cellules sans toutefois faire diminuer l'expression de progérine et le nombre de noyaux bulleux (Ibrahim et al., 2013). Bien que ces récents résultats requièrent d'être approfondis avec des inhibiteurs chimiques de la CMT, dans un modèle plus représentatif de la physiopathologie de la progéria, ils laissent entrevoir une nouvelle piste thérapeutique de ce syndrome.

Les différents exemples de thérapies potentielles de la progéria citées ci-avant montrent que certaines diminuent la quantité de progérine tandis que d'autres empruntent des mécanismes d'actions variés et encore peu détaillés. Cette diversité de piste thérapeutique et les résultats encourageants qui en découlent, exposent la complexité de la pathologie et apporte un argument pour dire qu'un traitement contre la progéria devra probablement associer différentes stratégies d'action pour être efficace.

Oligonucléotides morpholinos anti-sens	Rapamycine	Resvératrol	Inhibiteur de la carboxyméthyltransférase
Diminue la progérine	Diminue la progérine	Restore l'activité de SIRT1	Inhibe la carboxyméthylation de la prélamine A

Tableau 3 : Action principale des nouvelles pistes thérapeutiques contre la progéria

III. Les cellules souches induites à la pluripotence : modèle d'étude de la progéria

III.1 Les cellules souches

Le terme de cellules souches a été introduit en 1883 par Auguste Weissman pour nommer une catégorie de cellules capables de s'autorenouveler et de se différencier vers des types cellulaires plus spécialisés (Plickert et al., 2012; Rey, 2003) (Figure 22). L'autorenouvellement est une propriété majeure des cellules souches. Elle permet à une cellule mère de générer deux cellules filles totalement identiques par division symétrique. Cette propriété intrinsèque apporte aux cellules souches le pouvoir de se multiplier de manière théoriquement indéfinie, ouvrant la perspective d'accès à une ressource biologique illimitée (Zeng and Rao, 2007). La seconde propriété fondamentale des cellules souches est leur pouvoir de plasticité unique qui leur permet, lors de la division asymétrique, de donner

une cellule fille identique et une autre qui se spécifie vers un lignage ou un type cellulaire déterminé (Hall and Watt, 1989). Au cours du développement, alors que le potentiel d'autorenouvellement est maintenu, la capacité de différenciation des cellules va évoluer et permettre ainsi de distinguer plusieurs types de cellules souches : les cellules totipotentes, pluripotentes, multipotentes, bi/tri/unipotentes.

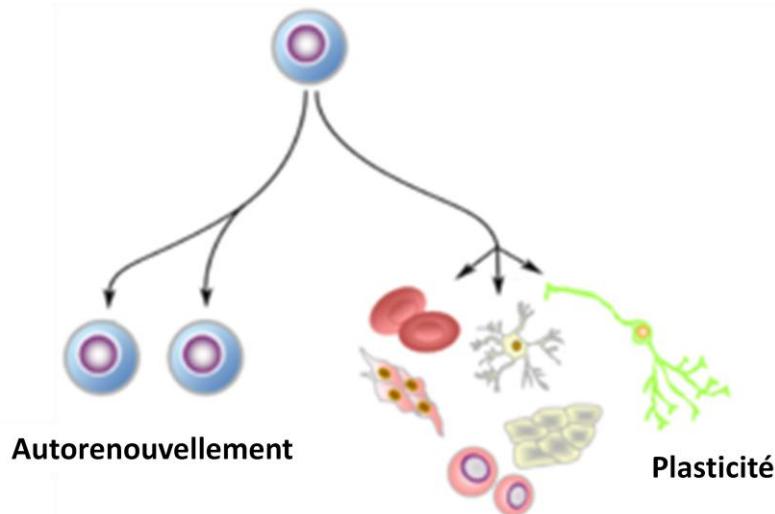


Figure 22 : Caractéristiques des cellules souches

Les cellules souches ont la capacité de s'autorenouveler, c'est-à-dire de donner deux cellules identiques après division symétrique et sont dotées d'une plasticité qui leur apporte la faculté de se différencier vers un type cellulaire mature ou en progéniteur engagé vers une voie de différenciation spécifique.

III.1.1 Les cellules souches totipotentes

Issu de la fusion d'un spermatozoïde et d'un ovocyte, le zygote est constitué de cellules souches totipotentes. L'existence de ces cellules est très transitoire puisqu'il est possible de les isoler uniquement entre la fécondation et le quatrième jour de développement embryonnaire au stade 8-16 cellules. Ce sont les seules cellules à pouvoir conduire à un organisme entier (Jaenisch and Young, 2008). Elles ont la capacité de se différencier dans l'ensemble des types cellulaires y compris les annexes embryonnaires : l'amnios, l'allantoïde, le placenta et la vésicule ombilicale.

III.1.2 Les cellules souches pluripotentes

Les cellules souches pluripotentes peuvent conduire, par différenciation, à l'ensemble des tissus de l'organisme à l'issue de leur engagement vers un des trois feuillets embryonnaires :

l'endoderme, l'ectoderme et le mésoderme. Cependant, elles ne peuvent pas former les annexes embryonnaires, les différenciant des cellules totipotentes. Il existe différents types de cellules souches pluripotentes : les cellules obtenues par transfert nucléaire, les cellules souches embryonnaires, et les cellules souches induites à la pluripotence.

III.1.2.1 Les cellules issues du transfert nucléaire somatique

Le transfert nucléaire somatique également appelé clonage thérapeutique a été la première technique proposée pour reprogrammer les cellules à un stade de pluripotence. Le principe de la méthode repose sur l'introduction du noyau d'une cellule somatique dans un ovocyte énucléé. Quelques heures après le transfert, la cellule germinale hybride commence à se développer. Au stade blastocyste, l'embryon généré peut être implanté *in utero* pour donner naissance à un organisme génétiquement identique à la cellule somatique de départ. Depuis la découverte initiale chez le xénope par John Gurdon en 1962 (Gurdon, 1962), la technique a été transposée à une vingtaine d'espèces de mammifères notamment le mouton avec la naissance de la célèbre brebis Dolly (Wilmut et al., 1997). Très récemment, l'équipe de Shoukhrat Mitalipov a réussi, grâce à cette technique optimisée, à générer des cellules souches pluripotentes humaines issues du transfert nucléaire (Tachibana et al., 2013).

III.1.2.2 Les cellules souches embryonnaires (ESCs)

Les cellules souches embryonnaires sont les seules cellules pluripotentes présentes naturellement dans l'organisme. Elles sont transitoirement retrouvées au stade blastocyste, entre $5^{1/2}$ jours et $7^{1/2}$ jours après la fécondation, au cœur de la masse interne, dans l'épiblaste. Historiquement, ces cellules ont été caractérisées à partir de blastocytes murins par l'équipe d'Evans et Kaufman (Evans and Kaufman, 1981), puis isolées, mises en cultures et maintenues à l'état indifférencié par l'équipe de Gail Martin (Martin, 1981). Il a fallu attendre dix-sept ans pour que l'équipe de James Thomson parvienne à réaliser le même exploit avec des cellules souches humaines (Thomson et al., 1998). Grâce à ces techniques de dérivation et de culture des cellules souches embryonnaires, il est possible de générer des lignées de cellules saines mais également, au travers du diagnostic préimplantatoire, de dériver des cellules souches embryonnaires porteuses d'une mutation causale d'une pathologie identifiée.

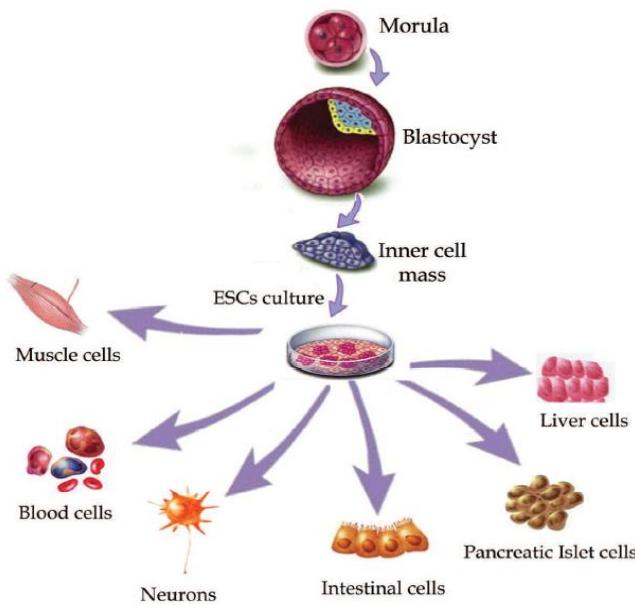


Figure 23 : Génération et potentiel de différenciation de lignée de cellules souches embryonnaires humaines

Les cellules souches embryonnaires humaines sont isolées de la masse interne au stade blastocyte du développement embryonnaire. Une fois en culture, elles conservent cet état indifférencié mais peuvent se diriger vers des voies de différenciation spécifiques (Meregalli et al., 2010).

Plusieurs techniques de dérivation existent pour isoler les cellules souches embryonnaires du blastocyte (Figure 23). Ces cellules sont isolées à partir d'embryons surnuméraires fécondés *in-vitro* dans le cadre d'une procréation médicalement assistée. Il existe deux techniques principales pour isoler spécifiquement ces cellules. La première à avoir été décrite est l'immunochirurgie. Elle consiste à éliminer la zone pellucide à l'aide de pronase et à lyser le trophectoderme par des anticorps anti-humains et de complément de cochons d'Inde. Les cellules sont ensuite placées dans un milieu de culture conditionné par des cellules nourricières qui ne prolifèrent plus. L'inconvénient de cette méthode est le risque de contamination des lignées par des pathogènes animaux apportés par les adjuvants (Thomson et al., 1998). La seconde méthode consiste à la mise en culture partielle ou entière de l'embryon, le risque étant une hyperprolifération des cellules trophoblastiques qui empêche la prolifération sélective des cellules pluripotentes (Kim et al., 2005; Oh et al., 2005). En France, le cadre législatif de l'utilisation des ESCs humaines est très strict. Les expérimentations sur les ESCs sont interdites depuis les lois de bioéthique parues le 29 juillet 1994, sauf si elles ne portent pas atteinte à l'embryon. Face aux découvertes majeures de la fin du XX^{ème} siècle, les lois de bioéthique de 1994 ont été révisées en 2004. Cette loi définit trois types d'embryons :

- les embryons surnuméraires obtenus par fécondation *in-vitro* qui ne font plus l'objet d'un projet parental,
- les embryons anormaux qui ne pourront pas être réimplantés dans le cadre d'une grossesse médicalement assistée,
- les embryons porteurs d'une anomalie génétique recherchée dans le cadre d'un diagnostic préimplantatoire.

D'après ce texte de loi, la recherche sur ces trois types d'embryons demeure interdite, mais, est rendue possible, uniquement à titre dérogatoire pendant une durée de cinq ans à partir du 7 février 2006, date de publication du décret d'application. Les conditions d'attribution de cette dérogation par l'agence de la biomédecine sont très strictes. Les recherches menées sur ces cellules doivent être susceptibles de permettre un progrès thérapeutique majeur et il ne doit pas exister de méthodes alternatives d'efficacité comparable en l'état des connaissances scientifiques. Ces recherches ne peuvent se faire que sur les embryons générés par fécondation *in-vitro*, dans le cadre d'une procréation médicalement assistée, qui ne font plus l'objet d'un projet parental. Les deux parents doivent donner leur consentement éclairé de manière écrite, et disposent d'un délai de réflexion de trois mois. Cependant, sans motifs établis, le consentement est révocable à tout moment. A l'issue de ces cinq ans, les états généraux ont révisé cette loi de 2004. Le 7 juillet 2011 sont parues au journal officiel les nouvelles directives de cette loi n°2011-814. Le cadre législatif de recherche sur l'embryon est quasiment identique à la loi de 2004 et interdit toujours, sauf dérogation l'utilisation des cellules souches embryonnaires dans la recherche.

III.1.2.3 Les cellules souches induites à la pluripotence

Depuis 2006, une autre source de cellules souches pluripotentes a été décrite. Ces cellules dites souches sont induites à la pluripotence (iPSCs pour induced Pluripotent Stem Cells) ont été générées grâce à l'introduction de facteurs de transcription dans des cellules somatiques. Ces iPSCs, à la base de nos travaux, seront développées dans les deux parties suivantes de ce manuscrit.

III.1.3 Les cellules souches multipotentes

Les cellules souches multipotentes ont une capacité de différenciation réduite par rapport aux cellules souches pluripotentes car elles sont déjà engagées dans un programme de

différenciation tissulaire spécifique (Young and Black, 2004). Grâce à elles, les cellules endommagées ou sénescentes sont régénérées, créant une homéostasie tissulaire (Vickaryous and Hall, 2006). Parmi ces cellules souches multipotentes, il est possible de citer par exemple:

- les cellules souches mésenchymateuses capables de se différencier en adipocytes, en ostéoblastes, en chondrocytes, en cellules musculaires lisses ou encore en cellules endothéliales (Delorme et al., 2008; Delorme et al., 2009; Kaltz et al., 2008).
- les cellules souches hématopoïétiques qui conduisent aux hématies, aux plaquettes, aux lymphocytes T et B ainsi qu'aux macrophages (Chute et al., 2010; Larsson and Karlsson, 2005).
- les cellules de la crête neurale qui mènent aux mélanocytes, aux neurones et aux cellules gliales du système nerveux périphérique (Knecht and Bronner-Fraser, 2002).

III.1.4 Les cellules tri/bi/unipotentes

D'autres cellules ont un potentiel de différenciation plus restreint et sont limitées à produire, trois, deux ou un seul type cellulaire. Ces cellules résident dans des niches (Moore and Lemischka, 2006; Spradling et al., 2001) généralement situées dans l'organe qu'elles sont capables de régénérer ou en périphérie (Wong et al., 2012). Les cellules souches tripotentes, comme leur nom l'indique, sont capables de se différencier dans trois types cellulaires distincts, telles que les cellules souches chondro-ostéo-adipogéniques présentes dans la moelle (Pittenger et al., 1999). Les cellules souches bipotentes se spécialisent vers deux types cellulaires, c'est le cas notamment des adipofibroblastes du tissu adipeux (Vierck et al., 1996), des cellules souches chondro-ostéogéniques de la moelle osseuse (Prockop, 1997), ou encore des cellules souches du follicule pileux (Jaks et al., 2008; Ohyama, 2007). Les cellules souches unipotentes quant à elles, se différencient vers un unique type cellulaire. C'est le cas des progéniteurs neuronaux (Gage et al., 1995), des myoblastes myosatellites, des adipoblastes, des cellules chondrogéniques du périchondre et des cellules ostéogéniques des périostes (Young et al., 1995; Young et al., 1998) ou encore des cellules de l'épithélium basal de la muqueuse gastro-intestinale (Bjerknes and Cheng, 2002).

III.1.5 Les cellules souches cancéreuses

Comme les autres cellules souches de l'organisme, les cellules souches cancéreuses ont la capacité de s'autorenouveler et de se différencier. Elles auraient un rôle déterminant dans l'initiation et la progression tumorale (Frank et al., 2010; Reya et al., 2001) mais également la résistance aux traitements conventionnels anti-cancéreux de type chimiothérapie et radiothérapie (Shukrun et al., 2013). Ces cellules ont été identifiées dans la majorité des cancers (Shekhani et al., 2013).

III.2 Les cellules souches induites à la pluripotence ou iPSCs

Découvertes par le Pr Shinya Yamanaka en 2006, les iPSCs ont ouvert des perspectives thérapeutiques pour de nombreuses pathologies souffrant de l'absence de modèles cellulaires pertinents (Takahashi and Yamanaka, 2006). Dans cette étude pionnière, vingt-quatre facteurs de transcription, connus pour leur implication dans le maintien de la pluripotence ou la prolifération cellulaire, ont été combinés pour évaluer leur potentiel à convertir des fibroblastes de souris. La combinaison optimale, constituée de quatre facteurs transduits par des rétrovirus, a permis aux cellules somatiques de retourner à un état de pluripotence identique à celui des cellules souches embryonnaires (Figure 24). Ces quatre facteurs interviennent physiologiquement dans les premières étapes de l'embryogénèse :

- Oct3/4 (Octamer-binding transcription factor 3/4), également appelé Pou5f1, intervient lors du passage du stade morula au stade blastocyte.
- Sox2 (SRY-box 2) joue un rôle dans l'autorenouvellement et la pluripotence des ESCs. Elle forme un hétérodimère avec Oct4.
- Klf4 (Krüppel-like transcription factor 4) peut activer ou réprimer la transcription. Il présente une dualité d'action, il peut soit fonctionner comme une oncoprotéine soit comme un gène suppresseur de tumeur.
- c-Myc est un oncogène exprimé dans les cellules à forte activité proliférative, notamment les cellules cancéreuses.

Dans cette étude, les auteurs ont démontré que ces cellules, une fois reprogrammées, présentaient une morphologie, ainsi qu'un potentiel d'autorenouvellement et de pluripotence proche des cellules ESCs.

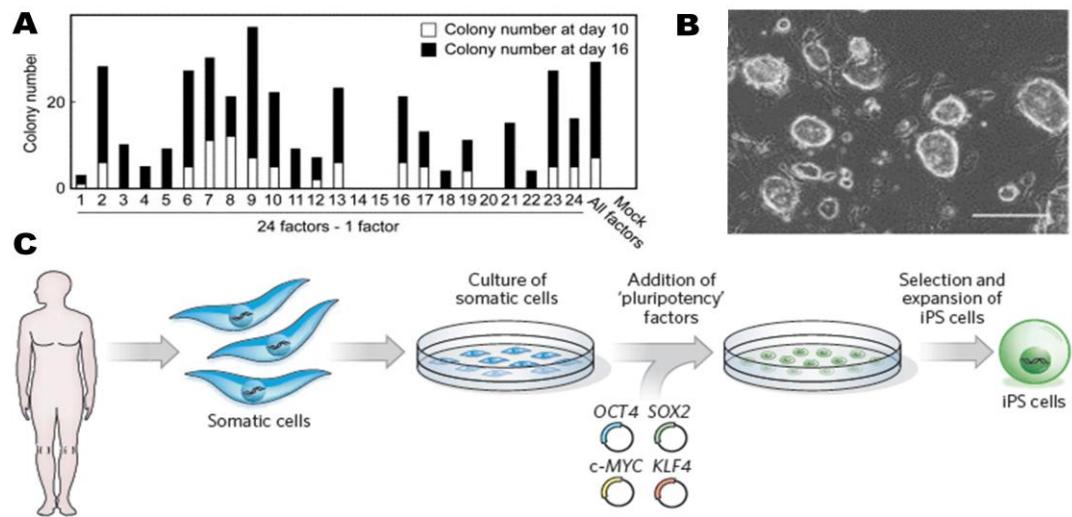


Figure 24 : Principe de la génération d'iPSCs : de l'étude princeps chez la souris à l'essai sur des cellules humaines

A) Efficacité de reprogrammation avec vingt-quatre facteurs chez la souris, B) Photographie de colonies d'iPSCs de souris, C) Représentation schématique de la stratégie de reprogrammation (Adapté de (Takahashi and Yamanaka, 2006; Yamanaka and Blau, 2010).

L'année suivante, le même cocktail de facteurs, avec la même démarche a été transposé aux fibroblastes dermiques humains, générant les premières lignées d'iPSCs humaines (Takahashi et al., 2007) (Figure 25). Ces cellules présentent une activité télomérasique, un profil d'expression génique identique à celui des ESCs. La pluripotence de ces cellules a été caractérisée par la démonstration qu'elles étaient capables de former des corps embryoides contenant les trois lignages embryonnaires et à générer des tératomes après injection dans des souris SCID. L'équipe a également démontré que ces cellules pouvaient se différencier en cellules cardiaques battantes et en cellules neurales. Enfin, ils ont investigué l'éventualité de reprogrammer d'autres types cellulaires que des fibroblastes dermiques humains en introduisant les mêmes facteurs dans des cellules de type fibroblastique de la synovie. Les iPSCs ainsi générées présentaient également les mêmes caractéristiques que celles produites avec des fibroblastes cutanés (Takahashi et al., 2007). Moins d'un mois après cette publication, l'équipe de James Thomson a proposé une autre combinaison de transgènes incluant Oct4, Sox2, Nanog et Lin28 (Yu et al., 2007). Comparé aux facteurs de Yamanaka, ce cocktail n'exprime pas c-Myc, oncogène dont la réactivation ectopique provoque une recrudescence de tumeurs (Okita et al., 2007).

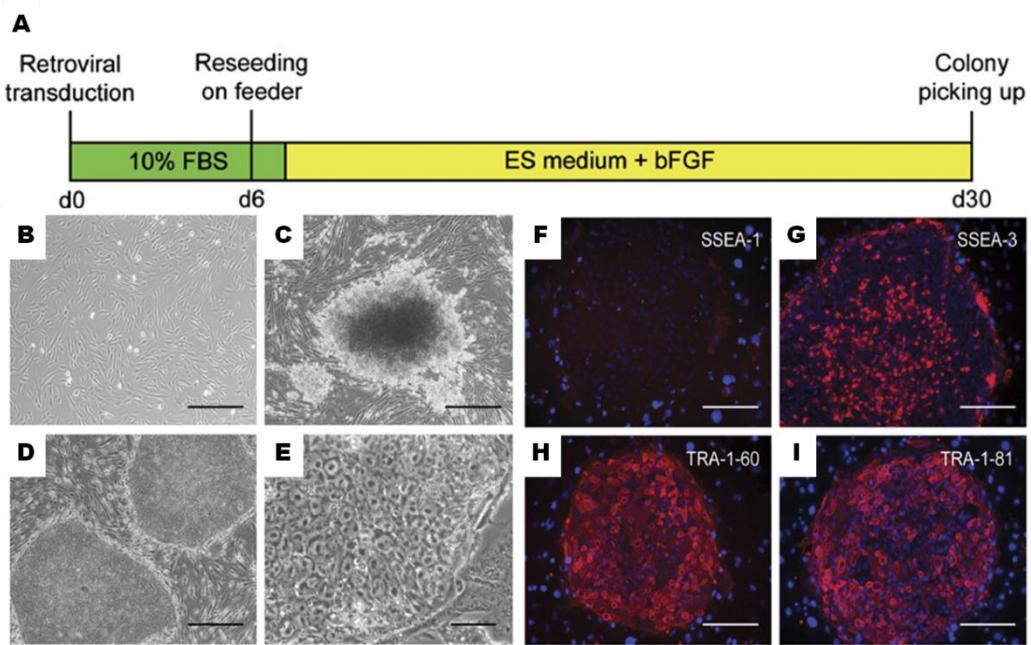


Figure 25 : Induction d'iPSCs à partir de fibroblastes dermiques adultes

A) Représentation schématique de la génération des iPSCs, B) Morphologie des fibroblastes dermiques, C) Image d'une colonie non ESCs, D) et E) Morphologie typique d'une colonie, F) G) H) I) Immunomarquage de marqueurs spécifiques de la pluripotence (SSEA-1, SSEA-3, TRA-1-60 et TRA-1-81) sur des colonies d'iPSCs. Adapté de (Takahashi et al., 2007).

III.2.1 Caractéristiques des iPSCs

Les cellules iPSCs présentent un certain nombre de caractéristiques propres aux cellules souches pluripotentes qui permettent de les identifier comme telles (Figure 26) : leur morphologie, leur capacité à s'autorenouveler et à se différencier.

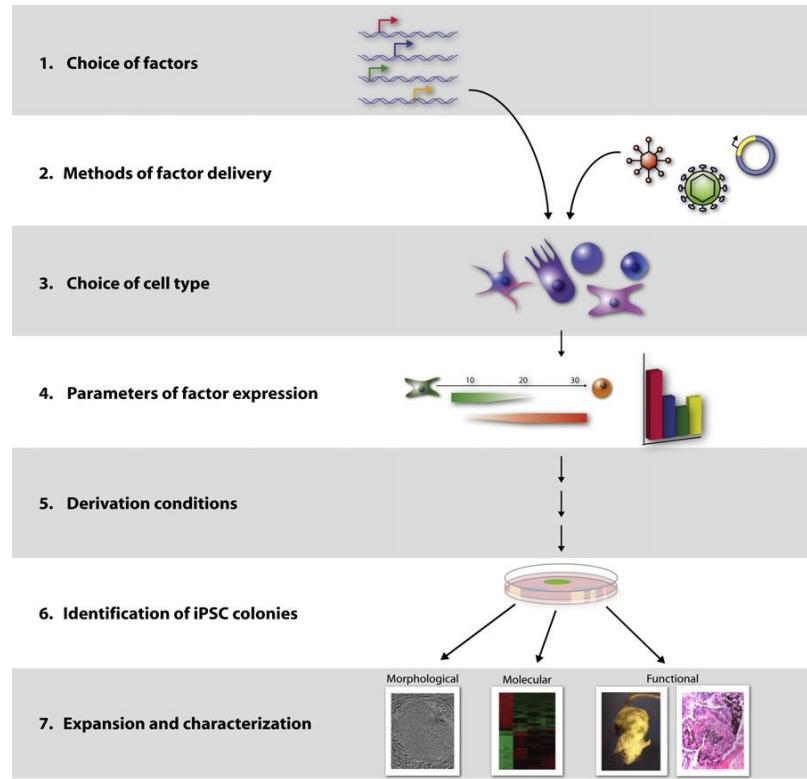


Figure 26 : Processus de dérivation d'une lignée iPSC

Trois éléments sont essentiels à la reprogrammation : les facteurs à introduire, le type de vecteur permettant leur introduction et le type cellulaire à transduire. Une fois générée, chaque clone d'iPSCs va être évalué sur de nombreux paramètres pour s'assurer de leur qualité. Une fois les colonies identifiées, le travail d'amplification et de caractérisation va se poursuivre afin d'établir une lignée d'iPSCs qui répond à l'ensemble des critères des iPSCs (Maherali and Hochedlinger, 2008).

III.2.1.1 Les caractéristiques morphologiques

Une des caractéristiques typiques des iPSCs est leur morphologie. Ce sont de très petites cellules qui mesurent deux à trois micromètres avec un rapport nucléo-cytoplasmique élevé. De forme ronde sans aucun prolongement cytoplasmique, elles ne sont pas polarisées mais sont dotées d'un nucléole proéminent, réfringent typique. De manière très spécifique, elles ne prolifèrent pas séparément mais s'organisent en colonies circulaires, compactes aux contours réguliers (Takahashi et al., 2007). Cette structure spatiale leur permet de conserver leur état de pluripotence en culture.

III.2.1.2 L'autorenouvellement

Les iPSCs ont la capacité de s'autorenouveler en théorie, de manière illimitée. Ce potentiel unique présente un type de ressource biologique quasi inépuisable. Cette propriété leur est donnée par le maintien de la longueur des télomères par deux actions complémentaires : d'une

part une activité télomérasique continue et d'autre part les échanges chromatiniens entre les extrémités télomériques. Lors de la reprogrammation des cellules par l'introduction des facteurs de transcriptions Oct4, Sox2, Klf4 et c-Myc, cet événement est accompagné par une activation de la télomérase et un allongement de la taille des télomères (Marion et al., 2009; Park et al., 2008b; Takahashi et al., 2007). La composante catalytique dépend de l'activité transcriptase inverse de la télomérase (Tert) et de la partie télomérase RNA (Terc) (Allsopp, 2012). Or elles agissent toutes relativement tôt dans le processus de reprogrammation, avant l'expression endogène des gènes de pluripotence *Oct4*, *Nanog* et *Sox*. En revanche, Klf4 (Krüppel-like transcription factor 4) semble avoir un rôle prépondérant dans le maintien de l'activité télomérasique, en réactivant Terc et Tert (Wang et al., 2012; Wong et al., 2010).

III.2.1.3 La pluripotence

Les iPSCs, comme les ESCs, expriment des facteurs de pluripotence tels qu'*Oct4*, *Nanog* ou encore des antigènes de surface spécifiques des cellules souches embryonnaires tels que SSEA-3 (Stage Specific Embryonic Antigen), SSEA-4, Tra-1-60 (Tumor rejection antigen), Tra-1-81 et des marqueurs intracellulaires comme l'alcaline phosphatase (Jaenisch and Young, 2008; Maherali and Hochedlinger, 2008). Ces facteurs peuvent servir de marqueur de contrôle qualité pour contrôler la pluripotence des cellules générées. Cependant, la capacité des iPSCs à se différencier vers les trois feuillets embryonnaires reste le critère principal de discrimination. Cette pluripotence peut ainsi être évaluée par plusieurs méthodes : la différenciation *in vitro* en corps embryoïdes, la formation de tératome après injection chez la souris, la formation de chimères par introduction de ces cellules dans un blastocyte hôte, la génération de cellules germinales fonctionnelles ou encore la complémentation tétraploïde (Jaenisch and Young, 2008).

III.2.1.4 La stabilité génomique

Lors de la culture des ESCs, un grand nombre d'anomalies chromosomiques ont été mises en évidence de manière récurrente (Lefort et al., 2009). Il en est de même pour les iPSCs. Ces aberrations vont de la petite duplication d'un segment, à des délétions en passant par des trisomies (Mayshar et al., 2010). Elles peuvent affecter la capacité de différenciation des cellules, favoriser leur survie voire augmenter leur pouvoir tumorigène. Une étude menée par l'équipe de Martins-Taylor a recensé les anomalies majoritairement présentes dans les lignées d'iPSCs (Martins-Taylor et al., 2011). Cette étude mentionne les duplications de 20q11.21 et

2p11.2 qui sont d'ailleurs également répertoriées dans les cellules embryonnaires humaines. En revanche, la perte de 8q24.3 semble être spécifique des iPSCs. Par ailleurs, une variabilité dans le nombre de copies (CNV pour Copies Number Variation) dans les segments chromosomiques 1q31.3, 8q24.3 et 17q21.1 sont caractéristiques des iPSCs et apparaissent de manière récurrente lors de cultures prolongées. Les CNV 1q31.3 et 17q21.1 sont également détectées prématûrément, parfois pendant le processus de reprogrammation dans les cultures de lignées iPSCs (Martins-Taylor et al., 2011). Cette instabilité génomique est liée à la conversion en elle-même, aux congélations/décongélations successives, mais également aux techniques de culture et de passage des cellules. Cependant, même lorsque le caryotype des cellules indifférenciées est normal, ce qui est le cas dans la majorité des lignées iPSCs, une anomalie chromosomique peut néanmoins apparaître dans les progéniteurs intermédiaires au cours de leur amplification (Varela et al., 2012). Il est donc nécessaire de s'assurer de l'intégrité chromosomique des cellules à tous les stades de différenciation.

III.2.2 Évolution des méthodes de reprogrammation

Depuis la découverte des iPSCs, les méthodes de reprogrammation n'ont pas cessées d'évoluer. L'objectif de ces optimisations est multiple, notamment augmenter le rendement de reprogrammation et obtenir une ressource biologique sûre pour être proposée à des fins de thérapie cellulaire. Les changements majeurs ont eu lieu dans le choix de la vectorisation (Figure 27), l'utilisation d'adjuvants et les types cellulaires reprogrammables.

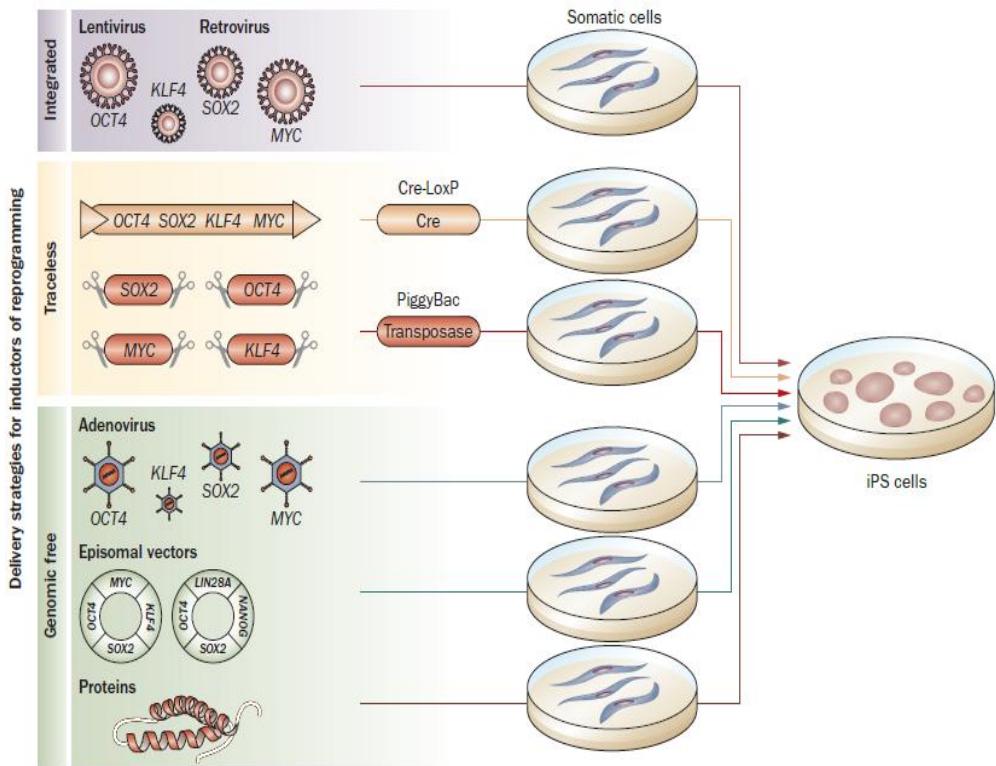


Figure 27 : Stratégies de reprogrammation de cellules somatiques en iPSCs

Les lentivirus et les rétrovirus utilisés sont des vecteurs intégratifs qui initient un risque de mutation insertionnelle. Afin d'éliminer ce risque de modification génomique, des constructions sont réalisées afin de couper enzymatiquement les séquences ectopiques intégrées au génome. Ce sont des recombinases Cre ou des transponases qui détruisent les transgènes après la reprogrammation. Des technologies alternatives qui ne ciblent pas le génome des cellules à reprogrammer ont prouvé leur efficacité à générer des iPSCs. Les adénovirus, les vecteurs épisomaux ou encore des protéines en font partie (Nelson et al., 2010).

III.2.2.1 Les vecteurs intégratifs

Les premiers vecteurs décrits dans la littérature comme ayant la capacité de transduire les cellules somatiques à des fins de reprogrammation en iPSCs ont été des vecteurs viraux de type intégratif. Les rétrovirus ont été utilisés dans l'étude princeps de Shinya Yamanaka (Takahashi et al., 2007) et les lentivirus ont été sélectionnés dans le travail de James Thomson (Yu et al., 2007). Alors que les rétrovirus n'infectent que les cellules en division, les lentivirus, quant à eux, peuvent transformer à la fois les cellules qui prolifèrent et les cellules quiescentes. Ainsi, les colonies transduites avec des rétrovirus commencent à apparaître après douze jours de culture et deviennent matures à environ trente jours avec un rendement de reprogrammation entre 0,01 et 0,02 % (Takahashi et al., 2007). A l'inverse, les colonies transduites avec des lentivirus apparaissent plus précocement (environ dix jours) et deviennent matures vingt jours post-infection avec un rendement de 0,02 % (Yu et al., 2007).

L'avantage de ces vecteurs est qu'ils permettent d'exprimer un niveau très élevé de transgènes de façon durable. A l'inverse, l'inconvénient majeur est l'intégration des séquences transgéniques dans le génome des cellules transduites, pouvant être à l'origine des mutations dites intentionnelles. Une des applications envisagées avec les iPSCs étant la thérapie cellulaire, la présence des transgènes intégrés a constitué une véritable entrave au développement de ces technologies. Des travaux ont donc été entrepris pour trouver des alternatives à cette intégration.

La première génération d'iPSCs dépourvues de transgènes a été réalisée avec des vecteurs lentiviraux constitués de sites loxP en 5' et 3' LTR des vecteurs viraux (Soldner et al., 2009). La présence de ces sites apportait un substrat pour l'élimination des séquences transgéniques *via* la recombinaison médiée par la recombinase Cre. Ces expérimentations ont été menées dans un contexte de fibroblastes issus de patients présentant un Parkinson idiopathique. Elles ont révélées que la reprogrammation de ces cellules avait générée des iPSCs sensiblement identiques à des ESCs, capables de se différencier en neurones dopaminergiques (Soldner et al., 2009).

III.2.2.2 Les adénovirus

Toujours dans la démarche d'éviter l'intégration des transgènes, d'autres vecteurs viraux ont été testés pour transduire les cellules. Les adénovirus sont des vecteurs non intégratifs qui n'infectent pas les cellules en cours de réplication. Les premiers tests d'efficacité avec ce type de virus ont été menés par Stadtfeld et al. en 2008 sur des fibroblastes de souris (Stadtfeld et al., 2008), puis chez l'humain l'année suivante par Zhou et al. (Zhou and Freed, 2009). Dans cette dernière étude, les auteurs ont montré un rendement de reprogrammation très faible, de l'ordre de 0,0002 % sur des fibroblastes embryonnaires mais sans aucune intégration des transgènes.

III.2.2.3 Les virus de Sendaï

Afin d'augmenter ce rendement de reprogrammation, d'autres types de virus ont été envisagés pour infecter les cellules. Le virus de Sendaï de la famille des Paramyxoviridae, est un virus à ARN qui ne pénètre pas dans le noyau de son hôte. A partir d'un brin d'ARN anti-sens, il est capable de produire une grande quantité de protéines tout en restant dans le cytoplasme. Ainsi, il ne s'intègre pas au génome et est dilué au fur et à mesure des divisions cellulaires

jusqu'à disparaître totalement au cours des passages. La première publication relative à la reprogrammation via des virus de Sendaï décrit un rendement très satisfaisant de fibroblastes dermiques néonataux et adultes de 0,1 % en moins de vingt-cinq jours (Fusaki et al., 2009). Bien qu'ils soient difficiles à utiliser, ces virus ont l'avantage d'augmenter l'efficacité de conversion sans s'intégrer au génome de l'hôte.

III.2.2.4 Les transposons piggyBac

Les transposons piggyBac sont intégrés sur les chromosomes de la cellule hôte au niveau de site TTAA. Cette construction, une fois intégrée au génome, peut être éliminée grâce à l'action d'une transposase sans laisser aucun vestige de sa présence sur le site d'intégration. Ces vecteurs ont fait la preuve de leur efficacité à reprogrammer des fibroblastes humains avec un rendement de 0,02 à 0,05 %, en générant des colonies d'iPSCs quatorze à vingt-cinq jours après la transfection (Kaji et al., 2009; Woltjen et al., 2009). Bien que la caractérisation des iPSCs n'ait pas été très approfondie dans ces deux études, il apparaît clairement que les séquences intégrées ont été excisées après la conversion. Une autre étude l'année suivante a souligné un rendement d'efficacité de 0,02 % avec l'intégration d'un vecteur piggyBac dans lequel avaient été clonés les quatre facteurs de Yamanaka, soit un rendement cinquante fois plus faible qu'avec des rétrovirus testé dans ces conditions (Mali et al., 2010).

III.2.2.5 Les protéines recombinantes

D'autres équipes se sont intéressées à la possibilité de générer des iPSCs sans virus et sans manipulation génétique (Kim et al., 2009; Zhou and Freed, 2009). L'idée était d'évaluer l'efficacité de reprogrammation via l'introduction d'Oct4, Sox2, Klf4 et c-Myc directement sous forme de protéines. Alors que Zou et al. ont utilisé des protéines synthétisées par *Escherichia coli*, Kim et al. ont exploité des protéines de mammifères fusionnées avec une poly-arginine afin de faciliter la diffusion à travers la membrane plasmique. Chez la souris l'efficacité de reprogrammation était d'environ 0,006 % (Zhou and Freed, 2009), alors qu'avec les fibroblastes humains elle n'était que de 0,001 % (Kim et al., 2009). En outre, à ce faible taux de conversion s'ajoute une génération d'iPSCs très lente puisqu'il a fallu attendre huit semaines pour obtenir les premières colonies. Cette technique est donc certes une alternative à l'utilisation des vecteurs viraux mais son efficacité est modérée et est limitée par la difficulté de produire les quantités nécessaires de protéines.

III.2.2.6 Les ARNs messagers

Cette technique consiste à transfacter les ARN messagers des quatre facteurs de Yamanaka dans des cellules somatiques en vue de les reprogrammer (Warren et al., 2010). Sachant que l'introduction d'ARNm synthétiques provoque des réactions immunitaires importantes, les ARNm ont été modifiés d'un point de vue structural. Les cytidines ont été remplacées par des 5-méthylcytidines et les uridines par des pseudouridines. La transfection de ces ARNm a été faite quotidiennement pendant dix-sept jours permettant l'apparition des premières colonies au bout de seulement vingt jours. Les auteurs de cette étude ont rapporté une efficacité de reprogrammation de 1,4 %, allant même jusqu'à 4,4 % sous hypoxie, l'addition d'acide valproïque et d'un cinquième facteur le Lin28 (Warren et al., 2010). Cette technique est, à ce jour, la plus efficace mais nécessite un travail fastidieux et engendre des coûts non négligeables en comparaison des autres méthodes.

III.2.2.7 Les microARNs

Ces dernières années, certains microARNs ont été identifiés pour leur implication dans l'état de pluripotence et l'augmentation de la reprogrammation de cellules somatiques murines. Ainsi, la surexpression de miR-302 et miR-372 avec les quatre facteurs de Yamanaka dans des fibroblastes humains a montré une augmentation de l'efficacité de conversion dix à quinze fois supérieure à une reprogrammation avec les facteurs de Yamanaka seuls (Subramanyam et al., 2011). De même, la surexpression ectopique par un vecteur lentiviral de Oct4, Sox2, Klf4 avec miR-302a/b/c/d dans des cellules souches adipocytaires augmente la reprogrammation d'un facteur quatre (Hu et al., 2013). L'efficacité de transfection était relativement faible, de l'ordre de 0,002 %, néanmoins, la technique a permis la production de cellules iPSCs présentant les mêmes caractéristiques que celles converties avec les facteurs de Yamanaka (Miyoshi et al., 2011). Ces microARNs semblent donc être des pistes intéressantes à suivre pour reprogrammer des cellules sans l'intervention de vecteurs viraux ou du moins intégratifs.

III.2.2.8 Les mini-vecteurs circulaires

D'autres types de vecteurs ont été utilisés pour reprogrammer les cellules somatiques en iPSCs. Les mini-vecteurs circulaires d'origine bactérienne sont des séquences d'ADN circulaires qui ne contiennent que les ADN complémentaires et des promoteurs eucaryotes

sans aucune empreinte des vestiges procaryotes. Ce type de construction a été utilisé pour produire Lin28, la GFP, Nanog, Sox2 et Oct4 dans des cellules souches adipocytaires humaines (Jia et al., 2010; Narsinh et al., 2011). Après de multiples transfections, les cellules ont été reprogrammées avec un rendement de 0,005 %, les premières colonies apparaissant un peu moins d'un mois après la première transfection.

III.2.2.9 Les épisomes

La surexpression de facteurs de reprogrammation avec des épisomes a été décrite pour la première fois par l'équipe de James Thomson (Yu et al., 2009). Cette étude décrit l'utilisation de trois plasmides ori/EBNA (Espstein-Barr Nuclear Antigen) contenant Oct4, Sox2, Nanog et Klf4 pour le premier, Oct4, Sox2 et SV40LT (pour SV40 Large T gene) pour le deuxième et c-Myc et Lin 28 pour le troisième. Les dérivés plasmidiques du virus d'Espstein-Barr font partie des réplicons extra-chromosomiques les plus efficaces dans les cellules de mammifère. L'origine de réplication du plasmide (*oriP*), lorsqu'elle est additionnée à l'antigène nucléaire 1 du virus d'Epstein-Barr (EBNA1), apporte une efficacité de réplication, un cloisonnement et un maintien du plasmide (Lindner and Sugden, 2007). Après une transfection unique, le rendement de reprogrammation est de 0,0003 à 0,0006 % après vingt jours de culture. La caractérisation des iPSCs générées à la fois *in vitro* et *in vivo* a mis en évidence des cellules similaires à des ESCs, avec pour plus d'un tiers, une perte des épisomes transfectés au cours des passages (Yu et al., 2009).

Afin d'évaluer la possibilité de reprogrammer d'autres types cellulaires avec cette méthode, Hu et al. ont transfecté les mêmes plasmides dans des cellules de sang de cordon et des cellules mononucléées de la moelle osseuse (Hu et al., 2011). L'efficacité de conversion a été de 0,035 % sur ces cellules (près de 100 fois plus élevée qu'avec des fibroblastes) avec l'apparition de premières colonies au bout de douze jours de culture.

Le travail d'un autre groupe a rapporté, la même année, la construction d'un plasmide contenant les facteurs de Yamanaka ainsi que Lin28 et d'un autre vecteur oriP/EBNA qui contenait le SV40LT (Chou et al., 2011). Dans cette étude, les vecteurs ont été co-nucléofectés dans des cellules CD34⁺ de sang de cordon, de sang périphérique et de moelle osseuse. La reprogrammation a été efficace à respectivement 0,02 %, 0,009 % et 0,005 % après quatorze jours de culture.

III.2.2.10 Les petites molécules

Une quinzaine de petites molécules ont été identifiées comme ayant la capacité de stimuler la reprogrammation (Tableau 4). Elles sont reportées dans le tableau 4 ci-après. Actuellement, aucune reprogrammation avec uniquement des petites molécules n'a abouti. Toutefois, leur utilisation en association avec l'introduction de facteurs de pluripotence est *quasi* systématique pour augmenter le rendement de conversion.

III.2.2.1 L'hypoxie

La majorité des niches de cellules souches adultes sont situées dans des zones où l'apport en oxygène est limité, créant une hypoxie autour de ces cellules. De même, les cellules épiblastiques du blastocyste sont dans un environnement hypoxique (Mohyeldin et al., 2010). Ainsi, les cellules souches ont une capacité oxydative limitée, un développement mitochondriale amoindri et, de fait, activent une glycolyse anaérobie pour produire de l'ATP (Madonna et al., 2013). D'autre part, la pluripotence est régulée en partie par une famille de protéines appelées HIF pour Hypoxia Inducible Factors, qui sont dépendantes de la pression en oxygène (Szablowska-Gadomska et al., 2011). HIF-2 α régule par exemple l'expression de Oct4 et lorsqu'il est éteint, une diminution de l'expression d'Oct4, Nanog et Sox2 est observée (Forristal et al., 2010).

Face à ce constat, plusieurs équipes ont tenté de reprogrammer des cellules somatiques dans des conditions d'hypoxie, émettant l'hypothèse qu'en recréant un environnement semblable à la physiologie, la reprogrammation des cellules serait stimulée. Les observations ont été identiques quels que soient les vecteurs utilisés, qu'ils soient intégratifs ou non, couplés ou non à des petites molécules : l'efficacité de conversion est augmentée dans des conditions d'hypoxie (Foja et al., 2013; Madonna et al., 2013; Shimada et al., 2012; Yoshida et al., 2009). De plus, ces conditions de culture en hypoxie facilitent le maintien de la pluripotence dans les cellules en culture (Forristal et al., 2010), mais aident également à la différenciation des iPSCs notamment en cellules progénitrices de la rétine (Bae et al., 2012).

III.2.3 Les différents types cellulaires humains reprogrammables

Par analogie aux fibroblastes embryonnaires de souris initialement requis pour les générations d'iPSCs (Takahashi and Yamanaka, 2006), les fibroblastes ont constitué le type cellulaire de

Nom de la molécule	Cible(s)/Fonction	Effet(s)
Parnate	Inhibiteur de la lysine déméthylase	Permet la reprogrammation de kératinocytes humains en induisant Oct4 et Klf4, en combinaison avec CHIR99021 (Li et al., 2009).
5-Azacytidine	Inhibiteur de l'ADN méthyltransférase	Facilite l'écrasement de la mémoire épigénétique (Kim et al., 2010).
Trichostatin A	Inhibiteur de l'histone désacétylase	Amélioration de la reprogrammation des MEFs. Facilite l'écrasement de la mémoire épigénétique (Kim et al., 2010).
Acide valproïque	Inhibiteur de l'histone désacétylase	Amélioration de la reprogrammation des MEFs en l'absence de c-Myc. Induit l'expression de Oct4 et Sox2 (Huangfu et al., 2008).
CHIR99021	Inhibiteur de la kinase glycogène synthase 3 β	En combinaison avec le Parnate, permet la reprogrammation des kératinocytes humains en induisant l'expression d'Oct4 et Klf4 (Li et al., 2009).
PD0325901	Inhibiteur de MEK	Accélère la reprogrammation des cellules humaines (Lin et al., 2009).
Thiazovivin	Inhibiteur de ROCK	Accélère la reprogrammation des cellules humaines (Lin et al., 2009).
8-bromoadenosine 3', 5'-cyclic monophosphate (8-Br-cAMP)	Activateur de la protéine kinase A	Améliore la reprogrammation de fibroblastes humains de prépuce, utilisée avec les quatre facteurs de Yammanaka (Wang and Adjaye, 2011).
PS48	Activateur de la 3'-kinase 1 dépendante du phosphoinositide	En combinaison avec le A-83-01, le PD0325901 et le butyrate de sodium permet la reprogrammation de cellules somatiques humaines transduites avec Oct4 uniquement (Zhu et al., 2010).
Butyrate de sodium	Inhibiteur de l'histone désacétylase	En combinaison avec le A-83-01, le PD0325901 et le PS48 permet la reprogrammation de cellules somatiques humaines transduites avec Oct4 uniquement (Chou et al., 2011; Mali et al., 2010; Zhu et al., 2010).
Vitamine C	Anti-oxydant, cofacteur enzymatique	Améliore la génération d'iPSCs (Esteban et al., 2010).
2,4-Dinitrophénol	Découple la phosphorylation oxidative	Améliore l'efficacité de reprogrammation de cellules somatiques humaines en iPSCs (Zhu et al., 2010).
Fructose 2, 6-bisphosphate	Activateur de la phosphofructokinase	Améliore l'efficacité de reprogrammation de cellules somatiques humaines en iPSCs (Zhu et al., 2010).
N-Oxalyglycine	Inhibiteur de la prolyl-4-hydroxylase	Améliore l'efficacité de reprogrammation de cellules somatiques humaines en iPSCs (Zhu et al., 2010).
Quercétine	Activation de la voie de signalisation inducible par l'hypoxie	Améliore l'efficacité de reprogrammation de cellules somatiques humaines en iPSCs (Zhu et al., 2010).

Tableau 4 : Liste des petites molécules utilisées pour améliorer la reprogrammation des cellules somatiques humaines

référence pour la reprogrammation chez l'Homme (Takahashi et al., 2007; Yu et al., 2007). Depuis, plusieurs autres types cellulaires ont été utilisés (Tableau 5). L'ensemble des études décrites ci-dessous ont permis d'obtenir des lignées iPSCs morphologiquement identiques aux ESCs. Elles expriment les marqueurs de pluripotence, sont capables de former des tératomes et de se différencier dans différents types cellulaires *in vitro*.

En cherchant d'autres types cellulaires capables d'être reprogrammés en iPSCs, les auteurs de ces travaux tentent de répondre à plusieurs objectifs, à la fois indépendants et complémentaires. Tout d'abord, s'il est possible de reprogrammer des cellules somatiques faciles d'accès, ce système permettrait de générer des iPSCs à partir de cellules primaires de patients avec les méthodes les moins invasives. L'autre objectif est d'augmenter le rendement de la reprogrammation. Avec les mêmes techniques (vecteurs, petites molécules, facteurs de reprogrammations identiques), un type cellulaire peut avoir un rendement meilleur qu'un autre. Enfin, la communauté scientifique spéculle sur la possibilité de différencier plus facilement des iPSCs vers un type cellulaire en particulier ou un lignage si la cellule d'origine appartient à ce lignage.

Type cellulaire	References	Remarques
Keratinocytes	(Aasen et al., 2008; Maherali et al., 2008)	- Cent fois plus efficace et deux fois plus rapide qu'avec des fibroblastes
Mélanocytes et mélanomes	(Utikal et al., 2009)	- Plus efficace (rendement de 0.05 %) qu'avec les fibroblastes. Ne nécessite pas l'expression ectopique de Sox2. - Mélanocytes faciles d'accès par biopsie de peau.
Cellules CD34⁺ de sang de cordon et de sang périphérique	(Eminli et al., 2009)	- Technique ne nécessitant pas de prélèvement invasif - Sang de cordon plus difficile d'accès
Cellules mononucléées de sang périphérique	(Gianotti-Sommer et al., 2008; Hu et al., 2011)	- Méthode de prélèvement non invasive
Lymphocytes T	(Loh et al., 2010; Seki et al., 2010)	- Facilité d'obtention par un prélèvement sanguin.
Précurseurs neuronaux	(Xie et al., 2013)	- Efficacité de 0.9 % avec l'expression des quatre vecteurs rétroviraux introduits via des rétrovirus
Cellules souches adipeuses	(Sun et al., 2009)	- Technique plus rapide et plus efficace qu'avec les fibroblastes
Hépatocytes	(Liu et al., 2010)	- Efficacité de 0.1-0.2 % avec l'expression des quatre vecteurs rétroviraux introduits <i>via</i> des rétrovirus
Cellules souches mésenchymateuses de la moelle osseuse	(Yulin et al., 2012)	- Efficacité de 0.01 % dans les conditions de Yamanaka. - Mais augmentée d'un facteur 10 avec l'ajout de siRNA p53, acide valproïque et vitamine C.

Tableau 5 : Liste des types cellulaires humains reprogrammés efficacement en iPSCs

III.2.4 Les conditions de culture des iPSCs

Depuis la découverte des cellules souches embryonnaires, la recherche sur l'optimisation des conditions de culture est très dynamique (Figure 28). L'objectif de ces recherches est de favoriser la prolifération des cellules souches pluripotentes et de maintenir leur état indifférencié. L'autre versant de cet aspect est la possibilité de cultiver ces cellules dans les conditions de bonnes pratiques de fabrication (GMP pour Good Manufacturing Practices), pour le développement de produits de thérapie cellulaire. Le plus couramment, les iPSCs sont cultivées sur une monocouche de cellules nourricières qui ne prolifèrent plus. Leur cycle cellulaire peut être à la fois bloqué par une irradiation aux rayons gamma ou par un traitement pharmacologique à la mitomycine. Couramment, deux types de cellules nourricières sont utilisés, les fibroblastes embryonnaires de souris (MEF pour Mouse Embryonic Fibroblasts) et les fibroblastes embryonnaires murins immortalisés (STO). Ces cellules sont cultivées dans des milieux de culture enrichis en sérum de veau fœtal pour leur apporter les facteurs nécessaires au maintien de leur potentiel prolifératif.

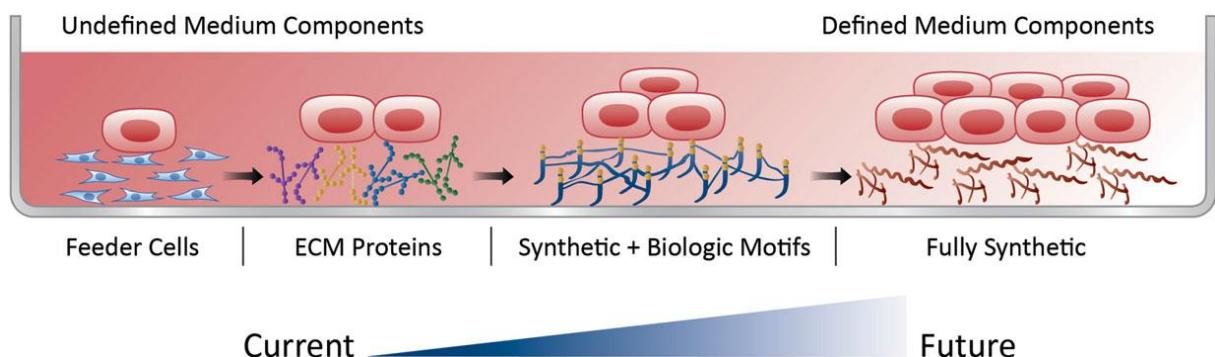


Figure 28 : Evolution des techniques de culture des iPSCs

Cette illustration décrit de gauche à droite la progression des conditions de culture des cellules iPSCs en partant de coculture sur cellules nourricières (feeder cells) avec du milieu contenant du sérum, vers des techniques de cultures sans feeder dans des milieux définis. Les conditions de cultures feeder-free ont évolué de l'utilisation de complexe de la matrice extracellulaire, en passant par des combinaisons de support synthétique et biologique pour arriver actuellement à des techniques totalement synthétiques GMP. Les rectangles rouges représentent les iPSCs avec leur noyau proéminent, les formes bleues allongées représentent les fibroblastes. Le gradient de couleur bleu foncé à bleu clair et rouge foncé à rouge clair indique la complexité des milieux de culture en direction de conditions mieux définies (Villa-Diaz et al., 2013).

Il existe également une alternative à l'utilisation des cellules nourricières animales, source potentielle d'agents pathogènes et de molécules immunogènes (Heiskanen et al., 2007; Martin et al., 2005). Ces cellules peuvent ainsi notamment être remplacées par des matrices

artificielles telles que le matrigel dans un milieu conditionné au préalable avec des MEF. Le matrigel, dérivé de sarcome murin, est principalement composé de laminine, de collagène IV, de protéoglycane héparine sulfate, d'ectactin et de facteur de croissance (Villa-Diaz et al., 2013). De par son origine animale, il n'est pas utilisable en conditions de GMP mais est largement utilisé à des fins de recherche. Les constituants du matrigel peuvent également être utilisés de manière individuelle, l'avantage étant qu'ils sont dépourvus de substrats xénogènes. A titre d'exemple, la fibronectine, le collagène IV (Xu et al., 2001), la vitronectine (Braam et al., 2008), la E-cadhérite (Nagaoka et al., 2010) ou la laminine-511 (Miyazaki et al., 2008) sont couramment utilisés pour cultiver ces cellules souches pluripotentes. Plus récemment, les recherches se sont focalisées sur le développement de polymères totalement synthétiques, placés sur des supports optimisés également combinés avec des milieux bien définis qui apportent les facteurs habituellement produits par les cellules nourricières de type mTeSR, StemPro (Villa-Diaz et al., 2013). Avec l'intention d'accroître le rendement de production des cellules souches pluripotentes, des techniques de culture en suspension sont également en pleine expansion (Olmer et al., 2010; Singh et al., 2010; Steiner et al., 2010).

III.3 Utilisation des cellules souches pluripotentes pour la modélisation pathologique et le criblage de petites molécules

De par leurs propriétés intrinsèques, les iPSCs constituent un modèle cellulaire compatible avec un grand nombre d'applications allant de la mise en place d'un modèle d'étude de pathologies au criblage à haut débit en passant par la toxicologie prédictive, ou encore la thérapie cellulaire. Dans le cadre de cette thèse, la possibilité de réaliser une modélisation pathologique de la progéria et des études de criblage de petites molécules a concentré toute notre attention. Dans cette dernière partie, ces deux applications seront développées.

III.3.1 La modélisation pathologique : de la progéria aux iPSCs

III.3.1.1 Principe de la modélisation pathologique

Un des aspects les plus prometteurs de la reprogrammation de cellules somatiques est la capacité de générer des iPSCs à partir de cellules de patients. Les iPSCs conservant le fond génétique des cellules du malade, il est ainsi possible de faire la relation entre un phénotype

pathologique et un génotype (Maury et al., 2012). Les iPSCs constituent un bon modèle d'étude d'une pathologie donnée si elles répondent à deux conditions :

- les iPSCs doivent être différenciées vers une population cellulaire pertinente
- ces dérivées doivent récapituler les aspects clés de la maladie dans un cadre compatible avec les études *in vitro*.

Ce travail de modélisation pathologique est possible grâce au développement parallèle des protocoles de différenciation vers des différents types cellulaires: cellules β qui sécrètent de l'insuline, cellules germinales mâles, cellules NK, réticulocytes, épithélium pulmonaire, épithélium pigmentaire de la rétine, hépatocytes, cellules astrogliales, cellules souches mésenchymateuses, cellules vasculaires, progéniteurs neuronaux, neurones dopaminergiques, astrocytes, cellules de schwann, cardiomycocytes, kératinocytes, mélanocytes et d'autres (Anstee et al., 2012; Cai et al., 2013; Hannan et al., 2013; Itoh et al., 2011; Lieu et al., 2013; Liu et al., 2012b; Lustremant et al., 2013; Ohta et al., 2013; Taura et al., 2009; Wong and Rossant, 2013). Cette liste non exhaustive montre la diversité d'exploration possible des maladies.

A ce jour, la plupart des études de modélisation pathologique à partir d'iPSCs se sont focalisées sur des maladies monogéniques telles que l'épidermolyse bulleuse (Tolar et al., 2011), la dyskératose congénitale (Agarwal et al., 2010a), la sclérose latérale amyotrophique (Dimos et al., 2008), le syndrome de Rett (Marchetto et al., 2010) ou encore sur des maladies plus complexes comme la schizophrénie (Brennand et al., 2011), la maladie de Parkinson (Park et al., 2008a), le diabète de type I, la maladie d'Alzheimer (Jang et al., 2012). L'intérêt de réaliser de la modélisation pathologique sur ces cellules est de mettre en évidence des biomarqueurs de la pathologie qui peuvent être suivis dans certaines conditions de recherche de traitements. Ces cellules ne servent alors plus uniquement à comprendre les mécanismes pathologiques à l'origine de la maladie mais peuvent également être exploitées comme des modèles pharmacologiques à plus ou moins grande échelle. La littérature s'enrichit constamment de nouveaux exemples de l'exploitation des dérivés d'iPSCs en pharmacologie, apportant de nouvelles pistes thérapeutiques dans les maladies investiguées.

III.3.1.2 La modélisation pathologique de la progéria

Entre 2011 et 2012, différentes équipes ont décrit la dérivation de cellules iPSC à partir de cellules de patients atteints de progéria typique mais également de patients affectés par

d'autres laminopathies telles que le syndrome atypique de progéria, la cardiomyopathie dilatée ou encore le syndrome de Werner (Ho et al., 2011). Les premières lignées d'iPSCs progéria ont été publiées par l'équipe de Alan Colman en 2011 (Zhang et al., 2011b). Les auteurs de cette étude ont générées des iPSCs à partir de fibroblastes de patients atteints par la progéria, grâce à l'introduction des quatre facteurs de Yamanaka (Oct4, Sox2, Klf4 et c-Myc) par infection rétrovirale. Après caractérisation et validation, ces iPSCs ont ensuite été différenciées dans plusieurs types cellulaires : les fibroblastes, les MSCs poussées elles-mêmes en différenciation terminale en VSMCs, les cellules endothéliales, les progéniteurs neuronaux. La première observation décrite a été l'absence d'expression des lamines de type A à l'état indifférencié et la réexpression après différenciation dans l'ensemble des types cellulaires exceptés les progéniteurs neuronaux. Les auteurs ont également souligné une augmentation de l'expression de la progérine lors de cultures prolongées des MSCs (Figure 28). Ils ont parallèlement mis en évidence un certain nombre de défauts caractéristiques de la progéria notamment une dysmorphie nucléaire, une augmentation des dommages à l'ADN ou encore une localisation anormale de LAP2 (Figure 29). Par ailleurs, la sensibilité exacerbée à l'hypoxie des MSCs et VSMCs a été démontrée grâce à ce modèle d'étude.

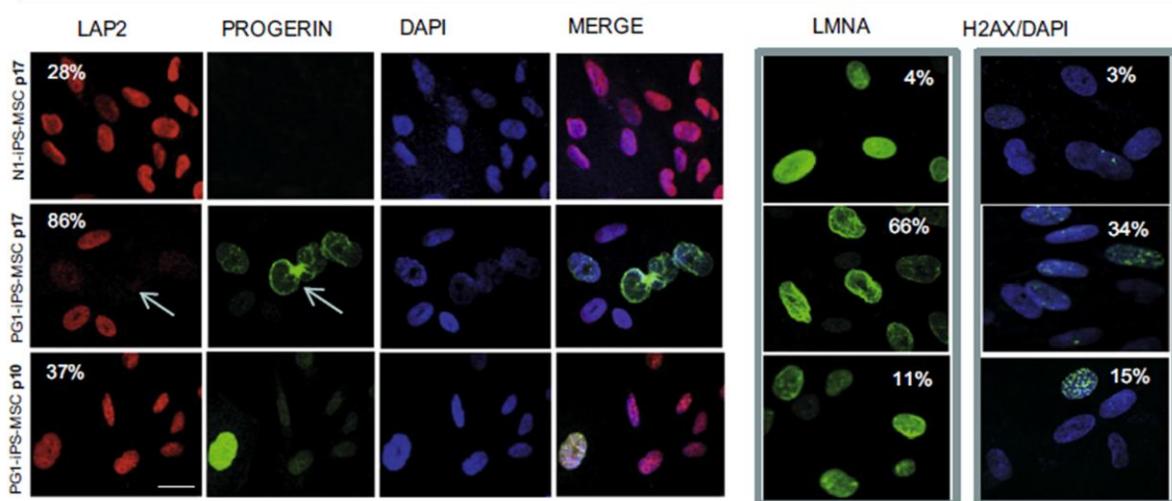


Figure 29: Anomalies fonctionnelles des MSCs dérivées d'iPSCs progéria

Les immunomarquages de LAP2, progérine, lamine A et H2AX réalisés sur des MSCs dérivées d'iPSCs progéria et contrôle révèlent une diminution de l'expression de LAP2, une augmentation de l'expression de progérine, une augmentation des anomalies nucléaires et des cassures double brin de l'ADN. Ces défauts augmentent au cours des passages (Zhang et al., 2011b).

La même année, l'équipe de Juan Carlos Izpisua Belmonte a approfondi la description du modèle iPSCs progéria en utilisant les mêmes techniques de reprogrammation (Liu et al.,

2011a). Les iPSCs générées n'exprimaient pas les lamines de type A à l'état indifférencié mais exprimaient la lamine B1. Contrairement au travail de l'équipe d'Alan Colman, les auteurs de cette étude se sont focalisés sur la différenciation d'un unique type cellulaire : les cellules musculaires lisses. Ces cellules présentaient une réduction de la taille des télomères, une diminution du nombre de cellules Ki-67 positives et un marquage β -galactosidase associé à une sénescence réplicative qui s'accentuait au cours des passages (Figure 30). Ces auteurs ont également démontré que les cellules musculaires lisses, présentaient d'autres atteintes classiques de la progeria, avec en particulier une déstructuration de l'enveloppe nucléaire, un raccourcissement des télomères et une diminution du marquage H3K9me3 (Figure 30). Un nouveau biomarqueur de la maladie a, par ailleurs, été mis en évidence grâce à ce modèle, la DNAPKcs (DNA-dependant Protein Kinase catalytic subunit). Cette enzyme ainsi que ses deux sous-unités régulatrices Ku70/Ku80 ont été observées comme étant dérégulées dans les fibroblastes primaires ainsi que les cellules musculaires lisses (Liu et al., 2011a).

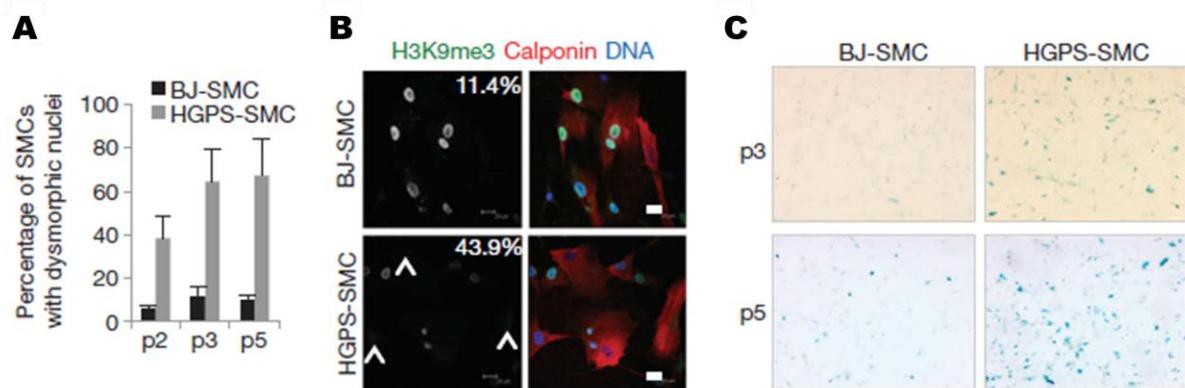


Figure 30 : Caractérisation des défauts des cellules musculaires lisses (SMCs) dérivées d'iPSCs progeria

Les SMCs dérivées d'iPSCs progeria présentent A) une augmentation des noyaux dysmorphiques, B) une diminution de l'expression de H3K9me3 et C) une augmentation du marquage β -galactosidase. Adapté de (Liu et al., 2011a).

Deux mois après la publication de ces travaux, la même équipe a montré que les cellules iPSCs progeria pouvaient également servir à évaluer l'efficacité d'un vecteur adénoviral corrigeant par recombinaison homologue le gène *LMNA* (Liu et al., 2011b) (Figure 31). L'objectif de ces travaux a été de démontrer l'efficacité d'un vecteur adénoviral HDAdV (pour Helper-Dependent Adenoviral Vector) pour restaurer l'expression de la lamine A sauvage en remplacement de la progrine. La correction génique a aussi été réalisée dans des iPSCs progeria, lesquelles ont ensuite été différenciées en fibroblastes et cellules musculaires

lisses pour observer l'impact sur les anomalies caractéristiques de la pathologie. Les résultats ont révélé une extinction complète de l'expression de progérine dans ces dérivés, associée à une réduction de la sénescence des cellules et une amélioration de 60 % des anomalies nucléaires. Afin d'étendre le champ d'application de la technique, les mêmes expériences ont été conduites sur des iPSCs générées à partir d'un patient souffrant du syndrome de Werner ainsi qu'un autre type cellulaire, des cellules souches mésenchymateuses adultes (Liu et al., 2011b).

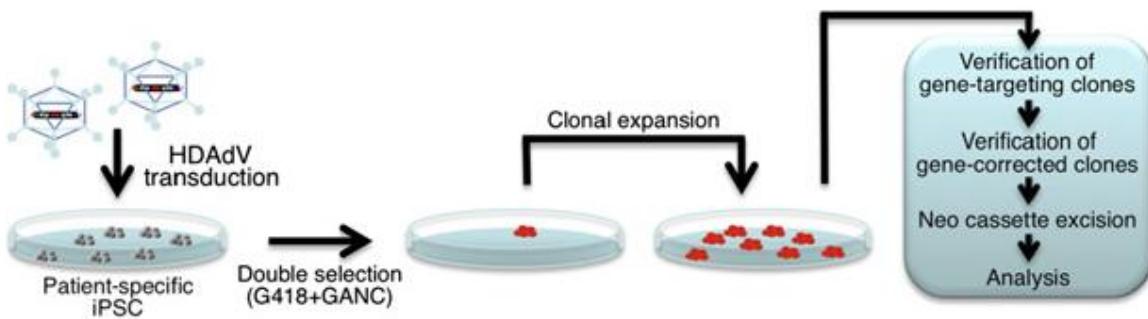


Figure 31 : Représentation schématique de l'approche de correction génique utilisée avec les iPSCs porteuses d'une laminopathie

La construction génique a été introduite par un vecteur adénoviral HDAdV dans des iPSCs mutées. Une sélection clonale des cellules ayant été transduites a été réalisée avec la génétidine (G418) et le ganciclovir (GANC). Le contrôle qualité de la transfection et les analyses fonctionnelles sont réalisées dans un second temps (Liu et al., 2011b).

La description détaillée de ces trois articles princeps est présentée dans la revue intitulée « *In vitro* » pathological modelling using patient-specific induced pluripotent stem cells: the case of progeria », présente en annexe de cette thèse.

Plus récemment, l'équipe de Kan Cao s'est focalisée sur les causes de la lipodystrophie observée chez les patients atteints par la progéria (Xiong et al., 2013) en différenciant et en étudiant des adipocytes à partir d'iPSCs. Les auteurs de cette étude ont tout d'abord mis en évidence une différenciation normale en adipocyte au cours de la première semaine d'induction. Toutefois, dès la deuxième semaine, ils ont observé que cette différenciation était ralentie aussi bien dans les EBs que dans des MSCs dérivées d'iPSCs progéria. Alors que ces adipocytes expriment normalement C/EBP β et C/EBP δ , deux facteurs de transcription impliqués dans les phases précoces de l'adipogénèse, PPAR γ 2 et C/EBP α - deux principaux régulateurs de la phase tardive de différenciation adipocytaire - étaient moins exprimés que dans des cellules contrôles (Figure 32). De même une douzaine de gènes pro-adipogéniques

ont également été réprimés dans les adipocytes progéria. Les cellules progéria ont donc été capables de répondre aux stimuli de différenciation adipogénique mais ne sont pas parvenues à terminer cette différenciation. Ce défaut de différenciation serait même accru avec l'âge élevé du donneur. Par ailleurs, les adipocytes générés présentaient un certain nombre de défauts associés à la progéria : une morphologie nucléaire anormale, une accumulation de cellules binucléées ou encore une augmentation de la sénescence des cellules (Xiong et al., 2013).

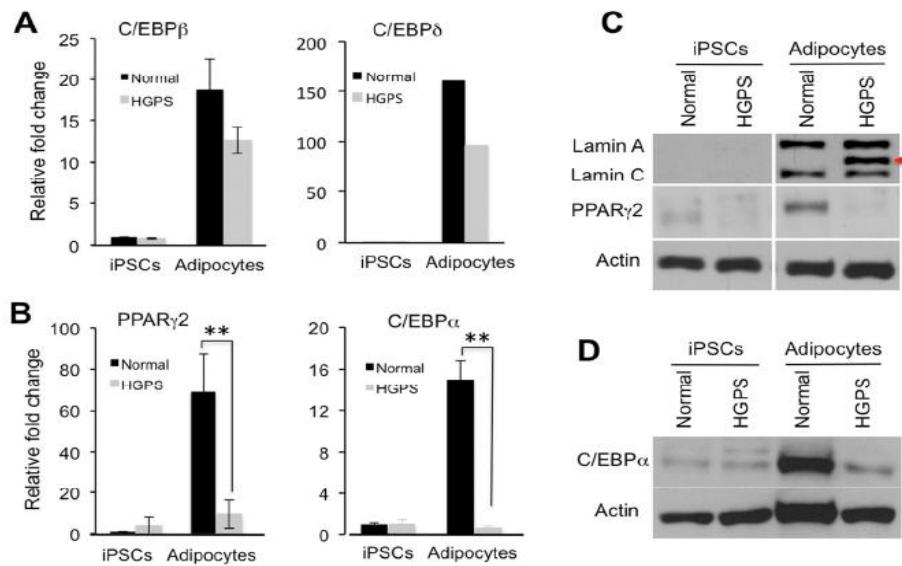


Figure 32 : Répression de la transcription de régulateurs adipogéniques par la progéria

A) et B) Analyses qPCR de l'expression des gènes précoces de l'adipogénèse C/EBP β et C/EBP δ et tardif PPAR γ 2 et C/EBP α dans les iPSCs et adipocytes normaux et progéria. C) et D) Analyses western blot de l'expression de la lamine A/C, de PPAR γ 2 et C/EBP α dans les iPSCs et adipocytes normaux et progéria (Xiong et al., 2013).

Ces différentes études ont également démontré que les iPSCs générées à partir de cellules de patients atteints par la progéria étaient un outil utile à plusieurs niveaux. Ces cellules permettent d'une part de modéliser la pathologie et de caractériser plus avant les défauts associés à la progéria. Elles offrent la possibilité d'exploiter des types cellulaires encore inexplorés dans cette pathologie, et de décortiquer les mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans la physiopathologie de la progéria. Le modèle d'iPSCs progéria permet, en outre, de travailler dans des conditions standardisées, reproductibles, qui n'avaient pas été possibles avec les modèles *in vitro* décrits précédemment.

III.3.2 Le criblage de petites molécules chimiques

III.3.2.1 Démarche générale

Le criblage pharmacologique est une étape située très en amont dans le développement d'un médicament (Figure 32). C'est une méthode d'investigation qui permet d'isoler, des touches (ou hits) de façon rapide et précise, parmi une sélection de petites molécules chimiques, classifiées dans une librairie. L'objectif d'une telle technique est de mettre en évidence le potentiel thérapeutique d'une nouvelle molécule pour une indication ciblée. Ce processus nécessite plusieurs étapes bien définies et codifiées : le criblage primaire, les re-tests, les contre-tests, les tests secondaires (Figure 33). Le criblage s'inscrit dans une démarche globale pour le développement de médicaments et ne constitue qu'un des maillons de ce long processus.

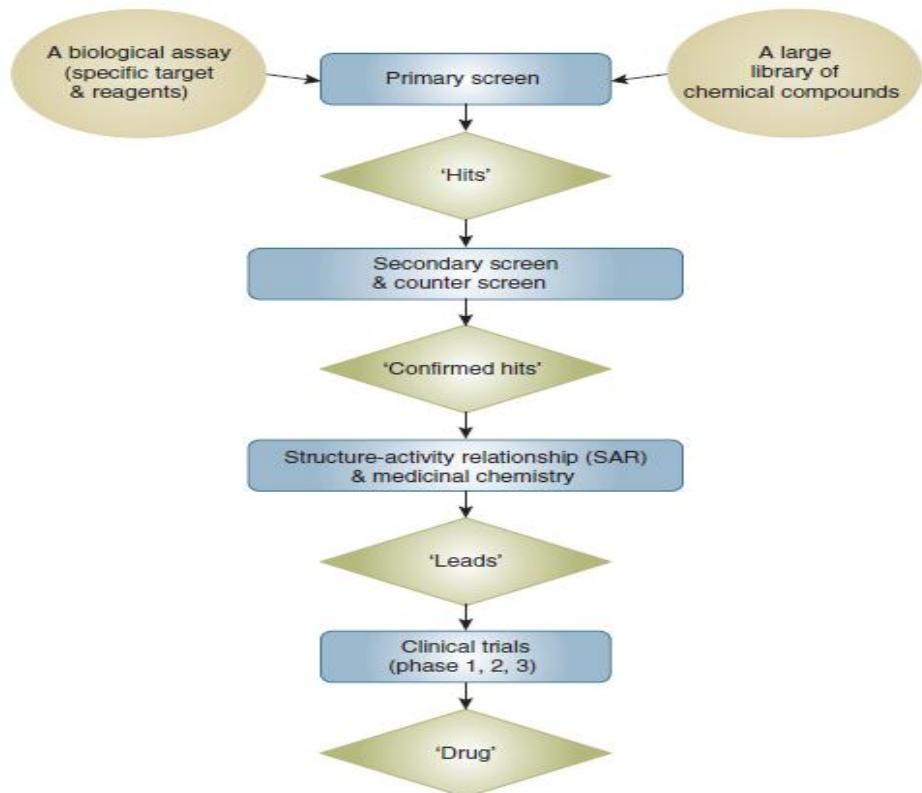


Figure 33 : Processus de la découverte d'un médicament en partant d'un criblage de molécules chimiques

La découverte d'un médicament passe par plusieurs étapes dont la première est la réalisation d'un criblage primaire suivie de contre-tests et de tests secondaires. A l'issue de cette étape, une plus petite quantité de hits sera optimisée grâce notamment aux techniques de chimie médicinale pour proposer un candidat à l'étude clinique, laquelle pouvant mener à la découverte d'un médicament (Malo et al., 2006).

III.3.2.2 Les différentes étapes d'un criblage

III.3.2.2.1 Le criblage primaire

La première étape consiste en la réalisation du criblage primaire. Ce criblage est effectué sur un modèle biologique caractérisé et validé en amont. Lorsque ce modèle biologique est cellulaire, son choix doit être pertinent : le type cellulaire sélectionné doit être affecté dans la pathologie ou du moins avoir une relation avec la physiopathologie. De plus, il doit être compatible avec les contraintes imposées par la technique de criblage, ce qui signifie que la ressource biologique doit être :

- disponible en quantité suffisante (plusieurs centaines de millions de cellules voire plusieurs milliards doivent être produites)
- congelable pour réutiliser les mêmes cellules pour effectuer les retests voire les contre-tests
- facilement exploitable dans des systèmes miniaturisés (exemple des cultures adhérentes)
- suffisamment résistante pour subir les tests.

La liste de ces critères drastiques permet de bien comprendre l'intérêt d'utiliser les iPSCs dans un tel contexte. Ces cellules ayant la capacité de se multiplier à l'infini, apportent un potentiel d'amplification que ne possèdent pas les cultures primaires de patients et permettent de travailler dans des conditions standardisées. C'est d'autant plus important pour des pathologies telles que la progéria pour lesquelles les modèles cellulaires font défaut. Le test de criblage nécessite également une mise au point poussée pour répondre, là encore, à des critères précis. Ces tests doivent être :

- quantifiables afin de déterminer des seuils de sélection et de classifier les scores de chaque molécule.
- simples. Le nombre d'étapes, la durée, le nombre de réactifs et de techniques impliqués doivent être réduits au minimum afin de diminuer les erreurs relatives à chacun des facteurs impliqués dans le processus du test.
- miniaturisables et automatisables de manière à réduire les coûts et augmenter le rendement. Ils peuvent se dérouler dans des plaques 96, 384 ou 1536 puits (Noah, 2010).

- robustes, en d'autres termes ils doivent être stables et fiables dans le temps. Ils sont définis par le Z'facteur (Zhang et al., 1999), un paramètre indispensable à évaluer. Celui-ci, compris entre 0 et 1, doit se rapprocher de 1 pour être le plus robuste possible. Nous estimons qu'un test est suffisamment robuste lorsque ce Z'facteur est supérieur à 0,5.
- sensibles avec pour objectif de diminuer les faux négatifs et sélectionner tous les composés potentiellement actifs sur le test choisi.
- spécifiques pour éviter les faux positifs et diminuer la liste des composés sélectionnés alors qu'ils ne devraient pas l'être.
- reproductibles pour échapper à la variabilité intra et inter-expériences.
- le moins coûteux possible. La miniaturisation, le choix des réactifs et la durée du test sont les principaux facteurs qui peuvent faire fluctuer le coût du criblage.

Une fois le modèle d'étude choisi et le test élaboré, il faut identifier les chimiothèques à tester. Les grands groupes pharmaceutiques ont à leur disposition des millions de molécules issues de synthèses antérieures qui n'ont pas données de suites thérapeutiques ainsi que des molécules naturelles (Macarron et al., 2011). Le choix de la chimiothèque est stratégique. Elle peut être constituée de molécules ciblées qui reconnaissent un type de protéines données, ou qui ont des propriétés connues, ou encore une structure particulière avec un pharmacophore identifié. Elle peut être également constituée de molécules prises au hasard sans *à priori*. Le risque est alors de n'isoler aucun hit mais augmente aussi la probabilité de découvrir de nouvelles structures, de nouveaux mécanismes d'action plus faciles à breveter (Hüser, 2006). Enfin, il existe des chimiothèques constituées de molécules qui possèdent déjà une autorisation de mise sur le marché. L'objectif d'une telle banque est d'identifier des molécules pour lesquelles tout, ou presque, est déjà connu, ce qui allège les démarches en aval, mais qui permet de repositionner une molécule dans une nouvelle indication. Ce type de criblage a souvent été mis en jeu dans le cas de maladies rares (Ekins et al., 2011) (Muthayala, 2011). Dans l'exemple du criblage que nous avons mené, nous avons choisi de combiner deux stratégies, évaluant à la fois l'efficacité de molécules déjà sur le marché et des molécules pour lesquelles rien n'était décrit.

III.3.2.2 L'analyse du criblage primaire

Le test du criblage primaire doit distinguer de manière précise, avec un fort degré de confiance, les hits des autres molécules présentes au sein d'un de la chimiothèque. Dans

l'analyse des données, la mise en place de la stratégie statistique et le choix des contrôles négatifs et positifs ont toute leur importance. Ils sont disposés à l'intérieur de chaque plaque afin de s'affranchir, lors de l'analyse, de la variabilité inter-plaque et de déterminer le niveau de bruit de fond (Malo et al., 2006). Ils servent de support pour la normalisation des données qui peut d'ailleurs se faire par trois méthodes distinctes :

- le pourcentage du contrôle : $POC = (X_i/M_{c+}) \times 100$
- le pourcentage d'inhibition normalisé : $NPI = (M_{c+} - X_i) / (M_{c+} - M_{c-})$
- la méthode du Z score : $Z = (X_i - M_x) / SD_x$

Où X_i est la mesure brute du composé i , M_{c+} est la moyenne des mesures brutes des contrôles positifs, M_{c-} est la moyenne des mesures brutes des contrôles négatifs, M_x est la moyenne de toutes les mesures à l'intérieur de la plaque et SD_x est la déviation standard de toutes les mesures à l'intérieur de la plaque. La méthode des Z scores, retenue dans la réalisation de notre criblage, émet l'hypothèse que la plupart des composés sont inactifs et peuvent servir de contrôle. Les moyennes peuvent être calculées sur les échantillons de la totalité de la plaque, on appelle cela le Z score plaque, ou sur la moyenne des échantillons de l'ensemble du criblage, cela s'appelle alors le Z score run. Dans ce type d'analyse, les contrôles positifs et négatifs servent simplement de contrôle qualité du criblage.

Une fois la normalisation réalisée, l'étape de seuillage va permettre d'isoler les touches les plus pertinentes. Le seuil est alors défini comme le nombre de déviations standards qui séparent la valeur calculée pour l'échantillon et la moyenne des données normalisées. Habituellement, cet écart est placé à un minimum de trois déviations standards. Le risque de diminuer cet écart est de sélectionner des faux positifs et le risque de trop l'augmenter est de ne pas sélectionner des molécules potentiellement actives.

III.3.2.2.3 L'étape de confirmation

L'étape de confirmation a pour objectif d'éliminer les faux positifs. Le plus fréquemment, les re-tests se font sur le même test et dans des conditions identiques à celles de la campagne primaire par « cherry-picking ». Cette expression anglophone signifie que les hits primaires identifiés sont reformatés dans des plaques de re-test à partir des plaques sources des chimiothèques utilisées pour le criblage primaire. Cette étape ne nécessite pas de mise au point particulière - si ce n'est d'optimiser l'étape robotisée du prélèvement des hits - ni aucune néo-synthèse de molécules chimiques. C'est uniquement une reproduction du criblage

primaire pour les hits sélectionnés. Typiquement, elle se fait en répliquât (N=4 ou N=8) contrairement au criblage primaire.

Cette étape de re-test est suivie par une étude de la relation dose-réponse, qui consiste à évaluer l'effet des hits, le plus souvent sur le test utilisé pour le criblage primaire, à différentes concentrations. L'objectif est de confirmer une nouvelle fois l'action des hits sélectionnés mais essentiellement de mieux caractériser leur efficacité. Ainsi, la gamme de concentration réalisée permet de dresser une courbe à partir de laquelle différents paramètres pourront être calculés. Le paramètre le plus important est la puissance de la molécule, c'est-à-dire la concentration de composé nécessaire à l'obtention d'un effet donné. Généralement, c'est la concentration qui donne 50 % d'efficacité ou d'inhibition (EC₅₀ pour effective concentration 50 %, ou IC₅₀ pour inhibitory concentration 50 %) qui est calculée. Cette valeur pourra servir à comparer la puissance des drogues sélectionnées et identifier la concentration la plus adaptée pour réaliser les tests en aval. D'ordinaire, elle se fait sur des néo-synthèses de composés de manière à éliminer des hits qui auraient été sélectionnés à cause d'erreurs de synthèse ou dans la mise en forme des collections chimiques en plaque (Boisclair MD, 2002).

Afin de s'assurer de la spécificité des molécules isolées, un contre-test peut parfois être réalisé. Il permettra d'éliminer les molécules qui agissent sur la cible recherchée de manière aspécifique en produisant le même effet en lecture finale. Ce type de test est plus facilement applicable au criblage dit basé sur la cible, qu'au criblage dit phénotypique.

III.3.2.2.4 Les tests secondaires

Après avoir validé les hits, il est nécessaire de les caractériser plus finement. L'étape des tests secondaires permet de détailler l'action de ces molécules sur d'autres phénotypes ou d'autres réactions chimiques, mais apporte une nouvelle possibilité d'éliminer certaines molécules. En fonction des critères définis en amont, une molécule peut être éliminée ou placée en réserve si elle n'y répond pas. Cette pression de sélection exercée à chaque étape est nécessaire pour ne conserver que les molécules les plus intéressantes.

III.3.2.2.5 La suite du criblage

Le criblage ne constitue qu'un palier filtrant pour isoler les molécules les plus pertinentes à partir d'une énorme quantité de départ. Il reste cependant un long chemin à parcourir avant d'arriver à un médicament. En premier lieu, les molécules choisies vont être triées par famille chimique. A partir de ces familles, vont être recherchées des relations entre la structure et

l'activité de la molécule ou SAR. Le rôle de la chimie combinatoire et médicinale est primordial dans cette étape afin d'optimiser chimiquement des têtes de série (lead). En parallèle de ce travail structural, des études mécanistiques, physicochimiques (taille, solubilité dans l'eau, lipophilie, drugabilité), de sécurité et d'ADME (Administration, Distribution, Métabolisme et Elimination) (Lipinski, 2000) sont réalisées pour caractériser les molécules d'un point de vue pharmacocinétique et toxicologique. Tous ces tests sont pratiqués *in vitro* mais également *in vivo* pour étudier leur comportement dans un organisme entier. A l'issu de cette étude préclinique multifactorielle, les candidats isolés qui auront passés tous les filtres de sélection pourront être testés cliniquement chez l'homme.

III.3.2.3 Différents types de criblage

Il existe deux grands types de criblage, les criblages phénotypiques et les criblages basés sur la cible. Les tests phénotypiques se font sur du matériel biologique vivant au sein d'un contexte cellulaire. Cela peut se faire sur les bactéries, des virus, des champignons, des parasites, des cellules de mammifères, des cellules humaines natives ou génétiquement modifiées ou dans notre cas des cellules dérivées d'iPSCs. Ces tests vont étudier le potentiel prolifératif de ces cellules, la production d'un métabolite, une synthèse protéique, une signalisation cellulaire, un flux ionique. Il existe autant de tests possibles que de processus biologiques. Les tests de criblage basés sur la cible vont, quant à eux, évaluer la capacité de liaison d'un récepteur, d'une protéine avec les molécules de la chimiothèque. Ils peuvent également mesurer une activité enzymatique ou la force d'interaction protéine/protéine après traitement. Ce sont des tests biochimiques plus simples à mettre en œuvre.

L'avantage majeur d'un criblage phénotypique est qu'il ne nécessite pas de comprendre le mode d'action d'une molécule mais uniquement son activité potentiellement thérapeutique. Il est donc nécessaire de créer un test de criblage qui traduit le plus précisément possible le phénotype recherché en amont. Plus l'essai sera caractérisé en amont, meilleure et plus facile sera l'interprétation des résultats. Seule l'étape suivante cherchera à comprendre le mécanisme d'action des molécules sélectionnées pour mieux anticiper ses effets non spécifiques. Ce travail de recherche de la cible après un criblage phénotypique reste un réel challenge mais les techniques de protéomique, de « docking », ainsi que les évolutions de la bio-informatique permettent de mieux gérer cet obstacle. De par la complexité des tests, le débit des criblages phénotypiques et donc la taille de la chimiothèque investiguée sont souvent plus faibles que les criblages basés sur la cible, plus simples à mettre en œuvre

(Eggert, 2013). A l'inverse, le criblage basé sur la cible est plus artificiel et ne traduit pas nécessairement une répercussion biologique mais se focalise précisément sur le mécanisme d'action de la molécule et ses propriétés chimiques. Un tel essai permet donc de sélectionner précocelement une molécule pour son action moléculaire et de par sa simplicité, autorise un débit de test très élevé. De manière très schématique, le criblage à haut débit (HTS pour High Throughput Screening) est attribué au criblage basé sur la cible alors que les criblages à haut contenu ou HCS pour High Content Screening sont plutôt assignés aux criblages phénotypiques de par les contraintes mises en jeu. Cependant, cette association n'est pas systématique.

Entre 1999 et 2008, la FDA (Food and Drug Administration) a autorisé la mise sur le marché de 183 petites molécules, 20 produits de contrastes utilisés pour l'imagerie médicale et 56 nouvelles thérapies biologiques. Parmi ces molécules, seules 75 ont été des innovations en créant de nouvelles classes thérapeutiques avec de nouveaux mécanismes d'action. Parmi ces 75 molécules, 28 soit 37 %, ont été isolées par un criblage phénotypique et 14 soit 23 % par un criblage basé sur la cible (Swinney and Anthony, 2011). Ces chiffres montrent l'importance que prend ce type de criblage dans la découverte de médicaments innovants. Certes plus risqué, le criblage phénotypique est aussi le plus novateur et prometteur en termes de développement des médicaments d'avenir.

III.3.2.4 Criblages à partir d'iPSCs (Figure 33)

En 2009, le premier criblage de molécules réalisé sur des ESCs a été décrit dans la littérature. Ce criblage, réalisé par ARN interférence à l'échelle du génome entier avait pour but d'identifier de nouveau facteur modulateur d'Oct4 impactant sur l'état souche des cellules (Ding et al., 2009). L'année suivante, 2.4 millions de molécules ont été testées sur des neurones dérivés d'ESCs de souris, identifiant une molécule qui potentialiserait un sous type de récepteur glutamatergique (McNeish et al., 2010). Depuis ce travail, les criblages à haut débit à partir de cellules souches embryonnaires humaines et de leur dérivés n'ont cessé d'apporter de nouvelles connaissances à la communauté scientifique, jusqu'à cette année encore avec le travail d'une équipe d'I-Stem (Charbord et al., 2013).

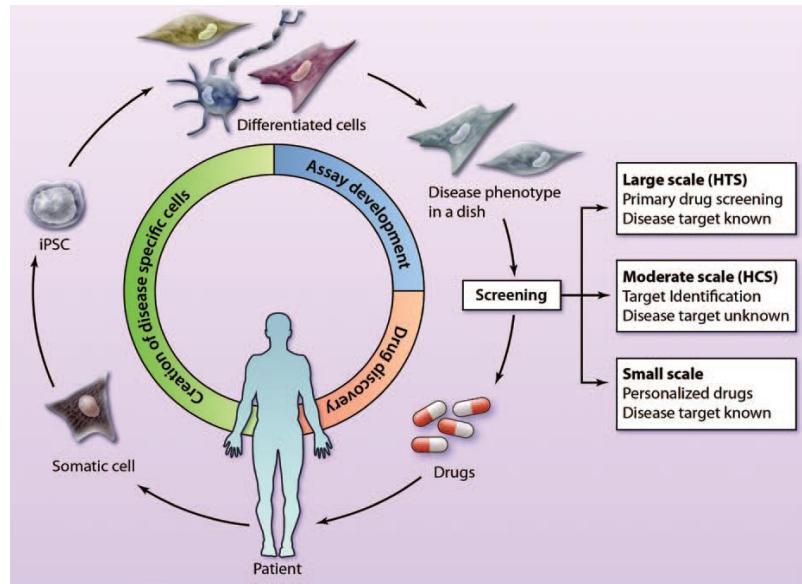


Figure 34 : Utilisation des iPSCs pour la recherche de médicaments

A partir de cellules somatiques de patients, des iPSCs pathologiques sont générées. Elles sont ensuite différencierées dans des types cellulaires pertinents pour étudier la pathologie. Ces cellules matures servent alors de ressource centrale pour développer un test de criblage qui permettra de sélectionner des molécules potentiellement thérapeutiques sur un critère prédéfini. Ce criblage peut se faire à trois niveaux : le HTS, le HCS ou à petite échelle avec une petite chimiothèque préalablement établie pour la pathologie investiguée (Mercola et al., 2013)

En 2012, le premier criblage à partir d'iPSCs a été décrit en fin d'année dernière, soit cinq ans après la découverte des iPSCs (Lee et al., 2012) (Figure 34). Cette campagne de criblage a été réalisée dans le contexte pathologique de la dysautosomie familiale. Cette maladie génétique autosomique récessive est due à une mutation dans le gène codant pour le complexe kinase I- κ -B (*IKBKAP*), provoquant une diminution de l'expression de la protéine résultante. Ce défaut d'expression affecte notamment le système nerveux périphérique. L'objectif de ce travail était de dégager des molécules capables d'augmenter l'expression du complexe délétère dans des précurseurs neuronaux de la crête neurale dérivés d'iPSCs. Le test de criblage était basé sur la mesure de l'expression du gène *IKBKAP* grâce à une technique d'extraction et de qRT-PCR automatisée. Dans cette étude, 6912 petites molécules ont été ciblées permettant l'identification, après les étapes de tests secondaires, d'isoler huit hits dont le SKF-56466. Les tests fonctionnels réalisés sur cette molécule ont permis de démontrer que le SKF-56466 était non seulement capable de restaurer l'expression de *IKBKAP* mais également d'augmenter l'expression de CREB phosphorylé, marqueur de la crête neurale, et du récepteur α -2-adrénergique. Les auteurs de ces travaux ont également cherché à

comprendre le mécanisme d'action de ce hit, mettant ainsi en évidence une augmentation de l'AMP cyclique intracellulaire après traitement (Lee et al., 2012).

Plus récemment, le groupe de Yoon-Young Jang a également publié les résultats d'un criblage à haut débit de 3131 molécules sur des hépatocytes dérivés d'iPSCs déficients pour l' α -1-antitrypsine (AAT). L'insuffisance d'AAT est une maladie génétique causée par la synthèse d'une AAT mutante qui va spontanément polymériser et s'accumuler dans le réticulum endoplasmique des hépatocytes créant un dysfonctionnement de ces derniers. Le principe du test de criblage a été de mesurer la fluorescence émise par un anticorps spécifique de l'AAT dans chaque puits. Ainsi cinq hits capables de diminuer l'expression intracellulaire d'AAT au niveau protéique ont été isolés. Les molécules testées, ayant déjà reçu une autorisation de mise sur le marché, possèdent un mécanisme d'action commun, elles diminuent l'inositol intracellulaire. Sachant que le niveau d'expression réduit d'AAT protéique n'était pas associé à une diminution de son expression au niveau transcriptionnel, les auteurs ont supposé que la disparition d'AAT était due à une augmentation de son catabolisme (Choi et al., 2013).

Enfin, plus récemment encore, un troisième criblage à haut débit de 1000 molécules a été décrit avec pour objectif d'identifier des modulateurs de la prolifération et/ou la survie des progéniteurs neuronaux (NSCs) dans un cadre sain (McLaren et al., 2013). *In fine*, l'idée était de potentialiser la différenciation et l'expansion des NSCs *in vitro* de manière à optimiser les conditions d'obtention de ressource biologique pour la thérapie cellulaire. Ainsi, outre les aspects de culture automatisée, les auteurs de ces travaux ont décrit le criblage de 1000 petites molécules sur un test de viabilité basé sur la mesure de la quantité d'ATP produite. Parmi ces 1000 composés sélectionnés en amont, cinq induisaient une augmentation de la prolifération de NSCs, dont un a été relié à la modulation de Cdk-2 de manière dose-dépendante (McLaren et al., 2013).

Ces trois exemples mettent en avant la possibilité d'utiliser les dérivés d'iPSCs pour réaliser des criblages à haut débit de petites molécules. Ils ouvrent ainsi la perspective de réaliser de telles études dans d'autres maladies monogéniques et particulièrement dans la progéria.

IV. Objectifs de la thèse

Comme nous l'avons vu au travers de cette introduction, la progéria est une maladie orpheline pour laquelle il n'existe, à l'heure actuelle, aucun traitement curatif. Certes les patients se voient proposer différentes solutions thérapeutiques au travers d'essais cliniques. Faute de modèles compatibles avec les conditions standardisées que nécessitent les études de pharmacologie à large échelle, les médicaments proposés aux patients ont tous été issus de stratégies de repositionnement, au travers de leur capacité à inhiber la farnésylation. Devant l'urgence de la situation de ces patients, l'identification de nouvelles solutions thérapeutiques est un défi que nous avons entrepris de relever au cours de cette thèse (Figure 34). Ce travail, réalisé sous la co-direction des Drs Xavier Nissan et Marc Peschanski, a eu pour objectif initial de mettre en place un modèle pharmacologique de ce syndrome.

A cet effet, la première partie de ma thèse a consisté à développer un modèle d'étude récapitulant ce syndrome tout en étant compatible avec les contraintes du criblage de composés chimiques. Pour cela le potentiel unique des cellules souches pluripotentes a été mis à contribution. Après avoir démontré que ce modèle récapitulait les principaux défauts associés à ce syndrome, nous avons cherché à approfondir les connaissances sur les mécanismes moléculaires à l'origine de ce vieillissement accéléré. La deuxième partie de ce travail de thèse a été consacrée à donner une valence pharmacologique à ce modèle d'étude en caractérisant l'effet des différents traitements actuellement utilisés en clinique ou proposés comme thérapie potentielle dans la progéria. Enfin, la dernière partie de ce projet de thèse, s'est focalisée sur le développement et la réalisation d'un criblage à haut contenu de plusieurs milliers de petites molécules.

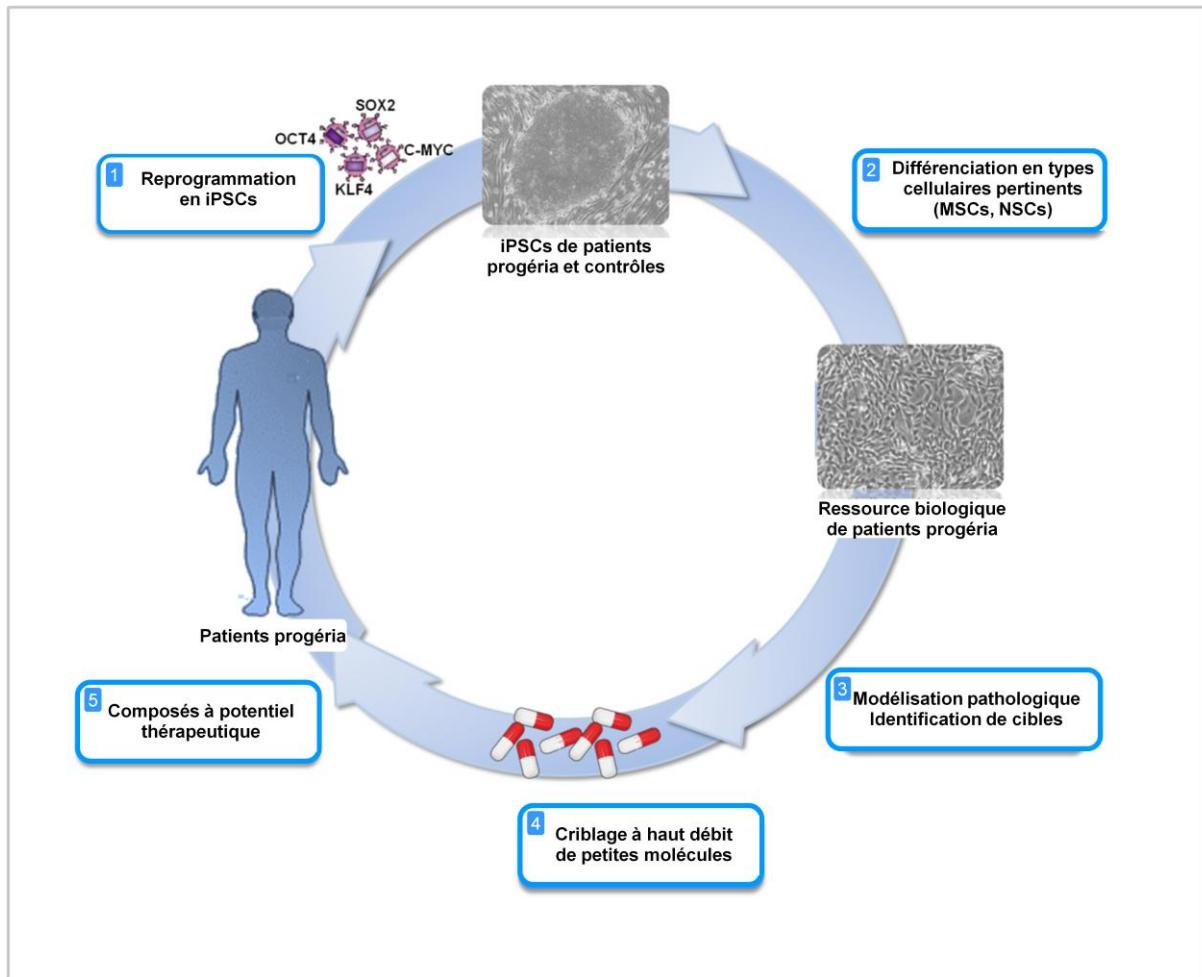


Figure 35 : Objectifs de la thèse

Résultats

I. Découverte du rôle de miR-9 dans la protection des neurones dans la progéria

Titre de l'article : Unique Preservation of Neural Cells in Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome Is Due to the Expression of the Neural-Specific miR-9 MicroRNA

Auteurs : Xavier Nissan, Sophie Blondel, Claire Navarro, Yves Maury, Cécile Denis, Mathilde Girard, Cécile Martinat, Annachiara De Sandre-Giovannoli, Nicolas Levy, and Marc Peschanski

Journal : Cell Reports 1, 1-9, June 28, 2012

I.1 Contexte de l'étude

La progéria est un syndrome systémique qui provoque un vieillissement prématué des enfants qui en sont atteints. Les patients présentent un grand nombre de pathologies, habituellement associées au vieillissement physiologique, telles qu'une ostéoporose ou une athérosclérose sévère à l'origine de leur décès précoce (Merideth et al., 2008). Etonnamment, les patients ne présentent pas de syndrome neurodégénératif et affichent des capacités cognitives normales. Pour des raisons évidentes d'accessibilité, l'origine de cette spécificité tissulaire reste cependant à élucider. Ainsi, dans cette étude publiée en 2012 dans la revue Cell Reports, nous avons cherché à utiliser le potentiel des cellules souches pluripotentes pour comprendre les mécanismes moléculaires à l'origine de cette neuroprotection.

I.2 Mise en place d'un modèle iPSC de la progeria

Dans un premier temps, deux lignées d'iPSCs ont donc été générées à partir de fibroblastes de patients atteints par la progéria grâce à la méthode de Yamanaka (Takahashi et al., 2007). Une fois établies, ces iPSC ont été caractérisées par cytométrie en flux et immunofluorescence sur leur expression de marqueurs caractéristiques de la pluripotence Oct4, Tra-1-81 et SSEA4 (Figure 1B et C). L'analyse par PCR quantitative a également montré un niveau d'expression similaire à des cellules souches embryonnaires humaines des marqueurs OCT4, LEFTB, NANOG, CRIPTO et DNMT3B (Figure 1A). Une fois caractérisées, ces iPSCs ont ensuite été

différentiées dans plusieurs types cellulaires incluant MSCs, mélanocytes, kératinocytes, RPE, NSC, astrocytes, neurones et motoneurones (Figure 2A). Cette étude a notamment montré qu'un type cellulaire, les MSCs présentaient un certain nombre de défauts caractéristiques de la progeria tel qu'une déformation de leur enveloppe nucléaire ou une sénescence prématuée.

I.3 Mise en évidence du rôle miR-9 dans la régulation de la lamin A

L'étude du niveau d'expression des lamines de types A a également montré que parmi ces différents types cellulaires, ni les iPSCs, ni les NSCs, n'exprimaient ces protéines. Cette observation a été confirmée à la fois par immunomarquage et par cytométrie en flux (Figure 2A et B). Partant de ce constat, notre travail s'est construit sur l'hypothèse qu'un facteur, spécifiquement produit par les neurones, pouvait inhiber la production de lamine A dans ces cellules. Nos travaux se sont alors focalisés sur les microARNs, ces petits ARNs capables de réguler le niveau d'expression de très nombreux gènes au niveau post-transcriptionnel. C'est ainsi que nous avons démontré par une analyse bioinformatique prédictive que seulement deux microARNs, miR-129-5p et miR-9, pouvaient théoriquement se lier à la séquence 3' non traduite (UTR) de la lamine A (Figure 3A). L'un d'entre eux, miR-9, étant spécifiquement exprimé dans les cellules neurales, nos travaux ont cherché à explorer l'interaction de ce microARN avec sa cible prédictée (Figure 3B).

La première étape de cette étude a consisté à surexprimer artificiellement ce microARN dans des MSCs pour évaluer son impact sur l'expression de la lamine A. Nos travaux ont ainsi démontré que la surexpression de miR-9 pouvait induire une diminution de la quantité de progérine dans des MSCs progéria mais également de la forme normale de la lamine A aussi bien dans les cellules saines que progéria (Figure 3C et D). Dans le but de démontrer l'interaction physique de miR-9 avec le 3'UTR de la lamine A, un plasmide surexprimant la luciférase sous le contrôle de ce 3'UTR a été introduit dans des MSCs avec ou sans le microARN miR-9. Cette étude a ainsi dévoilé que miR-9 interagissait physiquement avec le 3'UTR de la lamine A pour en réguler sa production (Figure 3F, G et F).

I.4 Etude du potentiel thérapeutique de miR-9

MiR-9 étant capable de diminuer la production de progérine dans des MSCs progeria, nous avons cherché à mesurer l'impact de cette diminution sur l'atteinte pathologique de ces cellules. Nous avons ainsi évalué l'effet de la surexpression de miR-9 sur l'état de déstructuration de leur enveloppe nucléaire. La quantification de ce paramètre après introduction de miR-9 a ainsi permis de démontrer que miR-9 pouvait améliorer de manière significative et dose dépendante ce phénotype (Figure 4A, B et C).

I.5 Conclusion

L'ensemble de ces résultats a mis en évidence un mécanisme moléculaire unique potentiellement à l'origine de la protection des neurones chez les patients atteints de progéria. Alors que miR-9 avait auparavant montré son implication dans le développement du cerveau chez la souris (Smirnova et al., 2005) et dans la différenciation neuronale chez l'homme (Delaloy et al., 2010) il dévoile à travers ces expérimentations, son rôle dans l'extinction de l'expression de la lamine A. Récemment, l'équipe de Loren Fong a émis l'hypothèse que miR-9 régulait l'expression de la prélamine A chez la souris (Jung et al., 2012). Nos données corrèlent avec cette hypothèse et montrent que ce mécanisme de protection neuronale est conservé chez l'humain. Sa spécificité d'expression dans les cellules du lignage neuronal, apporte un élément de compréhension à l'absence d'atteintes cognitives chez les enfants atteints par la progéria.

Unique Preservation of Neural Cells in Hutchinson- Gilford Progeria Syndrome Is Due to the Expression of the Neural-Specific miR-9 MicroRNA

Xavier Nissan,^{1,*} Sophie Blondel,^{2,3} Claire Navarro,⁴ Yves Maury,¹ Cécile Denis,¹ Mathilde Girard,¹ Cécile Martinat,^{2,3} Annachiara De Sandre-Giovannoli,^{4,5} Nicolas Levy,^{4,5} and Marc Peschanski^{1,2,3}

¹CECS

²INSERM U-861

³UEVE U-861

I-STEM, AFM, Institute for Stem Cell Therapy and Exploration of Monogenic Diseases, 5 rue Henri Desbruyères, 91030 Evry cedex, France

⁴AMU-INSERM UMR_S 910 Génétique médicale et génomique fonctionnelle, Faculté de Médecine la Timone, 27 Boulevard Jean Moulin, 13385 Marseille, France

⁵Département de Génétique Médicale, Hôpital d'Enfants la Timone, 264 Rue St. Pierre, 13385 Marseille, France

*Correspondence: xnissan@istem.fr

DOI [10.1016/j.celrep.2012.05.015](https://doi.org/10.1016/j.celrep.2012.05.015)

SUMMARY

One puzzling observation in patients affected with Hutchinson-Gilford progeria syndrome (HGPS), who overall exhibit systemic and dramatic premature aging, is the absence of any conspicuous cognitive impairment. Recent studies based on induced pluripotent stem cells derived from HGPS patient cells have revealed a lack of expression in neural derivatives of lamin A, a major isoform of *LMNA* that is initially produced as a precursor called prelamin A. In HGPS, defective maturation of a mutated prelamin A induces the accumulation of toxic progerin in patient cells. Here, we show that a microRNA, miR-9, negatively controls lamin A and progerin expression in neural cells. This may bear major functional correlates, as alleviation of nuclear blebbing is observed in nonneural cells after miR-9 overexpression. Our results support the hypothesis, recently proposed from analyses in mice, that protection of neural cells from progerin accumulation in HGPS is due to the physiologically restricted expression of miR-9 to that cell lineage.

INTRODUCTION

Hutchinson-Gilford progeria syndrome (HGPS or progeria) is an extremely rare disease characterized by phenotypic features of premature and accelerated aging in children (Hennekam, 2006). HGPS is typically caused by a *de novo* transition (c.1824C > T) in *LMNA* (De Sandre-Giovannoli et al., 2003; Eriksson et al., 2003), encoding major components of the nuclear lamina, the lamins A and C (Burke and Stewart, 2006). While apparently silent (p.G608G), the HGPS mutation activates a cryptic splicing site leading to the production and accumulation of progerin, a truncated form of prelamin A, the lamin A

precursor (De Sandre-Giovannoli et al., 2003; Eriksson et al., 2003). Progerin is aberrantly farnesylated and leads to various subcellular abnormalities when it accumulates in HGPS nuclei. These defects include misshapen nuclei, changes in spatial distribution of nuclear pore complexes (Goldman et al., 2004), chromatin disorganization (Columbaro et al., 2005), genomic instability (Liu et al., 2005), and premature cell senescence (Navarro et al., 2006). HGPS-affected patients develop cardiovascular disease, heart failure, and stroke, uniformly leading to death at a mean age of 13 years old. While most of the tissues and organs are affected with defects reminiscent of aging (Merideth et al., 2008), it is intriguing that cognitive functions are preserved, suggesting a remarkable sparing of central nervous system through the entire patient's life course. The molecular bases have been sought here, by taking the opportunity of obtaining neural cells *in vitro* from patients affected with HGPS through derivation of induced pluripotent stem cells (iPSC).

Over the past 10 years, molecular mechanisms of HGPS have mostly been approached *in vitro* using peripheral cells—genetically modified or not—issued from skin, blood, or bone marrow (Misteli and Scaffidi, 2005; Paradisi et al., 2005). In several instances, these cells were not directly relevant for extrapolation to the behavior of other cell types, especially neural cell lineages. Meanwhile, previous reports had revealed the absence of lamin A expression in chicken and mouse embryonic brains (Lehner et al., 1987; Röber et al., 1989). The recent emergence of the iPSC technology has rapidly prompted the derivation of a number of cell lines derived from HGPS patients, increasing considerably the number of cell types of interest (Ho et al., 2011; Liu et al., 2011a, 2011b; Zhang et al., 2011). Among them, a particular focus was set to neural cells that have allowed authors to confirm, in humans, the absence of a significant expression of lamin A in cells of the neural lineage *in vitro*, and, as an expected functional correlation, the subsequent lack of nuclear blebbing (Zhang et al., 2011). However, molecular mechanisms at the origin of this specific preservation of cells of the neural lineage still remain to be elucidated. Recently, Loren Fong and colleagues have gone one step further by proposing miR-9 as

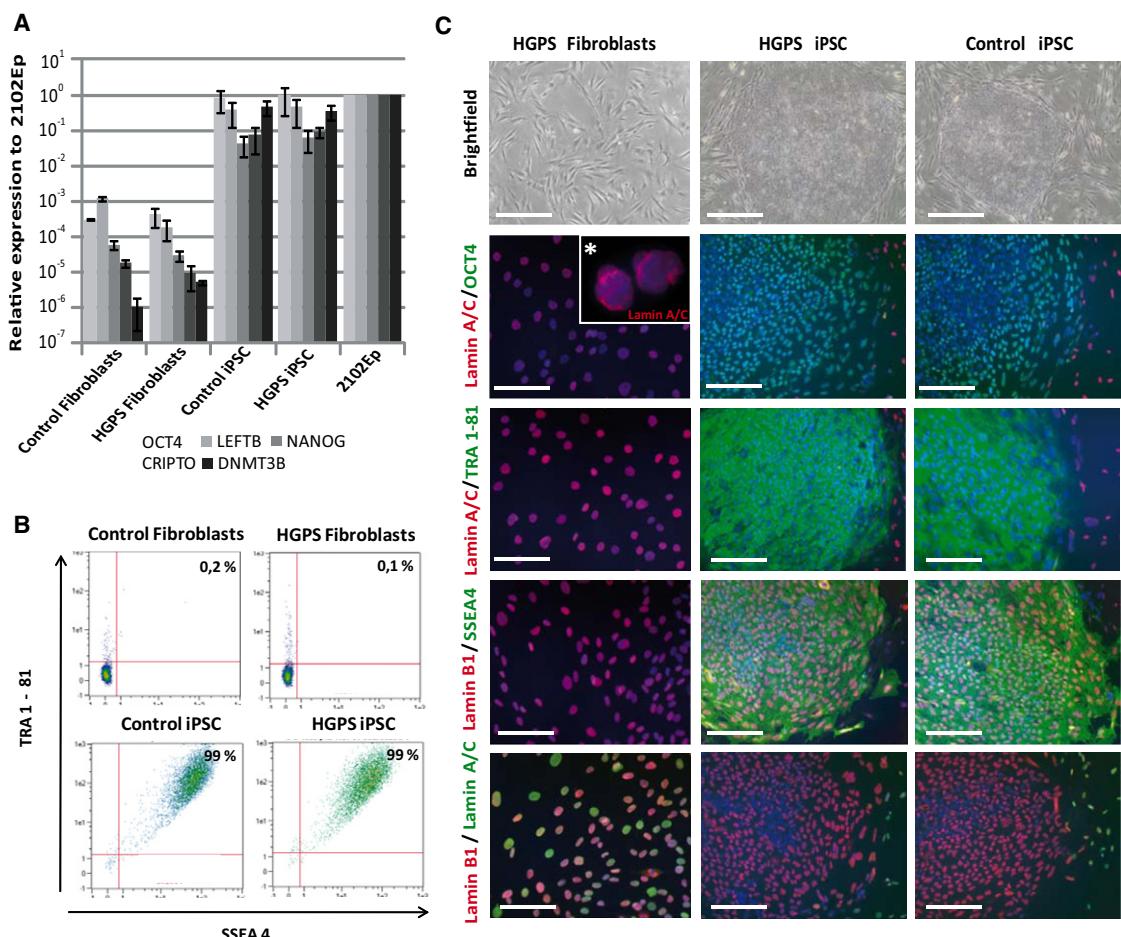


Figure 1. Molecular Characterization of Control and HGPS iPSC

(A) qRT-PCR analysis of pluripotency and self-renewal markers OCT4, LEFTB, NANOG, CRIPTO, DNMT3B in control and HGPS fibroblasts and iPSC. Data are normalized on teratocarcinoma cells (EP2102). Each histogram represents the means \pm SD of three independent experiments.

(B) Flow cytometry analysis of pluripotency and self-renewal markers TRA 1-81 and SSEA4 in fibroblasts in control and HGPS fibroblasts and iPSC. Values indicate means \pm SD of three independent experiments.

(C) Immunostaining of lamin A/C (JOL2 and ab8984 antibodies) and lamin B1 and pluripotency and self-renewal markers OCT4, TRA 1-81, and SSEA4 in HGPS fibroblasts, undifferentiated control and HGPS iPSC. *Boxes represent higher magnification. Scale bar is 50 μ m.

See also Figure S1.

a potential regulator of lamin A expression in mouse neural cells (Jung et al., 2012). These authors have associated the absence of lamin A in murine neurons to a regulation by microRNAs and identified miR-9, a neural specific microRNA, as an effective regulator. Here, we have extended those results to neural precursors and neurons of HGPS patients, using the iPSC technology.

RESULTS

iPSC were generated from HGPS and control patients fibroblasts (Figures 1A and 1B). As previously described, A-type lamins were absent from undifferentiated iPSC (Figure 1C). In contrast, their expression was observed in a variety of iPSC-derived cells including keratinocytes, melanocytes, retinal pigment epithelial cells, and mesenchymal stem cells (MSC-

iPSC) (Figures 2A and 2B; Table S1). Because MSC derived from HGPS iPSC presented the commonly described abnormalities of HGPS iPSC derivatives, namely, loss of proliferation capacities, premature senescence and nuclear blebbing (Figures S1A–S1E), we have used, thereafter, these cells as a “positive control” for comparison with cells of neural lineages. Differentiation of iPSC along the neural lineage was obtained for both control and HGPS cell lines, up to near-homogeneity following their differentiation into neural stem cells (NSC-iPSC), and after terminal differentiation into telencephalic neurons (Neurons-iPSC) (Figures S2A–S2C). Immunostaining and flow cytometry analysis using both anti-lamins A/C and specific anti-lamin A antibodies, confirmed the absence of these lamins in NSC-iPSC in contrast to a high expression of lamin B1 (Figures 2A and 2B and Figure S2D). The lack of lamins A/C appeared in neurons of different subtypes, as demonstrated by specifically

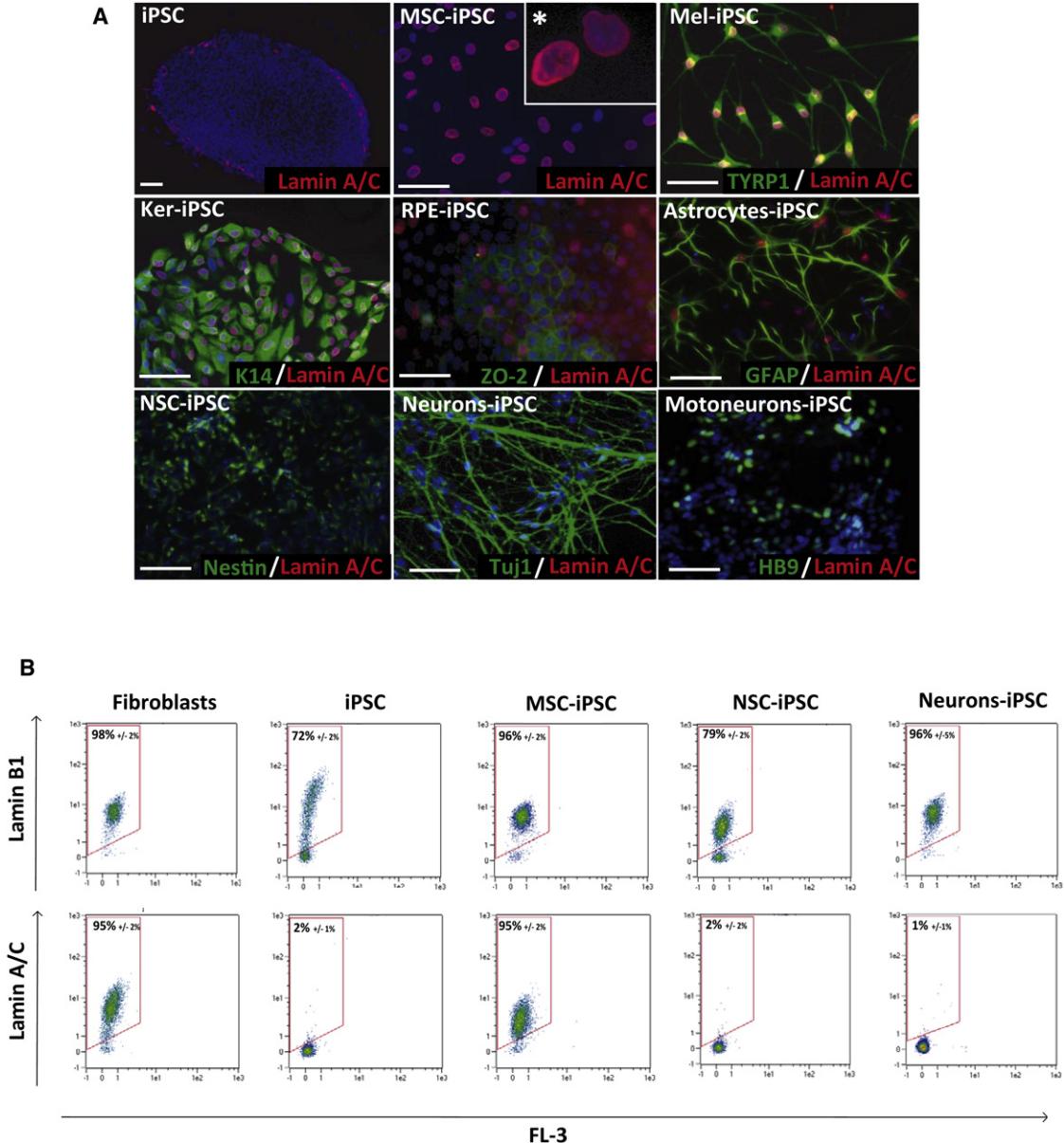


Figure 2. Characterization of Lamins Expression Profile in iPSC Derivatives

(A) Lamin A/C immunostaining (JOL2 antibody) in HGPS fibroblasts, undifferentiated HGPS iPSC and its derivatives into mesenchymal stem cells (MSC-iPSC), melanocytes (Mel-iPSC), keratinocytes (Ker-iPSC), retinal pigment epithelial cells (RPE-iPSC), astrocytes (Astrocytes-iPSC), neural stem cells (NSC-iPSC), neurons (Neurons-iPSC) and motoneurons (Motoneurons-iPSC). *Boxes represent higher magnification. Scale bar is 50 μ m.

(B) Flow cytometry analysis of lamin A/C (JOL2 antibody) and lamin B1 expression in fibroblasts, iPSC, MSC-iPSC, NSC-iPSC and Neurons-iPSC. Values indicate means \pm SD of three independent experiments.

See also Figure S2.

differentiating iPSC into motoneurons, but did not extend to other neural derivatives, such as astrocytes (Figure 2A).

Our study was built on the working hypothesis of an involvement of microRNAs in the neural protection observed in progeria. As a first step, three different prediction software (Target Scan, miRDB, and miRanda) were combined in order to align the lamin A 3' untranslated region (UTR) sequence with all known micro-

RNAs seed sequences. Computational alignments have identified two microRNAs that were candidates for targeting the lamin A 3' UTR but not lamin C 3' UTR: miR-129-5p and miR-9 (Figure 3A; Figures S3A and S3B). The latter has immediately attracted our attention as this microRNA is considered as the key player in neural development (Leucht et al., 2008; Yoo et al., 2009) and neural cell behavior (Ambasudhan et al., 2011; De

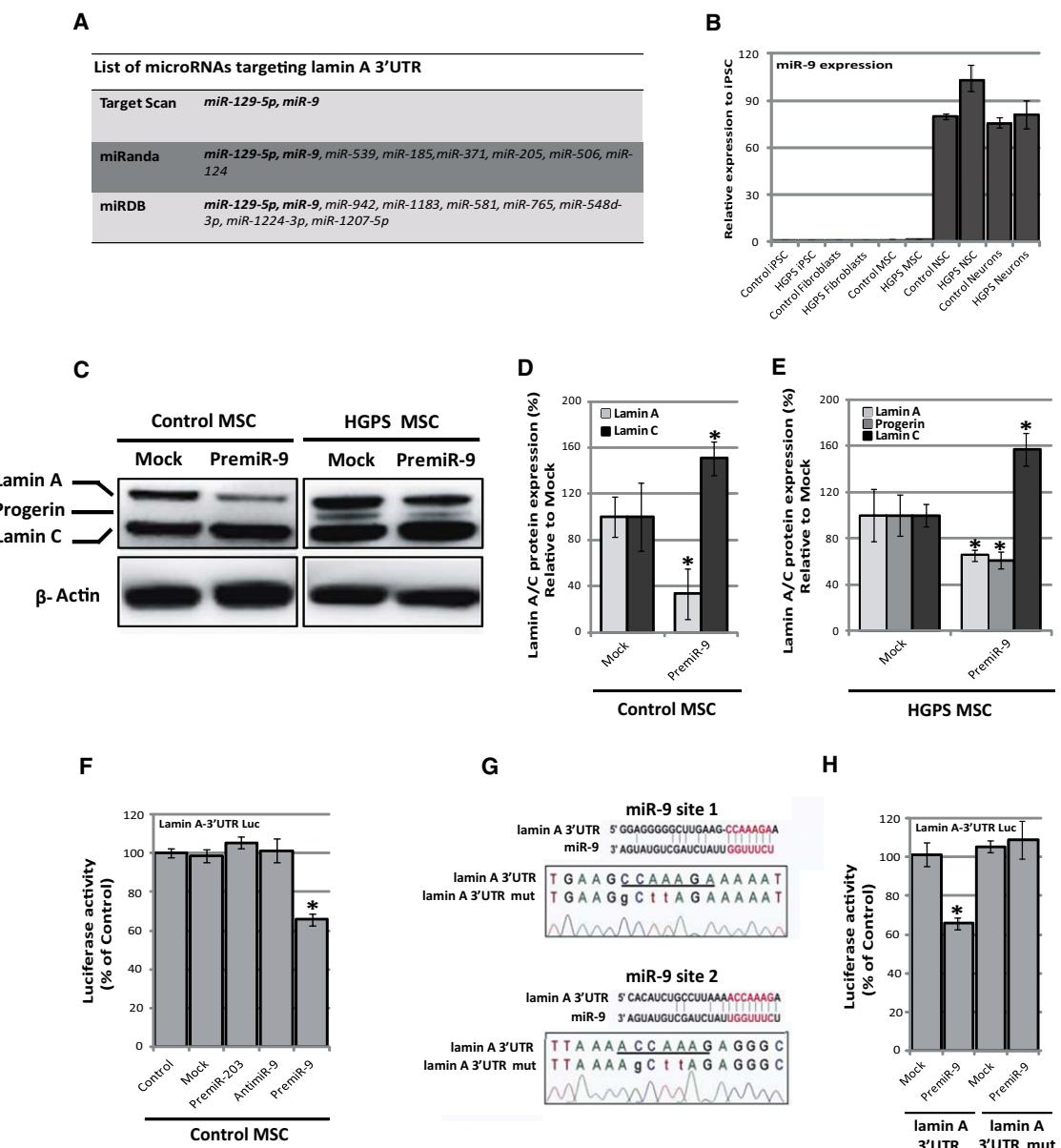


Figure 3. miR-9 Regulates Lamin A and Progerin Expression

(A) Predictive alignment of microRNAs potentially targeting the 3' UTR sequence of lamin A using three independent algorithms: TargetScan, miRanda, and miRDB.

(B) qRT-PCR analysis of miR-9 in control and HGPS iPSC, fibroblasts, MSC-iPSC, NSC-iPSC, and Neurons-iPSC. Values represent the means \pm SD of three independent experiments.

(C) Western blot analysis of lamin A/C (JOL2 antibody) and β -Actin expression in control and HGPS MSC-iPSC transfected with a pre-miR control (Mock) or pre-miR-9. *p value < 0.05.

(D) and (E) Quantification by western blot analysis of lamin A/C and β -Actin expression in control and HGPS MSC-iPSC transfected with a pre-miR control (Mock) or pre-miR-9. *p value < 0.05.

(F) Luciferase activity of control MSC-iPSC transfected or not with lamin A-Luc 3' UTR plasmid in presence of a pre-miR control (Mock), pre-miR-203, anti-miR-9, or pre-miR-9. *p value < 0.05.

(G) Sequences alignment of the normal and mutated lamin A 3' UTR.

(H) Luciferase activity of control MSC-iPSC transfected or not with the normal or mutated lamin A-Luc 3' UTR plasmids in presence of a pre-miR control (Mock) or pre-miR-9. Values represent the means \pm SD of three independent experiments. *p value < 0.05.

See also Figure S3.

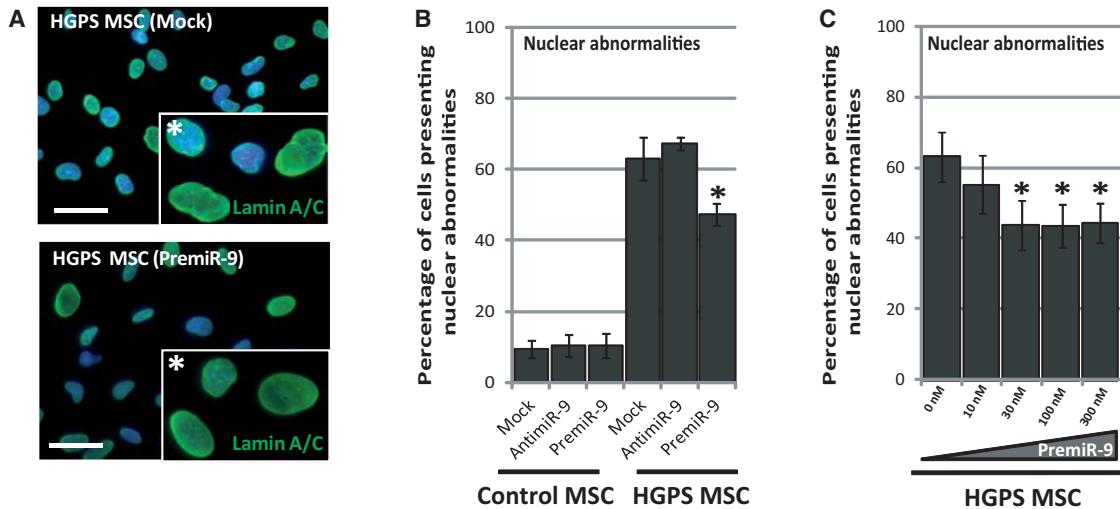


Figure 4. miR-9 Mediated Improvement of HGPS Nuclear Abnormalities

(A) Lamin A/C immunostaining (JOL2 antibody) in HGPS MSC-iPSC transfected with a pre-miR control (Mock) or pre-miR-9. *Boxes represent higher magnification. Scale bar is 50 μ m.

(B) Quantification of nuclear abnormalities (lamin A/C immunostaining with JOL2 antibody) in HGPS MSC-iPSC transfected with a pre-miR control (Mock) or pre-miR-9. Values represent the means \pm SD of two hundreds nuclei in three independent experiments. *p value < 0.05.

(C) Quantification of nuclear abnormalities HGPS MSC-iPSC transfected with increasing concentrations of pre-miR-9. Values represent the means \pm SD of 200 nuclei in three independent experiments. *p value < 0.05.

See also Figure S4.

Pietri Tonelli et al., 2008; Delaloy et al., 2010; Zhao et al., 2009). We therefore dedicated further experiments toward validating the potential involvement of miR-9. Accordingly, quantitative real-time PCR (qRT-PCR) revealed that miR-9 was consistently expressed in NSC-iPSC and Neurons-iPSC, but not in fibroblasts, undifferentiated iPSC or MSC-iPSC (Figure 3B). In order to demonstrate the functional impact of miR-9 on lamins A/C expression and HGPS molecular defects, gain- and loss-of-function experiments using pre-miRs and anti-miRs were performed in MSC-iPSC. These cells were used to avoid any bias caused by a potential variation in endogenous miR-9 content since they do not physiologically express miR-9 and, in contrast, strongly express lamins A/C. Western blot quantification of A-type lamins revealed that, as compared to untreated controls, pre-miR-9 transfected cells, that overexpressed the microRNA, exhibited a decrease of 66% in the lamin A protein content. This negative regulation was specific to lamin A because, in contrast, lamin C exhibited a 50% increase under treatment with pre-miR-9 (Figures 3C and 3D). The same experiments were carried out in HGPS MSC-iPSC providing similar results, with miR-9 overexpression eliciting a 35% decrease in lamin A and a 55% increase in lamin C. The overexpression of miR-9 additionally promoted a 38% decrease in progerin expression in affected cells (Figure 3E). In a search for molecular mechanisms of action, the direct targeting of miR-9 on lamin A 3' UTR was confirmed and quantified by transfecting MSC-iPSC with a plasmid that contained a luciferase gene under the control of the lamin A 3' UTR. Measures of luminescence were performed 72 hr after co-transfection with either a pre-miR or anti-miR for miR-9 revealing that overexpression of miR-9 microRNA

was sufficient on its own to decrease the luciferase activity by up to 40% as compared to controls and anti-miR-9-treated MSC-iPSC (Figure 3F). As a control of miR-9 specificity, the two lamin A 3' UTR sites targeted by miR-9 were mutated, and no effect of miR-9 overexpression was then recorded (Figures 3G and 3H).

In the literature, decrease of progerin expression has been associated with a decrease in nuclear blebbing in patients' cells (Cao et al., 2011; Huang et al., 2005; Osorio et al., 2011). Accordingly, quantification of lamins A/C immunostaining revealed that whereas 60% of control and anti-miR-9 treated HGPS MSC-iPSC presented abnormally shaped nuclei, the overexpression of miR-9 induced a significant decrease of bleb containing nuclei to 48% (Figures 4A, 4B, and S4A). This effect was dose-dependent, as shown by transfecting cells with pre-miR-9 at successively higher concentrations (Figures 4C, S4B, and S4C).

DISCUSSION

Altogether, our results shed light on a unique molecular mechanism that specifically protects neurons in patients with Hutchinson-Gilford progeria syndrome from the defective prelamin A processing. MicroRNAs play key roles in the specific differentiation and maturation of cells and tissues in various systems (Houbaviy et al., 2003; Judson et al., 2009; Krichevsky et al., 2006; Lee et al., 1993; Ruvkun, 2001; Smirnova et al., 2005; Suh et al., 2004) including pluripotent stem cells commitment as we recently demonstrated for miR-203 in the early stages of keratinocytes development (Nissan et al., 2011a) or for miR-125 in neural differentiation (Boissart et al., 2012). These data

are consistent with the strict neural specificity of miR-9 during the first steps of mouse brain development (Smirnova et al., 2005), as well as during neural differentiation from ES cells in the mouse (Krichevsky et al., 2006) as in the Human (Delaloy et al., 2010). Over the past few years, several functional studies highlighted not only the neural-specific expression of miR-9, but its key role in the regulation of numerous processes related to neural differentiation (Zhao et al., 2009), proliferation, and migration (Delaloy et al., 2010). On the basis of these observations and according to the established key role of miR-9 in neural development, we hypothesized and demonstrated that this microRNA regulates lamin A expression in neural progenies, providing insight into the tissue selectivity of HGPS.

Our data correlate to the recently emitted hypothesis that miR-9 regulates mouse prelamin A expression revealing moreover that this molecular mechanism is conserved in humans and acts as a protective mechanism of HGPS neurons. In this context, lamin A gene extinction would physiologically be part of that general “neuralizing activity” of miR-9 showing that the singular molecular constitution of neural cells’ nuclear envelope is, by itself, sufficient to significantly reduce the occurrence of dysmorphic nuclei that are otherwise elicited by the HGPS mutation in most cells. As it was previously described (Zhang et al., 2011), lamins A/C were, however, also absent from undifferentiated iPSC, i.e., in the absence of a significant expression of miR-9, suggesting the existence of others molecular regulators of A-type lamins expression in pluripotent stem cells. On the basis of our findings, we propose miR-9 as a member of the emerging list of microRNAs that have been associated with HGPS pathophysiology. In fact, recently, Carlos López-Otín and colleagues have shown that miR-1 expression was upregulated in HGPS fibroblasts, impacting cell function by reducing IGF-1 synthesis and causing a dysregulation of this major life span regulator (Mariño et al., 2010). Similarly, another family of microRNA, miR-29, was shown to be upregulated in *Zmpste24^{-/-}* progeroid mice, altering the activity of Ppm1d phosphatase, which in turn enhanced p53 activity (Ugalde et al., 2011). Compared to these data, miR-9 has clearly a unique function as it impacts the disease cell phenotype at physiological levels, protecting changes in one specific cellular lineage. We thus speculate that the absence of cognitive impairment in children affected by progeria is due to a beneficial effect of miR-9 as a specific and physiological regulator of neural development. Such relations between microRNAs specificity and diseases may be applied to other metabolic diseases and other tissues, in which microRNAs similarly play key roles in the control of organogenesis (Bartel, 2009; Lee et al., 2004).

Over the years, several studies have highlighted the existence of a small number of tissue-specific microRNAs that are key players during development in vertebrates, including miR-203 for the entire sequence of skin embryogenesis (Nissan et al., 2011a; Yi et al., 2006, 2008), miR-1 and miR-133 in muscle formation (Townley-Tilson et al., 2010) as well as miR-155 and miR-181 in hematopoietic differentiation (Vasilatou et al., 2010). Whereas potential roles of microRNAs in the expression of a pathology are currently being investigated, our results support a complementary approach in the search for protective mechanisms, in particular when tissues or organs

seem to be specifically unaffected by supposedly ubiquitously expressed pathological agents, as illustrated by the example of progeria.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Fibroblasts Reprogramming

Fibroblasts used in this study were isolated from patient biopsies performed in the Assistance Publique Hôpitaux de Marseille (13-5968, 13-8243) or provided by Coriell Institute (Camden, USA) (DM4603 and AG11513, AG01972). One control (DM4603) and two HGPS (AG01972 and 13-8243) cell lines were successfully reprogrammed to iPSC whereas the most affected HGPS cells were not (13-5968, AG11513). Three independent iPSC lines were derived from one control (DM4603) and one HGPS (13-8243) from patients using Yamanaka’s original method with OCT4, KLF4, SOX2, c-Myc, transferred using retroviral vectors (Takahashi et al., 2007). The iPSC lines were amplified up to the 15th passage before differentiation.

Pluripotent Stem Cells Culture and Differentiation

Control and HGPS iPSC as well hESC from two cell lines, SA01 (Cellartis, Göteborg, Sweden) and H9 (Wicell, Madison, WI) were grown on STO mouse fibroblasts, inactivated with 10 mg/ml mitomycin C, seeded at 30000/cm² and grown as previously described (19). For differentiation, hESC and iPSC were differentiated into mesenchymal stem cells (MSC-iPSC) keratinocytes (Ker-iPSC), melanocytes (Mel-iPSC), and retinal pigment epithelial cells (RPE iPSC) using directed protocols for differentiation previously published by our group (Giraud-Triboulet et al., 2011; Guenou et al., 2009; Nissan et al., 2011b). Neuronal differentiation was performed according to an adaptation of the dual SMAD inhibitor cocktail (Noggin, SB431542) described by Chambers and colleagues (Chambers et al., 2009). For amplification, NSC-iPSC were cultivated in N2B27 medium (Invitrogen, Carlsbad, CA) supplemented with FGF2, EGF, and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) for 10–20 passages and terminally differentiated in the neurons-iPSC after 21 days of starvation with the mitotic growth factors (FGF2 and EGF). For motoneurons differentiation, embryoid bodies (EBs) were generated in presence of the SMAD inhibitors and caudalized by addition of retinoic acid, BDNF, ascorbic acid. After 11 days EBs were treated with Sonic Hedgehog and after 21 days cells were dissociated to be cultured up to 30 days in presence of the same medium supplemented with Rock inhibitor and glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF). For astrocytes generation, inhomogeneous population of motoneurons were then switched to N2B27 medium supplemented with ascorbic acid, BDNF, GDNF, and ciliary neurotrophic factor for an additional 10 days.

mRNA Purification and qRT-PCR

Total RNA from pluripotent stem cells and their derivatives were isolated using an RNeasy Mini extraction kit (QIAGEN, Courtaboeuf, France) according to the manufacturer’s protocol. An on-column DNase I digestion was performed to avoid genomic DNA amplification. RNA level and quality were checked using the Nanodrop technology. A total of 500 ng of RNA was used for reverse transcription using the Superscript III reverse transcription kit (Invitrogen). qRT-PCR analysis was performed using a LightCycler 480 system (Roche, Basel Switzerland) and SYBR Green PCR Master Mix (Roche) following the manufacturer’s instructions. Quantification of gene expression was based on the DeltaCt Method and normalized to 18S expression. PCR primers are listed in Table S2.

MicroRNAs Extraction and TaqMan Assay

MicroRNAs were extracted using miRVana extraction kit (Applied Biosystems, Foster City, USA) according to the manufacturer’s protocol after phenol-chloroform and column purification. Individual TaqMan microRNA assays were performed on ABI 7900 (Applied Biosystems) with a no UNG no Amperase master mix (Applied Biosystems) according to the manufacturer’s protocol. Results were normalized against RNU 48 a small nucleolar RNAs (snoRNAs).

Immunocytochemistry

Cells were fixed in 4% paraformaldehyde (15 min, room temperature) before permeabilization and blocking in PBS supplemented with 0.1% Triton X-100 and 1% BSA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Primary antibodies were incubated 1 hr at room temperature in blocking buffer. Antibodies included mouse anti-lamin A/C (JOL2, Millipore, Billerica, MA), rabbit anti-lamin A/C (ab8984, Abcam, Cambridge, UK), rabbit anti-lamin A (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), mouse anti-lamin B1 (Abcam), mouse anti-OCT4 (Abcam), rabbit anti-K14 (Novocastra, Wetzlar, Germany), rabbit anti-TYRP1 (LifeSpan BioSciences, Seattle, WA), mouse anti-ZO-2 (Abcam), rabbit anti-Pax6 (Covance, Princeton, NJ), mouse anti-Nestin (Millipore), rabbit anti-Nestin (Millipore), rabbit anti-Sox2 (Invitrogen), rabbit anti-Tuj1 (Covance), rabbit anti-OCT4 (Santa Cruz Biotechnology), rabbit anti-TRA 1-81 (Abcam), rabbit anti-SSEA 4 (Abcam), mouse anti-ALCAM (BD Biosciences), mouse anti-Integrin β 1 (BD Biosciences), mouse anti-Hyaluronate receptor (BD Biosciences), mouse anti-SH3/NT5E (BD Biosciences), rabbit anti-GFAP (Dako), mouse anti-MNR2 or HB9 (DHSB), and mouse anti-Pax3 (Millipore). Cells were stained with the species-specific fluorophore-conjugated secondary antibody (Invitrogen) (1 hr, room temperature); nuclei were visualized with DAPI. Three independent experiments were performed using each cell type. Photographs were taken using a Zeiss microscope equipped with epi-fluorescence illumination.

Flow Cytometry Analysis

Cells were detached from culture plates using Trypsin 0.05% EDTA (Invitrogen) and fixed in 4% paraformaldehyde (15 min, room temperature). After PBS wash, cells were either permeabilized with 0.1% Saponin (Sigma-Aldrich). Primary antibodies diluted at 1:100 were incubated (1 hr, room temperature) in PBS containing 0.1% FCS. Isotype-specific controls were carried out using no primary antibody. Species-specific secondary antibodies were added (1 hr, room temperature) and the cells were analyzed on a FACScalibur using CellQuest software (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ). The number of events analyzed for each experiment was 10,000. Three independent experiments were performed for each cell line.

Western Immunoblotting

Whole-cell lysates of MSC-iPSC were collected, separated by SDS-PAGE, and transferred onto nitrocellulose membranes by electroblotting. Blots were blocked in 10% skim milk (Bio-Rad) in Tween 0.1% Tris-buffered saline 1 hr at room temperature. The primary antibodies used were a mouse anti-lamin A/C 1:200 (Millipore, JOL2) or a β -Actin 1/200 000 (Sigma). Membranes were incubated during the night at 4°C. Antigen-antibody binding was detected using horseradish peroxidase-conjugated species-specific secondary antibodies (GE-Healthcare, Little Chalfont, UK) followed by enhanced chemiluminescence western blotting detection reagents (Perkin-Elmer, Waltham, MA). Densitometric analysis was performed and lamin A/C ratios were calculated following normalization to the value for β -Actin.

3' UTR Luciferase Activity

Confirmation of miR-9 binding capacities to the putative 3' UTR binding site of lamin A utilized a luciferase reporter assay. MSC-iPSC at 80% confluence were nucleofected with 1 μ g of reporter vector pmir-Target-lamin A 3' UTR, empty vector pmir-Target (negative transfection control) or pCMV-GFP (positive transfection control) using Amaxa nucleofector (Lonza, Basel, Switzerland). All vectors were provided by OriGene (Rockville, MD). A mutated version of pmir-Target-lamin A 3' UTR was obtained by directed mutagenesis, following manual instruction of QuikChange Multi-site directed mutagenesis kit (Agilent Technology). Both miR-9 recognition sites were mutated: CCAAAGA (site 1) was replaced by gCttAGA and ACCAAAG (site 2) was replaced by AgCttAG. Twenty-four hours after nucleofection, MSC-iPSC were transfected with microRNAs mimics: premiR-9, premiR-203 (unrelated negative control), premiR-Scramble (negative control or mock), anti-miR-9, or anti-miR Scramble. All premiRs and antagoniRs (Applied Biosystems) were transfected at 100 nM using lipofectamine RNAiMax (Invitrogen) reagent according to manufacturer's protocol. Forty-eight hours after transfection Steady-Glo luciferase assay reagent (Promega, Madison, WI) was added to each well and the plate was incubated at room temperature in the dark for

30 min. The luciferase signal was measured using an Analyst GT counter luminometer (Molecular Devices). Data were normalized using measurement of ATP content using Cell title Glo (Promega), and knockdown was assessed by calculating luciferase signal ratios for specific miRNA/nontargeting control (mock).

microRNAs Transfection

PremiRs and antimiRs (Applied Biosystems) were transfected in MSC using lipofectamin RNAiMax (Invitrogen) according to manufacturer's instructions.

Statistical Analysis

Statistical analysis has been performed by one-way analysis of variance (ANOVA), using the Dunnett's comparison test. Values of $p < 0.05$ were considered significant (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental Information includes four figures and two tables and can be found with this article online at doi:10.1016/j.celrep.2012.05.015.

LICENSING INFORMATION

This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 3.0 Unported License (CC-BY; <http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/legalcode>).

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Manoubia Saidani, Céline Vallot, Drs. Jean Francois Ouimette, and Christine Baldeschi for their part in certain experiments, Claire Boissart and Dr Alexandra Benchoua for their expertise in neural cell differentiation, Dr. Susan Cure for revising the manuscript, and Drs. Walter Habeler, Alexandre Méjat, Claire Rougeulle, and Pierre Cau for providing helpful discussions. This work was supported by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), University Evry Val d'Essonne (UEVE), Association Française contre les Myopathies (AFM), and Genopole.

Received: November 30, 2011

Revised: April 24, 2012

Accepted: May 18, 2012

Published online: June 21, 2012

REFERENCES

- Ambasudhan, R., Talantova, M., Coleman, R., Yuan, X., Zhu, S., Lipton, S.A., and Ding, S. (2011). Direct reprogramming of adult human fibroblasts to functional neurons under defined conditions. *Cell Stem Cell* 9, 113–118.
- Bartel, D.P. (2009). MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 136, 215–233.
- Boissart, C., Nissan, X., Giraud-Triboulet, K., Peschanski, M., and Benchoua, A. (2012). miR-125 potentiates early neural specification of human embryonic stem cells. *Development* 139, 1247–1257.
- Burke, B., and Stewart, C.L. (2006). The laminopathies: the functional architecture of the nucleus and its contribution to disease. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 7, 369–405.
- Cao, K., Graziotto, J.J., Blair, C.D., Mazzulli, J.R., Erdos, M.R., Krainc, D., and Collins, F.S. (2011). Rapamycin reverses cellular phenotypes and enhances mutant protein clearance in Hutchinson-Gilford progeria syndrome cells. *Sci. Transl. Med.* 3, 89ra58.
- Chambers, S.M., Fasano, C.A., Papapetrou, E.P., Tomishima, M., Sadelain, M., and Studer, L. (2009). Highly efficient neural conversion of human ES and iPS cells by dual inhibition of SMAD signaling. *Nat. Biotechnol.* 27, 275–280.
- Columbaro, M., Capanni, C., Mattioli, E., Novelli, G., Parnaik, V.K., Squarzoni, S., Maraldi, N.M., and Lattanzi, G. (2005). Rescue of heterochromatin

- organization in Hutchinson-Gilford progeria by drug treatment. *Cell. Mol. Life Sci.* 62, 2669–2678.
- De Pietri Tonelli, D., Pulvers, J.N., Haffner, C., Murchison, E.P., Hannon, G.J., and Huttner, W.B. (2008). miRNAs are essential for survival and differentiation of newborn neurons but not for expansion of neural progenitors during early neurogenesis in the mouse embryonic neocortex. *Development* 135, 3911–3921.
- De Sandre-Giovannoli, A., Bernard, R., Cau, P., Navarro, C., Amiel, J., Boccaccio, I., Lyonnet, S., Stewart, C.L., Munnich, A., Le Merrer, M., and Lévy, N. (2003). Lamin A truncation in Hutchinson-Gilford progeria. *Science* 300, 2055.
- Delaloy, C., Liu, L., Lee, J.A., Su, H., Shen, F., Yang, G.Y., Young, W.L., Ivey, K.N., and Gao, F.B. (2010). MicroRNA-9 coordinates proliferation and migration of human embryonic stem cell-derived neural progenitors. *Cell Stem Cell* 6, 323–335.
- 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., et al. (2003). Recurrent de novo point mutations in lamin A cause Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Nature* 423, 293–298.
- Giraud-Triboulet, K., Rochon-Beaucourt, C., Nissan, X., Champon, B., Aubert, S., and Piétu, G. (2011). Combined mRNA and microRNA profiling reveals that miR-148a and miR-20b control human mesenchymal stem cell phenotype via EPAS1. *Physiol. Genomics* 43, 77–86.
- 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., and Collins, F.S. (2004). Accumulation of mutant lamin A causes progressive changes in nuclear architecture in Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 8963–8968.
- Guenou, H., Nissan, X., Larcher, F., Feteira, J., Lemaitre, G., Saidani, M., Del Rio, M., Barrault, C.C., Bernard, F.X., Peschanski, M., et al. (2009). Human embryonic stem-cell derivatives for full reconstruction of the pluristratified epidermis: a preclinical study. *Lancet* 374, 1745–1753.
- Hennekam, R.C. (2006). Hutchinson-Gilford progeria syndrome: review of the phenotype. *Am. J. Med. Genet. A* 140, 2603–2624.
- Ho, J.C., Zhou, T., Lai, W.H., Huang, Y., Chan, Y.C., Li, X., Wong, N.L., Li, Y., Au, K.W., Guo, D., et al. (2011). Generation of induced pluripotent stem cell lines from 3 distinct laminopathies bearing heterogeneous mutations in lamin A/C. *Aging (Albany NY)* 3, 380–390.
- Houbaviy, H.B., Murray, M.F., and Sharp, P.A. (2003). Embryonic stem cell-specific MicroRNAs. *Dev. Cell* 5, 351–358.
- Huang, S., Chen, L., Libina, N., Janes, J., Martin, G.M., Campisi, J., and Oshima, J. (2005). Correction of cellular phenotypes of Hutchinson-Gilford Progeria cells by RNA interference. *Hum. Genet.* 118, 444–450.
- Judson, R.L., Babiarz, J.E., Venere, M., and Blelloch, R. (2009). Embryonic stem cell-specific microRNAs promote induced pluripotency. *Nat. Biotechnol.* 27, 459–461.
- Jung, H.J., Coffinier, C., Choe, Y., Beigneux, A.P., Davies, B.S., Yang, S.H., Barnes, R.H., 2nd, Hong, J., Sun, T., Pleasure, S.J., et al. (2012). Regulation of prelamin A but not lamin C by miR-9, a brain-specific microRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109, E423–E431.
- Krichevsky, A.M., Sonntag, K.C., Isaacson, O., and Kosik, K.S. (2006). Specific microRNAs modulate embryonic stem cell-derived neurogenesis. *Stem Cells* 24, 857–864.
- Lee, R., Feinbaum, R., and Ambros, V. (2004). A short history of a short RNA. *Cell* 116, S89–S92, 1 p following S96.
- Lee, R.C., Feinbaum, R.L., and Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. *Cell* 75, 843–854.
- Lehner, C.F., Stick, R., Eppenberger, H.M., and Nigg, E.A. (1987). Differential expression of nuclear lamin proteins during chicken development. *J. Cell Biol.* 105, 577–587.
- Leucht, C., Stigloher, C., Wizenmann, A., Klafke, R., Folchert, A., and Bally-Cuif, L. (2008). MicroRNA-9 directs late organizer activity of the midbrain-hindbrain boundary. *Nat. Neurosci.* 11, 641–648.
- Liu, B., Wang, J., Chan, K.M., Tjia, W.M., Deng, W., Guan, X., Huang, J.D., Li, K.M., Chau, P.Y., Chen, D.J., et al. (2005). Genomic instability in laminopathy-based premature aging. *Nat. Med.* 11, 780–785.
- Liu, G.H., Barkho, B.Z., Ruiz, S., Diep, D., Qu, J., Yang, S.L., Panopoulos, A.D., Suzuki, K., Kurian, L., Walsh, C., et al. (2011a). Recapitulation of premature ageing with iPSCs from Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Nature* 472, 221–225.
- Liu, G.H., Suzuki, K., Qu, J., Sancho-Martinez, I., Yi, F., Li, M., Kumar, S., Nivet, E., Kim, J., Soligalla, R.D., et al. (2011b). Targeted gene correction of laminopathy-associated LMNA mutations in patient-specific iPSCs. *Cell Stem Cell* 8, 688–694.
- Mariño, G., Ugalde, A.P., Fernández, A.F., Osorio, F.G., Fueyo, A., Freije, J.M., and López-Otín, C. (2010). Insulin-like growth factor 1 treatment extends longevity in a mouse model of human premature aging by restoring somatotroph axis function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107, 16268–16273.
- Merideth, M.A., Gordon, L.B., Clauss, S., Sachdev, V., Smith, A.C., Perry, M.B., Brewer, C.C., Zalewski, C., Kim, H.J., Solomon, B., et al. (2008). Phenotype and course of Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *N. Engl. J. Med.* 358, 592–604.
- Misteli, T., and Scaffidi, P. (2005). Genome instability in progeria: when repair gets old. *Nat. Med.* 11, 718–719.
- Navarro, C.L., Cau, P., and Lévy, N. (2006). Molecular bases of progeroid syndromes. *Hum. Mol. Genet.* 15 (Spec No 2), R151–R161.
- Nissan, X., Denis, J.A., Saidani, M., Lemaitre, G., Peschanski, M., and Baldeschi, C. (2011a). miR-203 modulates epithelial differentiation of human embryonic stem cells towards epidermal stratification. *Dev. Biol.* 356, 506–515.
- Nissan, X., Larribere, L., Saidani, M., Hurbain, I., Delevoye, C., Feteira, J., Lemaitre, G., Peschanski, M., and Baldeschi, C. (2011b). Functional melanocytes derived from human pluripotent stem cells engraft into pluristratified epidermis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108, 14861–14866.
- Osorio, F.G., Navarro, C.L., Cadiñanos, J., Lopez-Mejia, I.C., Quiros, P.M., Bartoli, C., Rivera, J., Tazi, J., Guzman, G., Varela, I., et al. (2011). Splicing-directed therapy in a new mouse model of human accelerated aging. *Sci. Transl. Med.* 3, 106ra107.
- Paradisi, M., McClintock, D., Boguslavsky, R.L., Pedicelli, C., Worman, H.J., and Djabali, K. (2005). Dermal fibroblasts in Hutchinson-Gilford progeria syndrome with the lamin A G608G mutation have dysmorphic nuclei and are hypersensitive to heat stress. *BMC Cell Biol.* 6, 27.
- Röber, R.A., Weber, K., and Osborn, M. (1989). Differential timing of nuclear lamin A/C expression in the various organs of the mouse embryo and the young animal: a developmental study. *Development* 105, 365–378.
- Ruvkun, G. (2001). Molecular biology. Glimpses of a tiny RNA world. *Science* 294, 797–799.
- Smirnova, L., Gräfe, A., Seiler, A., Schumacher, S., Nitsch, R., and Wulczyn, F.G. (2005). Regulation of miRNA expression during neural cell specification. *Eur. J. Neurosci.* 21, 1469–1477.
- Suh, M.R., Lee, Y., Kim, J.Y., Kim, S.K., Moon, S.H., Lee, J.Y., Cha, K.Y., Chung, H.M., Yoon, H.S., Moon, S.Y., et al. (2004). Human embryonic stem cells express a unique set of microRNAs. *Dev. Biol.* 270, 488–498.
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., and Yamanaka, S. (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131, 861–872.
- Townley-Tilson, W.H., Callis, T.E., and Wang, D. (2010). MicroRNAs 1, 133, and 206: critical factors of skeletal and cardiac muscle development, function, and disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 42, 1252–1255.
- Ugalde, A.P., Ramsay, A.J., de la Rosa, J., Varela, I., Mariño, G., Cadiñanos, J., Lu, J., Freije, J.M., and López-Otín, C. (2011). Aging and chronic DNA damage response activate a regulatory pathway involving miR-29 and p53. *EMBO J.* 30, 2219–2232.
- Vasilatou, D., Papageorgiou, S., Pappa, V., Papageorgiou, E., and Dervenoulas, J. (2010). The role of microRNAs in normal and malignant hematopoiesis. *Eur. J. Haematol.* 84, 1–16.

- Yi, R., O'Carroll, D., Pasolli, H.A., Zhang, Z., Dietrich, F.S., Tarakhovsky, A., and Fuchs, E. (2006). Morphogenesis in skin is governed by discrete sets of differentially expressed microRNAs. *Nat. Genet.* 38, 356–362.
- Yi, R., Poy, M.N., Stoffel, M., and Fuchs, E. (2008). A skin microRNA promotes differentiation by repressing 'stemness'. *Nature* 452, 225–229.
- Yoo, A.S., Staahl, B.T., Chen, L., and Crabtree, G.R. (2009). MicroRNA-mediated switching of chromatin-remodelling complexes in neural development. *Nature* 460, 642–646.
- Zhang, J., Lian, Q., Zhu, G., Zhou, F., Sui, L., Tan, C., Mutualif, R.A., Navasan-kari, 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.
- Zhao, C., Sun, G., Li, S., and Shi, Y. (2009). A feedback regulatory loop involving microRNA-9 and nuclear receptor TLX in neural stem cell fate determination. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16, 365–371.

II. Utilisation des cellules souches pluripotentes pour l'exploration fonctionnelle des molécules actuellement à l'étude pour le traitement de la progeria

Titre de l'article : Induced pluripotent stem cells reveal functional differences between drugs currently investigated in patients with Hutchinson-Gilford progeria syndrome

Auteurs : Sophie BLONDEL, Anne-Laure JASKOWIAK, Claire NAVARRO, Anne-Laure EGESIPE, Veronique CORDETTE, Cecile MARTINAT, Yacine LAABI, Karima DJABALI, Annachiara DE SANDRE-GIOVANNOLI, Nicolas LEVY, Marc PESCHANSKI and Xavier NISSAN

II.1 Contexte de l'étude

Le développement du modèle iPSCs progéria présenté dans la partie précédente a permis de modéliser la pathologie et de comprendre certains mécanismes physiopathologiques. Afin de caractériser ce modèle sur des aspects de réponses pharmacologiques, nous avons mené une étude de comparaison d'effets fonctionnels et de mécanistique de petites molécules. La progéria est une maladie monogénique pour laquelle différents composés pharmacologiques sont actuellement proposés dans des études cliniques (NCT00425607 ; NCT00731016 ; NCT00916747). Bien que les mécanismes d'action des molécules soient parfaitement décrits, leurs effets fonctionnels sur les cellules de patients ont été relativement peu étudiés. Les principes actifs de ces médicaments sont un inhibiteur de la farnésyltransférase (le lonafarnib), une statine (la pravastatine) et un aminobisphosphonate (le zolédrone) et plus récemment, la rapamycine, un inhibiteur de mTOR. La comparaison des effets biologiques de ces différents traitements requiert le développement d'un modèle d'étude standardisé qui, avant la découverte des iPSCs, n'existe pas. Ainsi, l'objectif de ce travail a consisté à comparer les effets fonctionnels de ces différentes drogues sur un certain nombre de paramètres caractéristiques des MSCs dérivées des iPSCs progéria. Ce travail fait actuellement l'objet d'une publication en révision dans la revue Stem Cell Reports.

II.2 Caractérisation du modèle d'étude

La première étape de ce travail a consisté à valider le modèle d'étude utilisé pour la comparaison de l'action de ces drogues. Notre choix s'est orienté vers les MSCs puisque, comme décrit dans la publication précédente, ce type cellulaire exprimait une partie des symptômes cellulaires associés à la progéria. Dans cette étude, la caractérisation des défauts présentés par ces cellules a été étendue à d'autres paramètres. En effet, ces cellules exprimaient la progérine, présentaient des anomalies de l'enveloppe nucléaire, une différenciation accélérée vers le lignage ostéogénique, et une sénescence réplicative prématuée (Figures 1 et 2).

II.3 Etude de l'effet des composés sur l'atteinte des MSC progéria

L'efficacité thérapeutique de ces composés a été évaluée *in vitro* dans notre modèle cellulaire. Tout d'abord, nos travaux ont démontré que les quatre molécules testées améliorent toutes significativement l'architecture de l'enveloppe nucléaire des MSCs (Figure 3A et B). D'autre part, nos travaux ont démontré que la rapamycine agissait sur les MSCs en diminuant la quantité de progérine et que le FTI et le ZoPra induisaient une inhibition de la maturation de la prélamine A (Figure 3C, D, E et F). Grâce à un protocole automatisé de différenciation des MSCs vers le lignage ostéogénique, il a par la suite été possible de suivre l'effet des différents traitements sur la cinétique de différenciation des MSCs progéria dans ce lignage. Nos résultats ont ainsi démontré que le FTI, la rapamycine et dans une moindre mesure le ZoPra pouvaient restaurer ce paramètre (Figure 4A). Par ailleurs, la capacité proliférative a été investiguée sur une courte période de traitement de 72 heures et sur une plus longue période de 24 jours. Les résultats de ces tests ont mis en évidence une diminution de la prolifération avec les trois traitements, aussi bien à court terme, qu'à long terme (Figure 4C et D). Cependant, la différence notable a été dans la puissance de cette inhibition de la prolifération. Alors que le ZoPra et la rapamycine ont diminué faiblement la capacité réplicative des MSCs, le FTI a eu un impact beaucoup plus fort. Dès huit jours de traitement, les cellules ont totalement arrêté de proliférer. Outre, cet effet cytostatique, le FTI a également provoqué la mort des cellules. Enfin, bien que l'activité métabolique ne soit pas modifiée dans les MSCs progéria, ce paramètre a été étudié pour s'assurer qu'aucune molécule n'avait d'effets délétères sur cette variable (Figure 4E). Les résultats de cette étude ont ainsi montré que cette activité était augmentée après un traitement à la rapamycine et au ZoPra mais pas avec le FTI.

II.4 Conclusion

Le principal résultat de cette étude est la démonstration que les quatre molécules utilisées ou proposées dans les études cliniques pour la progéria ont des effets fonctionnels différents sur les MSCs progeria. Bien que les mécanismes d'action de ces différentes drogues soient connus, nos connaissances de leurs effets sur les cellules de patients sont, pour autant, peu connus. Nos résultats démontrent que, bien qu'ils soient tous capables de restaurer les défauts de structures de l'enveloppe nucléaire, ces molécules présentent des effets relativement différents sur certains paramètres fonctionnels tels que la différentiation ostéogénique, le métabolisme énergétique ou la prolifération cellulaire. Cette comparaison apporte des arguments en faveur d'une potentielle association bénéfique des traitements et renseigne sur les limitations de chaque composé. Dans l'ensemble, ce travail a également permis de souligner l'intérêt de ce modèle cellulaire pour des études pharmacologiques ouvrant la perspective d'évaluer l'effet de nouvelles molécules potentiellement thérapeutiques au travers d'approches de criblage à haut débit.

Induced pluripotent stem cells reveal functional differences between drugs currently investigated in patients with Hutchinson-Gilford progeria syndrome

Sophie BLONDEL¹, Anne-Laure JASKOWIAK², Claire NAVARRO³, Anne-Laure EGESIPE¹, Veronique CORDETTE¹, Cecile MARTINAT¹, Yacine LAABI², Karima DJABALI⁴, Annachiara DE SANDRE-GIOVANNOLI^{3,5}, Nicolas LEVY^{3,5}, Marc PESCHANSKI^{1,2} and Xavier NISSAN^{2*}

¹ INSERM/UEVE 861, I-STEM, AFM, Institute for Stem cell Therapy and Exploration of Monogenic diseases, 5 rue Henri Desbruères, 91030 Evry cedex, France

² CECS, I-STEM, AFM, Institute for Stem cell Therapy and Exploration of Monogenic diseases, 5 rue Henri Desbruères, 91030 Evry cedex, France

³ INSERM-Aix-Marseille Université UMR S 910 Génétique Médicale et Génomique Fonctionnelle, Faculté de Médecine Timone, 13385 Marseille Cedex 05, France

⁴ Department of Dermatology and IMETUM, Technische Universität München, Munich, Germany

⁵ AP-HM Département de Génétique Médicale, Hôpital d'enfants, Timone, 13385 Marseille Cedec 05, France

*correspondence xnissan@istem.fr, +33169908591

ABSTRACT

Hutchinson-Gilford progeria syndrome (HGPS) is a rare congenital disease characterized by premature aging in children. Identification of the mutation and related molecular mechanisms has rapidly led to independent clinical trials testing different marketed drugs with a preclinically documented impact on those mechanisms. However, the extensive functional effects of those drugs have remained essentially unexplored. We have undertaken a systematic comparative study of the three main treatments currently administered or proposed to progeria affected children, namely a farnesyltransferase inhibitor (FTI), the combination of an aminobisphosphonate and a statin (ZoPra), and the mTOR inhibitor Rapamycin. This work

was based on the assumption that mesodermal stem cells, which are derived from HGPS induced pluripotent stem (iPS) cells and express major defects associated to the disease, may be instrumental to revealing such effects. Whereas all three treatments significantly improved misshapen cell nuclei typically associated with progeria, differences were observed in terms of functional improvements in prelamin A farnesylation, progerin expression, defective cell proliferation, premature osteogenic differentiation, and in ATP production. These results unveil the complexity of the modes of action of different drugs, even when they have been selected on the basis of a similar mechanistic hypothesis, and underscore the use of iPS cell derivatives as a critical and powerful tool for standardized, comparative pharmacological studies.

INTRODUCTION

Since the discovery of the molecular mechanisms underlying Hutchinson-Gilford progeria syndrome (OMIM #176670), three independent clinical trials have been proposed to treat the patients affected with this accelerated aging disorder: lonafarnib (NCT00425607) (Gordon et al., 2012), pravastatin & zoledronate (NCT00731016), and their combination (NCT00916747). While some patients are currently treated with these drugs, little is known regarding each of their specific effect on different cell defects observed in progeria. In this study, we have taken advantage of the unique potential of induced pluripotent stem cells to address that issue.

Progeria is a rare genetic disorder caused by a point mutation in the *LMNA* gene that leads to the production and accumulation of a truncated form of lamin A called progerin (De Sandre-Giovannoli et al., 2003) (Eriksson et al., 2003). This toxic form of lamin cannot be terminally matured, causing disruption of the nuclear structure, defects in DNA repair processes and other molecular defects associated to premature aging (Navarro et al., 2006). The disease manifests itself by a set of symptoms that include growth delay, loss of body fat, osteoporosis and atherosclerosis leading to premature death (Hennekam, 2006) (Merideth et al., 2008). Based on the identification of the toxic mechanism leading to progeria being associated with the accumulation of mis-processed farnesylated progerin, two therapeutic strategies have been investigated. Farnesyl Transferase Inhibitors (FTIs) have been assayed, following the restoration of some defects both *in vitro* and in progeroid animal models (Yang et al., 2006) (Capell et al., 2008). The recently published results of this clinical trial indicate the partial

clinical benefits of an FTI, lonafarnib, although several adverse effects have been reported (Gordon et al., 2012). In parallel, because of the previously described antiproliferative effect of FTIs on cancer cells (McClintock et al., 2007), through the activation of an alternative prenylation pathway called geranyl-geranylation, another clinical trial has been initiated. This second approach is based instead on the global reduction of global progerin protein prenylation through the combination of a statin (pravastatin) and an aminobisphosphonate (zoledronate) (subsequently named ZoPra) (Varela et al., 2008). Direct benefits of this combination were also sought through the reduction of atherosclerosis and bone turnover defects, two of the key hallmarks of progeria (Varela et al., 2008). More recently, another strategy was proposed through the use of the macrolide antibiotic Rapamycin (Rapa), demonstrating its effect in improving the cell nuclear morphology of HGPS fibroblasts through mTOR inhibition and progerin clearance stimulation. (Cao et al., 2011).

Before the discovery of induced pluripotent stem cell (iPS cells), relevant biological resources allowing the study at a cellular level of such new treatments were limited to patients' primary fibroblast cultures and genetically modified healthy cells overexpressing progerin (Scaffidi and Misteli, 2006) (Paradisi et al., 2005) (Capell et al., 2005). iPS cell derivatives appear to be an interesting alternative tool with which to study a potentially unlimited number of genetic pathologies (Maury et al., 2011). Thanks to their intrinsic self-renewal and pluripotency properties, iPS cells constitute an inexhaustible and reproducible biological material that can be amplified, characterized and banked. Recently, several groups, including ours, have confirmed the usefulness of these cells to decipher the molecular mechanisms involved in HGPS (Zhang et al., 2011b) (Liu et al., 2011a) (Liu et al., 2011b) (Nissan et al., 2012).

In the present study we have taken advantage of this unique cell model to create a pharmacological study platform to systematically compare the effects of the drugs currently studied or proposed to children affected by progeria. For that purpose, mesodermal stem cells (MSCs) have been derived from iPS cells in order to monitor relevant molecular parameters such as prelamin A maturation inhibition and to quantify functional defects such as nuclear architecture, progerin expression, energy metabolism, cell proliferation and osteogenic differentiation properties.

RESULTS

This study was performed using MSCs derived from two HGPS iPS cell lines, as previously described (Figure 1A) (Nissan et al., 2012). HGPS MSCs are 99% homogeneous for mesodermal markers (Figure 1B). As compared to WT MSCs, HGPS MSC overexpress progerin at the mRNA (Figure 1C) and the protein level (Figure 1D and 1E) and present functional pathological defects characteristic of the disease including nuclear shape abnormalities (Figure 2A and 2B), a premature osteoblastic differentiation (Figure 2C and 2D), defects in cell proliferation (Figure 2E, 2F and 2G) but not in cell metabolism (Figure 2H). All the further pharmacological experiments were carried out after the same number of cell divisions in vitro following MSC differentiation, four passages before replicative senescence, as determined in preliminary experiments. The treatment dosage was chosen on the basis of the existing literature on in vitro HGPS cells for ZoPra (1 μ M) and the FTI (1 μ M), while a classical dosage of Rapamycin for in vitro studies was used (10 nM) (Ma et al., 2010). The experimental workflow (Sup. Figure 1) and analysis (Sup. Figure 2A, 2B and 2C) are presented in supplementary data.

Effect of pharmacological drugs on nuclear shape integrity, prelamin A maturation and progerin expression.

In vitro, misshapen nuclei is the main hallmark of the disease. MSCs derived from control iPS cell lines exhibited homogeneous lamin A/C immunostaining, lining up regularly the nuclear membrane. In contrast, HGPS MSCs displayed a heterogeneous lamin A/C staining with nuclear lobulation, numerous endoplasmic reticulum folds and macro-nuclei (Figure 2A and 2B). When HGPS MSCs were treated for 72h, a significant decrease of the percentage of affected nuclei was observed in the presence of each of the three different treatments assayed, in comparison to untreated cells or DMSO treated cells, which display respectively 83 % and 74% of misshapen nuclei (Figure 3A and 3B). The quantitative analysis revealed an improvement of nuclear shape integrity of 26 % with ZoPra, 28 % with Rapa and 60 % with FTI (Figure 3B).

To evaluate the effect of these compounds on prelamin A maturation, an immunoassay allowing the quantification of the subcellular localization of this protein precursor was set up. MSCs derived from HGPS exhibited no specific immunolabeling of prelamin A (Figure 3C), whereas treatments affected it quite differently. Automated quantification of prelamin A immunostaining revealed a high nuclear staining of the protein in cells treated with FTI,

indicating an inhibition of the prelamin A maturation process. ZoPra was also efficient, although results were quantitatively less strong (35 %) (Figures 3C and 3D). Western blot analysis showed that expression of lamin A and C was not affected by either ZoPra or Rapa (Sup. Figure 3A). FTI promoted an increase of prelamin A expression while lamin A expression was decreased (Sup. Figure 3A). In clear contrast to the two other treatments, our results confirmed that Rapa had no impact on prelamin A localization (Figure 3C and 3D) but significantly decreased the percentage of progerin expressing cells (30 %) (Figure 3E and 3F). The post-translational effect of these different drugs was finally confirmed by correlating these results to gene expression analysis, showing that lamin A/C and progerin mRNA levels were not affected by any of the drugs (Sup. Figure 3B and 3C).

Therapeutic benefits of ZoPra, FTIs and Rapa on secondary functional parameters.

The effects of the different drugs were then analyzed on three ageing-related functional parameters namely premature osteoblastic differentiation, cell proliferation and energy metabolism.

The capacity of MSCs to differentiate along the osteogenic lineage was monitored by measuring alkaline phosphatase activity after 7 days of differentiation in osteoblastic induction medium (OIM). Alkaline phosphatase activity quantification was performed using a colorimetric substrate, revealing a strong increase in the osteogenic differentiation of HGPS MSCs as compared to WT MSCs (Figure 2C). Premature osteogenic differentiation of HGPS MSC was confirmed by measuring an increase expression of two classical osteogenic markers ALP and Collagen type 1A (Figure 2D). Whereas all the drugs were efficient on nuclear shape abnormalities, major differences were identified between the effects of the treatments on this parameter. Accordingly, HGPS MSC treated with either FTI or Rapa presented a high decrease in their premature osteogenic differentiation, while the effect of ZoPra was more limited (Figure 4A).

As previously described, HGPS MSCs demonstrated a loss of proliferative capacity, as revealed by a 15 to 20 % decrease in the proportion of Ki-67 cycling cells, compared to WT MSCs (Figure 2E and 2F). This led over time to a progressive reduction in the number of HGPS cells produced, with close to a 7 times difference to WT MSCs at 24 days (Figure 2G). Automated quantification of Ki-67 staining after 72h of treatment revealed that all three treatments further slowed down the rate of proliferation, although in very different proportions: FTI drastically altered cell proliferation, with over 33% reduction of cycling

cells, while the two other treatment were much less deleterious, with less than a 15 % reduction in the number of cycling cells (Figures 4B and 4C). In the long term, when treatments were continuously applied over 24 days, ZoPra induced a mild reduction in the rate of cell proliferation (total number of cells reduced by 7 times compared to untreated HGPS MSCs), while Rapa had a moderate effect (reduction by 300 times), and FTI exhibited a strong cytostatic effect (Figure 4D). FTI led to total proliferation arrest after 8 days of treatment, with a final reduction in the number of cells after 24 days by 700,000 times compared to untreated HGPS cells.

Finally, the analysis of energy metabolism was monitored through the quantification of ATP production using CTG labeling. Although comparison between WT and HGPS MSCs revealed no statistically significant difference (Figure 2H), pharmacological experiments highlighted differences between the treatments. In data normalized on the number of cells to avoid the bias introduced by the differential cell proliferation, ZoPra exhibited the most beneficial effect, with the amount of ATP almost doubling per cell (Figure 4E). Rapa had a positive, though much reduced effect, with a 30 % increase in ATP content per cell whereas FTI had no effect on ATP content per cell (Figure 4E).

DISCUSSION

The main result of this study is the demonstration that the three treatments currently used or proposed in clinical trials for Hutchinson Gilford progeria syndrome have somewhat different functional effects at the cellular level (Figure 5). Altogether, in contrast to the common corrective effects of the three treatments on nuclear shape, this functional study revealed major differences in their therapeutic potentials. This demonstration may present major consequences for the elaboration of new clinical trials, following those that have already been initiated. In addition, by demonstrating their capacity to enable quantified measurements in functional cellular assays, this study underscores the value of induced pluripotent stem cells as a platform for pharmacological studies, beyond the search for effective chemical compounds through drug screening.

The iso-semantic point mutation (c.1824C>T) in exon 11 of *LMNA* causing HGPS through the activation of a cryptic splicing site induces the production of the toxic protein progerin with two major defects, namely a truncation of the protein and the persistency of a farnesyl

residue at its C-terminal end (Pereira et al., 2008). This latter defect has rapidly attracted attention as drugs were already available that alter the farnesylation process. FTI that directly target the enzyme responsible for adding the farnesyl residue to the immature protein have indeed elicited functional improvements, in particular in regard to the correction of nuclear shape abnormalities (Yang et al., 2006) (Capell et al., 2008). Another approach ultimately aimed at correcting the same molecular defect has used a combination of two drugs that target the prenylation process in a broader way, with similar effects on misshapen nuclei (Varela et al., 2008). More recently, another therapeutic route has been explored with the mTOR inhibitor rapamycin, known to stimulate autophagy (Ravikumar et al., 2002). Rapamycin treatment has been associated with the correction of misshapen nuclei in HGPS fibroblasts, suggesting that the increased clearance of progerin alone had corrective effects, in the likely absence of effects on the farnesylation process (Cao et al., 2011). Quantitative results of the present study on prelamin A maturation and correction of the nuclear shape abnormalities were in keeping with the data underscoring the phenotypical rescue of treatments targeting the farnesylation process. Conversely, our results highlighted the fact that Rapamycin's therapeutic effect was independent from the maturation process of prelamin A. It is interesting to mention that Rapamycin effects were recorded in the present study at a dose 68 times lower than in the original demonstration of the effects of Rapamycin on HGPS cells (Cao et al., 2011).

Decreased cell proliferation and premature senescence are well-characterized consequences of the HGPS mutation (Graziotto et al., 2012). Although precise causal mechanisms are still elusive, the initial evidence involved an activation of p53 pathway (Kudlow et al., 2008), and an increased rate of telomere shortening through dysregulation of the catalytic subunit of the enzyme telomerase (hTERT) (Kudlow et al., 2008). Interestingly, in our study none of the treatments had a clear corrective effect on that parameter, suggesting that it is not affected by changes in the prelamin A maturation process. Moreover, it is interesting to mention that long-term analysis of the treatments effects revealed a potent cytostatic effect of FTI, with cell proliferation arrest after one week. These deleterious effects were reminiscent of those demonstrated when FTIs were used in cancer therapy (Efuet and Keyomarsi, 2006).

One of the main advantages of the iPS cellular model is that it allows the precise monitoring of stem cell differentiation known to be dysregulated in HGPS (Scaffidi and Misteli, 2008). Accordingly, our results revealed a premature osteogenic differentiation in vitro in HGPS-iPS derivatives, reminiscent of that previously reported in WT cells engineered to overexpress

progerin (Scaffidi and Misteli, 2008). Pharmacological experiments indicated that only ZoPra exhibited a slight corrective effect on that function, while Rapamycin and FTI efficiently slowed it down, both in the short and long term.

Decreased energy metabolism, with a major reduction in ATP production, is one hallmark of cellular aging and has been classically associated with a limited replicative life span of cultured human HGPS fibroblasts (Goldstein et al., 1982). Dysregulation of energy demand and/or inefficiency of oxidative phosphorylation could play a role in the curtailed replicative capacity of progeria cells. More recently, these data have been replicated, showing that the ATP content of progeria fibroblasts was 50% decreased compared to healthy controls, linking the effect to a decrease in proteasome activity (Viteri et al., 2010). At odds with these data, our study revealed no statistically significant difference between WT and HGPS MSCs when ATP production was normalized to the number of cells. This lack of an alteration may be associated to the absence of cell senescence at the time of the analysis, as it was always purposely performed ahead of that event. Nevertheless, the pharmacological study performed on HGPS MSCs revealed that ZoPra, and in a much more limited way Rapamycin, but not FTI, increased ATP production in a very significant fashion. Since correction of ATP concentrations has many consequences on major cell functions, it would be of interest to further explore the potential of treatments that would discretely target this mechanism in HGPS cells.

All the results presented in this study have been obtained with cells differentiated from iPS cell lines derived from HGPS patients. Such cell lines have already repeatedly been instrumental in replicating molecular mechanisms and major cellular defects associated with the disease (Zhang et al., 2011b) (Liu et al., 2011a), as well as revealing physiological mechanisms that protect neural cells (Nissan et al., 2012). Here, they have additionally allowed us to relate changes in those defects with different therapeutic tools, i.e. to use them as a platform for pharmacological studies in order to detail functional outcomes that can be expected from the use of one or another treatment that targets causal pathological mechanisms. A number of studies have already made use of the *in vitro* replication of pathological hallmarks of a number of other genetic diseases in order to observe the effects of known drugs or screen chemical libraries seeking yet unknown ones. The present study comes as an extension to those experimental paradigms by demonstrating that iPS cell derivatives can be further exploited to search for associations between causative mechanisms and the functional effects of drugs. Such use of derivatives of iPS cells obtained from patients with a

genetic disease may, clearly, be extended to many other diseases for which potential treatments are proposed.

MATERIALS AND METHODS

Fibroblast reprogramming

Fibroblasts used in this study were isolated from patient biopsies performed in the Assistance Publique Hôpitaux de Marseille for the patient 13-8243 and provided by Coriell Cell Repository (Camden, USA) for patient AG01972 and control DM4603. The three fibroblasts were successfully reprogrammed to iPS cells using Yamanaka's original method with OCT4, KLF4, SOX2, c-Myc, transferred using retroviral vectors (Takahashi et al., 2007). The iPS cell lines were amplified up to the 15th passage before differentiation.

Pluripotent stem cell culture and differentiation

Control and HGPS iPS cells were grown on STO mouse fibroblasts, inactivated with 10 mg/ml mitomycin C seeded at 30000/cm² and grown as previously described (Nissan et al., 2012). For differentiation, iPS cells were differentiated into MSCs using directed protocols for differentiation previously published by our group (Giraud-Triboult et al., 2010).

Cell culture and drug treatments

HGPS and control MSCs were cultured in KO DMEM (Invitrogen), supplemented with 20 % of FBS (SH30066.0.3, Thermo scientific), 1% non-essential amino acids (Invitrogen), 1 % glutamine (Invitrogen), 0,1 % β -mercaptoethanol (Invitrogen). Six hours after seeding, MSCs were treated with 0,1 % DMSO, Pravastatin 1 μ M (Sigma-Aldrich), Zoledronate 1 μ M (Zometa[®]), Rapamycin 10 nM (R0395, Sigma-Aldrich) or FTI 1 μ M (tipifarnib: R115777, Selleck chemicals). Concentrations of drugs were defined based on the literature and their effect on nuclear shape abnormalities.

Osteogenic differentiation

MSCs were seeded at 15000 cells per cm² in 24-well plates in MSC culture medium and treated as previously described. After 72 hours, the MSC medium was replaced by STEMPRO osteogenic induction medium (Invitrogen), in the presence or not of the different drugs. The medium was replaced every 3 to 4 days. After 7 days of culture, cells were fixed

with 95 % ethanol and stained by adding a colorimetric substrate of the alkaline phosphatase, the 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/Nitro blue tetrazolium (Sigma-Aldrich).

ATP measurement

HGPS and WT MSCs were seeded in 96-well plates (3917, Corning) (5000 cells/well) and treated with the different drugs. After 72 hours of treatment, the ATP content was measured using Cell Titer Glo® according to the manufacturer's recommendations. Luminescence was measured with an Analyst GT counter luminometer (Molecular devices). In parallel, DAPI stained nuclei were counted in each well with the aid of an automated microscope named Leap. The results are given in the ratio between ATP measurement and the number of nuclei counted.

Array scan analysis

Prelamin A localization, progerin expression and Ki-67 positive nuclei detections were analyzed with an ArrayScan VTI HCS Reader (Cellomics). The first channel was used for nucleus identification (DAPI staining) and the second channel was used to identify prelamin A, progerin and Ki-67. Information was collected with VHCS view software (Cellomics). Pictures were acquired at X20 objective in high resolution camera mode and were analyzed based on the "spot detection" bioapplication for prelamin A and progerin and "colocalization" bioapplication for Ki-67.

Immunocytochemistry

Cells were fixed in 4 % paraformaldehyde (15 minutes, room temperature) before permeabilization and blocking in PBS supplemented with 0.1 % triton X-100 and 1 % BSA (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Primary antibodies were incubated for one hour at room temperature in blocking buffer. Antibodies included mouse anti-lamins A/C (clone JOL2, Millipore, Billerica, USA), rabbit anti-prelamin A (ANT0045, Diatheva), rabbit anti-progerin 11 and anti-Ki67 (clone Ki-S5, MAB4190, Millipore, Billerica, USA). Cells were stained with the species-specific fluorophore-conjugated secondary antibody (Invitrogen) (one hour, room temperature) and nuclei were visualized with DAPI.

Western immunoblotting

Whole-cell lysates of MSCs were collected, separated by SDS-PAGE, and transferred onto PVDF membrane by the liquid transfer method. Blots were blocked in 10 % skim milk (Bio-

Rad) in tween 0.1 % tris-buffered saline (TTBS) 1X for one hour at room temperature. The primary antibodies used were a mouse anti-lamin A/C 1:200 (Millipore, JOL2) and a β -actin 1/200 000 (Sigma). Membranes were incubated overnight at 4°C. Antigen-antibody binding was detected using horseradish peroxidase-conjugated species-specific secondary antibodies (GE-Healthcare, Little Chalfont, UK), followed by enhanced chemiluminescence western blotting detection reagents (Perkin-Elmer, Waltham, USA).

Quantitative PCR

Total RNA was isolated using the RNeasy Mini extraction kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) according to the manufacturer's protocol. An on-column DNase I digestion was performed to avoid genomic DNA amplification. RNA levels and quality were checked using the Nanodrop technology. A total of 500 ng of RNA was used for reverse transcription using the Superscript III reverse transcription kit (Invitrogen). Quantitative PCR analysis was performed using an ABI 7900 system (Applied biosystem). Lamins expressions were performed using TaqMan gene expression Master Mix (Roche), following the manufacturer's instructions. Quantification of gene expression was based on the DeltaCt method and normalized on 18S expression (Assay HS_099999). PCR primers were previously described by S. Rodriguez and colleagues (Rodriguez S et al., 2009). Primer sequences were lamin A (exons 11/12), 5'-TCTTCTGCCCTCCAGTGTACG-3' and 5'-AGTTCTGGGGCTCTGGT-3'; lamin C (exons 9/10), 5'-CAACTCCACTGGGAAGAAGTG-3' and 5'-CGGCGGCTACCACTCAC-3' and progerin (exons 11/12), 5'-ACTGCAGCAGCTCGGGG-3' and 5'-TCTGGGGCTCTGGC-3'. Taqman MGB probe sequences were lamin A (exon 11), 5'-ACTCGCAGCTACCG-3'; lamin C (exon10), 5'-ATGCGCAAGCTGGT-3' and progerin (exon 11), 5'-CGCTGAGTACAACCT-3'. Reporter and quencher dyes for the LMNA locus assays were 5'-6FAM and 3'- non fluorescent quencher dye (NFQ; Applied Biosystems). Osteogenic differentiation markers were quantified using SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), following the manufacturer's instructions. Primer sequences were COL1A, CCCCTGGAAAGAATGGAGAT and CCATCCAAACCACTGAAACC; ALP, CCACGTCTTCACATTGGTG and AGACTGCGCTGGTAGTTGT. Quantification of gene expression was based on the DeltaCt method and normalized on 18S expression, GATATGCTCATGTGGTGTG, AATCTTCTTCAGTCGCTCCA.

Flow cytometry

Cells were detached from culture plates using trypsin-EDTA (Invitrogen) and fixed in 4 % paraformaldehyde (15 minutes, room temperature). After a PBS wash, cells were stained with CD29-PE Mouse IgG1 1:6 (BD Biosciences); CD44-PE Mouse IgG1 1:6 (BD Biosciences); CD73-PE Mouse IgG1 1:2 (BD Biosciences); CD105-PE Mouse IgG1 1:20 (Invitrogen) and CD166-PE Mouse IgG1 1:2 (BD Biosciences), diluted in PBS containing 5 % FCS (30 minutes, room temperature). Negative controls were unstained cells and isotype-control stained cells (mouse IgG1-PE). Cells were analyzed on a MACS Flow Cytometry (Miltenyi Biotec) using Flow Jow software ®. The number of events analyzed for each experiment was 10,000. Three independent experiments were performed for each cell line.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed by a one-way analysis of variance (ANOVA), using the Dunnet's comparison test. Values of $p < 0.05$ were considered significant (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

Acknowledgments

The authors thank Mélody Mazon, Kristell Lebozec, Pauline Poydenot, Pauline Georges, Johana Tournois and Delphine Laustriat for their part in certain experiments, Yves Maury and Dr Alexandra Benchoua for their expertise in high content imaging, Drs. Gisele Bonne, Walter Habeler, Alexandre Méjat, Pierre Cau, Odile Rigault and Michèle Martin for helpful discussions. This work was supported by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), University Evry Val d'Essonne (UEVE), Association Française contre les Myopathies (AFM), and Genopole.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Derivation and characterization of MSC from HGPS iPS cells

- (A) Schematic representation of the pathological modeling strategy and MSC differentiation protocol.
- (B) Flow cytometry analysis of CD29, CD44, CD73, CD105 and CD166 expression in WT and HGPS MSCs.

- (C) Quantitative PCR analysis of progerin expression in WT and HGPS MSCs. Data are normalized on the 18S housekeeping gene. Each chart represents the mean +/- SD of three independent experiments.
- (D) Progerin immunostaining in WT and HGPS. The scale bar represents 50 μ m.
- (E) Automated quantification of progerin immunopositive nuclei in WT and HGPS MSCs. The chart represents the dispersion of twelve independent experiments.

Figure 2: Molecular characterization of HGPS MSC's pathological defects

- (A) Lamin A/C staining (JOL2, Millipore, Billerica, USA), in WT and HGPS MSCs. The scale bar represents 25 μ m.
- (B) Automated quantification of abnormal nuclei in WT and HGPS MSCs. The chart represents the dispersion of eight independent experiments.
- (C) Alkaline phosphatase (ALP) activity in WT HGPS MSCs differentiated in osteoblastic lineage (7 days of differentiation). The scale bar represents 50 μ m.
- (D) Quantitative PCR analysis of alkaline phosphatase (ALP) and Collagen type 1A (Col 1A) expression in WT and HGPS MSCs. Data are normalized on the 18S housekeeping gene. Each chart represents the mean +/- SD of three independent experiments.
- (E) Ki-67 immunostaining in WT and HGPS MSCs. The scale bar represents 25 μ m.
- (F) Automated quantification of Ki-67 immunopositive nuclei in WT and HGPS MSCs. The chart represents the dispersion of eight independent experiments.
- (G) Cumulative number of WT and HGPS MSCs during 24 days of cultures.
- (H) Measure of ATP content in WT and HGPS MSCs. The chart represents the dispersion of eight independent experiments.

Figure 3: Effect of treatments on nuclear shape abnormalities, prelamin A maturation and progerin expression

- (A) Lamin A/C staining (JOL2, Millipore, Billerica, USA), in HGPS MSCs following 72 hours of treatment in a cumulative dose. The scale bar represents 25 μ m.

- (B) Quantification of misshapen nuclei in HGPS MSCs following 72 hours of treatment in a cumulative dose. Each plot represents the percentage of abnormal nuclei and the horizontal bar represents the mean value of each condition.
- (C) Prelamin A immunostaining in HGPS MSCs following 72 hours of treatment in a cumulative dose. The scale bar represents 30 μ m.
- (D) Automated quantification of prelamin A-stained nuclei in HGPS MSCs following 72 hours of treatment in a cumulative dose. Each plot represents the percentage of prelamin A positive nuclei and the horizontal bar represents the mean value of each condition.
- (E) Progerin immunostaining in HGPS MSCs following 72 hours of treatment in a cumulative dose. The scale bar represents 30 μ m.
- (F) Automated quantification of progerin-stained nuclei in HGPS MSCs following 72 hours of treatment in a cumulative dose. Each plot represents the percentage of progerin positive nuclei and the horizontal bar represents the mean value of each condition.

Figure 4: Impact of the different pharmacological treatment on osteogenic differentiation, cellular proliferation and energy metabolism

- (A) Alkaline phosphatase activity in HGPS MSCs differentiated in osteoblastic lineage (7 days of differentiation) in the presence of the different treatments. The scale bar represents 50 μ m.
- (B) Ki-67 immunostaining in HGPS MSCs following 72 hours of treatment. The scale bar represents 25 μ m.
- (C) Automated quantification of Ki-67 immunopositive nuclei in HGPS MSCs following 72 hours of treatment in a cumulative dose. Each plot represents the percentage of Ki-67 positive nuclei and the horizontal bar represents the mean value of each condition.
- (D) Cumulative number of HGPS MSCs during 24 days of culture in presence of the different drugs.
- (E) Measure of ATP content, in HGPS MSCs following 72 hours of treatment. Each plot represents the values of ATP content per cell and the horizontal bar represents the mean value of each condition.

Figure 5: Recapitulation of the functional effects of ZoPra, FTI and Rapamycin on HGPS MSC

Sup Figure 1: Schematic representation of the different functional assays

Schematic representation of the experimental workflow to measure prelamin A maturation (prelamin A), progerin expression (progerin), cell proliferation (Ki-67), nuclear shape (lamin A/C) and premature osteogenic differentiation.

Sup Figure 2: Automated quantification of prelamin A and Ki-67 positive cells

- (A) Bioinformatical identification of nuclei and prelamin A staining in HGPS MSCs.
- (B) Bioinformatical identification of nuclei and Ki-67 staining in HGPS MSCs.
- (C) Bioinformatical identification of nuclei and progerin staining in HGPS MSCs.

Sup Figure 3:

- (A) Western blot analysis of lamin A/C, prelamin A and β-actin expression in WT and HGPS MSCs before and after 72 hours of treatment in a cumulative dose.
- (B) And (C) Gene expression analysis of lamin A/lamin C (B) and progerin/lamin C (C) ratio in WT and HGPS MSCs before and after 72 hours of treatment in a cumulative dose. Data are normalized on untreated HGPS MSCs. Each chart represents the mean +/- SD of three independent experiments.

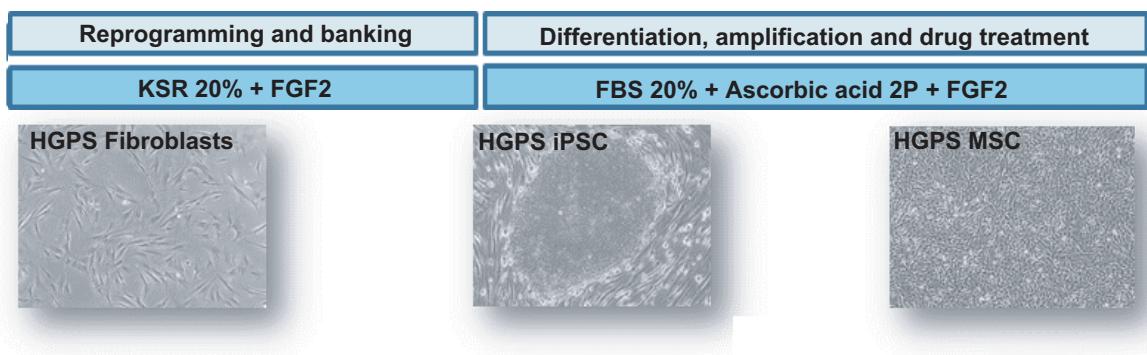
REFERENCES

- **Cao K, Graziotto JJ, Blair CD, Mazzulli JR, Erdos MR, Krainc D, and Collins FS** (2011). Rapamycin reverses cellular phenotypes and enhances mutant protein clearance in Hutchinson-Gilford progeria syndrome cells. *Sci Transl Med* 3, 89ra58.
- **Capell BC, Erdos MR, Madigan JP, Fiordalisi JJ, Varga R, Conneely KN, Gordon LB, Der CJ, Cox AD, and Collins FS** (2005). Inhibiting farnesylation of progerin prevents the characteristic nuclear blebbing of Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 12879-12884.
- **Capell BC, Olive M, Erdos MR, Cao K, Faddah DA, Tavarez UL, Conneely KN, Qu X, San H, Ganesh SK, Chen X, Avallone H, Kolodgie FD, Virmani R, Nabel EG, and Collins FS** (2008). A farnesyltransferase inhibitor prevents both the onset and late progression of cardiovascular disease in a progeria mouse model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 15902-15907.

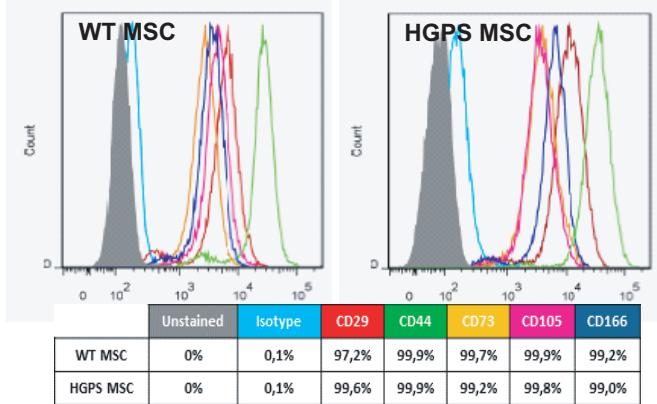
- **De Sandre-Giovannoli A, Bernard R, Cau P, Navarro C, Amiel J, Boccaccio I, Lyonnet S, Stewart CL, Munnich A, Le Merrer M, and Levy N** (2003). Lamin a truncation in Hutchinson-Gilford progeria. *Science* 300, 2055.
- **Efuet ET, and Keyomarsi K** (2006). Farnesyl and geranylgeranyl transferase inhibitors induce G1 arrest by targeting the proteasome. *Cancer Res* 66, 1040-1051.
- **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, and Collins FS** (2003). Recurrent de novo point mutations in lamin A cause Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Nature* 423, 293-298.
- **Giraud-Triboult K, Rochon-Beaucourt C, Nissan X, Champon B, Aubert S, and Pietu G** (2010). Combined mRNA and microRNA profiling reveals that miR-148a and miR-20b control human mesenchymal stem cell phenotype via EPAS1. *Physiol Genomics* 43, 77-86.
- **Goldstein S, Ballantyne SR, Robson AL, and Moerman EJ** (1982). Energy metabolism in cultured human fibroblasts during aging in vitro. *J Cell Physiol* 112, 419-424.
- **Gordon LB, Kleinman ME, Miller DT, Neuberg DS, Giobbie-Hurder A, Gerhard-Herman M, Smoot LB, Gordon CM, Cleveland R, Snyder BD, Fligor B, Bishop WR, Statkevich P, Regen A, Sonis A, Riley S, Ploski C, Correia A, Quinn N, Ullrich NJ, Nazarian A, Liang MG, Huh SY, Schwartzman A, and Kieran MW** (2012). Clinical trial of a farnesyltransferase inhibitor in children with Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 16666-16671.
- **Graziotto JJ, Cao K, Collins FS, and Krainc D** (2012). Rapamycin activates autophagy in Hutchinson-Gilford progeria syndrome: implications for normal aging and age-dependent neurodegenerative disorders. *Autophagy* 8, 147-151.
- **Hennekam RC** (2006). Hutchinson-Gilford progeria syndrome: review of the phenotype. *Am J Med Genet A* 140, 2603-2624.
- **Kudlow BA, Stanfel MN, Burtner CR, Johnston ED, and Kennedy BK** (2008). Suppression of proliferative defects associated with processing-defective lamin A mutants by hTERT or inactivation of p53. *Mol Biol Cell* 19, 5238-5248.
- **Liu GH, Barkho BZ, Ruiz S, Diep D, Qu J, Yang SL, Panopoulos AD, Suzuki K, Kurian L, Walsh C, Thompson J, Boue S, Fung HL, Sancho-Martinez I, Zhang K, Yates J, 3rd, and Izpisua Belmonte JC** (2011a). Recapitulation of premature ageing with iPSCs from Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Nature* 472, 221-225.
- **Liu GH, Suzuki K, Qu J, Sancho-Martinez I, Yi F, Li M, Kumar S, Nivet E, Kim J, Soligalla RD, Dubova I, Goebel A, Plongthongkum N, Fung HL, Zhang K, Loring JF, Laurent LC, and Izpisua Belmonte JC** (2011b). Targeted gene correction of laminopathy-associated LMNA mutations in patient-specific iPSCs. *Cell Stem Cell* 8, 688-694.
- **Ma J, Meng Y, Kwiatkowski DJ, Chen X, Peng H, Sun Q, Zha X, Wang F, Wang Y, Jing Y, Zhang S, Chen R, Wang L, Wu E, Cai G, Malinowska-Kolodziej I, Liao Q, Liu Y, Zhao Y, Xu K, Dai J, Han J, Wu L, Zhao RC, Shen H, and Zhang H** (2010). Mammalian target of rapamycin regulates murine and human cell differentiation through STAT3/p63/Jagged/Notch cascade. *J Clin Invest* 120, 103-114.
- **Maury Y, Gauthier M, Peschanski M, and Martinat C** (2011). [Human pluripotent stem cells: opening key for pathological modeling]. *Med Sci (Paris)* 27, 443-446.
- **McClintock D, Ratner D, Lokuge M, Owens DM, Gordon LB, Collins FS, and Djabali K** (2007). The mutant form of lamin A that causes Hutchinson-Gilford progeria is a biomarker of cellular aging in human skin. *PLoS One* 2, e1269.
- **Merideth MA, Gordon LB, Clauss S, Sachdev V, Smith AC, Perry MB, Brewer CC, Zalewski C, Kim HJ, Solomon B, Brooks BP, Gerber LH, Turner ML, Domingo DL, Hart TC, Graf J, Reynolds JC, Gropman A, Yanovski JA, Gerhard-Herman M,**

- Collins FS, Nabel EG, Cannon RO, 3rd, Gahl WA, and Introne WJ** (2008). Phenotype and course of Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *N Engl J Med* 358, 592-604.
- **Navarro CL, Cau P, and Levy N** (2006). Molecular bases of progeroid syndromes. *Hum Mol Genet* 15 Spec No 2, R151-161.
 - **Nissan X, Blondel S, Navarro C, Maury Y, Denis C, Girard M, Martinat C, De Sandre-Giovannoli A, Levy N, and 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.
 - **Paradisi M, McClintock D, Boguslavsky RL, Pedicelli C, Worman HJ, and Djabali K** (2005). Dermal fibroblasts in Hutchinson-Gilford progeria syndrome with the lamin A G608G mutation have dysmorphic nuclei and are hypersensitive to heat stress. *BMC Cell Biol* 6, 27.
 - **Pereira S, Bourgeois P, Navarro C, Esteves-Vieira V, Cau P, De Sandre-Giovannoli A, and Levy N** (2008). HGPS and related premature aging disorders: from genomic identification to the first therapeutic approaches. *Mech Ageing Dev* 129, 449-459.
 - **Ravikumar B, Duden R, and Rubinsztein DC** (2002). Aggregate-prone proteins with polyglutamine and polyalanine expansions are degraded by autophagy. *Hum Mol Genet* 11, 1107-1117.
 - **Scaffidi P, and Misteli T** (2006). Lamin A-dependent nuclear defects in human aging. *Science* 312, 1059-1063.
 - **Scaffidi P, and Misteli T** (2008). Lamin A-dependent misregulation of adult stem cells associated with accelerated ageing. *Nat Cell Biol* 10, 452-459.
 - **Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, and Yamanaka S** (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131, 861-872.
 - **Varela I, Pereira S, Ugalde AP, Navarro CL, Suarez MF, Cau P, Cadinanos J, Osorio FG, Foray N, Cobo J, de Carlos F, Levy N, Freije JM, and Lopez-Otin C** (2008). Combined treatment with statins and aminobisphosphonates extends longevity in a mouse model of human premature aging. *Nat Med* 14, 767-772.
 - **Viteri G, Chung YW, and 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.
 - **Yang SH, Meta M, Qiao X, Frost D, Bauch J, Coffinier C, Majumdar S, Bergo MO, Young SG, and Fong LG** (2006). A farnesyltransferase inhibitor improves disease phenotypes in mice with a Hutchinson-Gilford progeria syndrome mutation. *J Clin Invest* 116, 2115-2121.
 - **Zhang J, Lian Q, Zhu G, Zhou F, Sui L, Tan C, Mutualif RA, Navasankari R, Zhang Y, Tse HF, Stewart CL, and Colman A** (2011). A human iPSC model of Hutchinson Gilford Progeria reveals vascular smooth muscle and mesenchymal stem cell defects. *Cell Stem Cell* 8, 31-45.

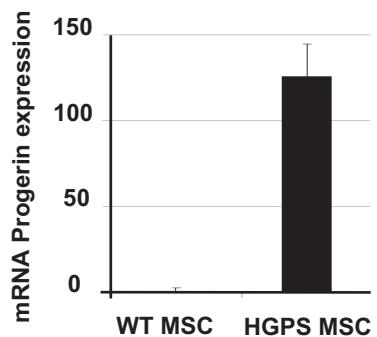
A



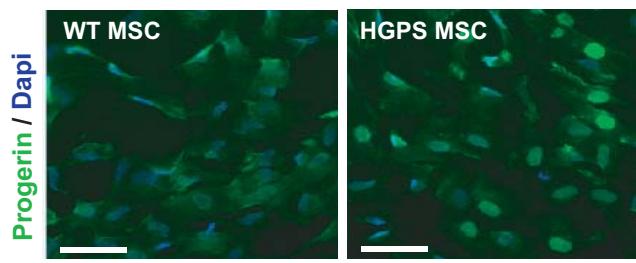
B



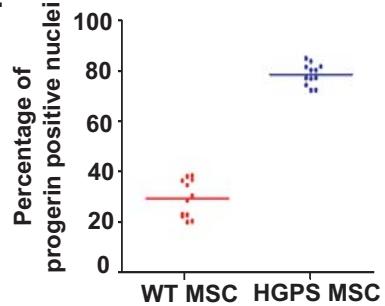
C

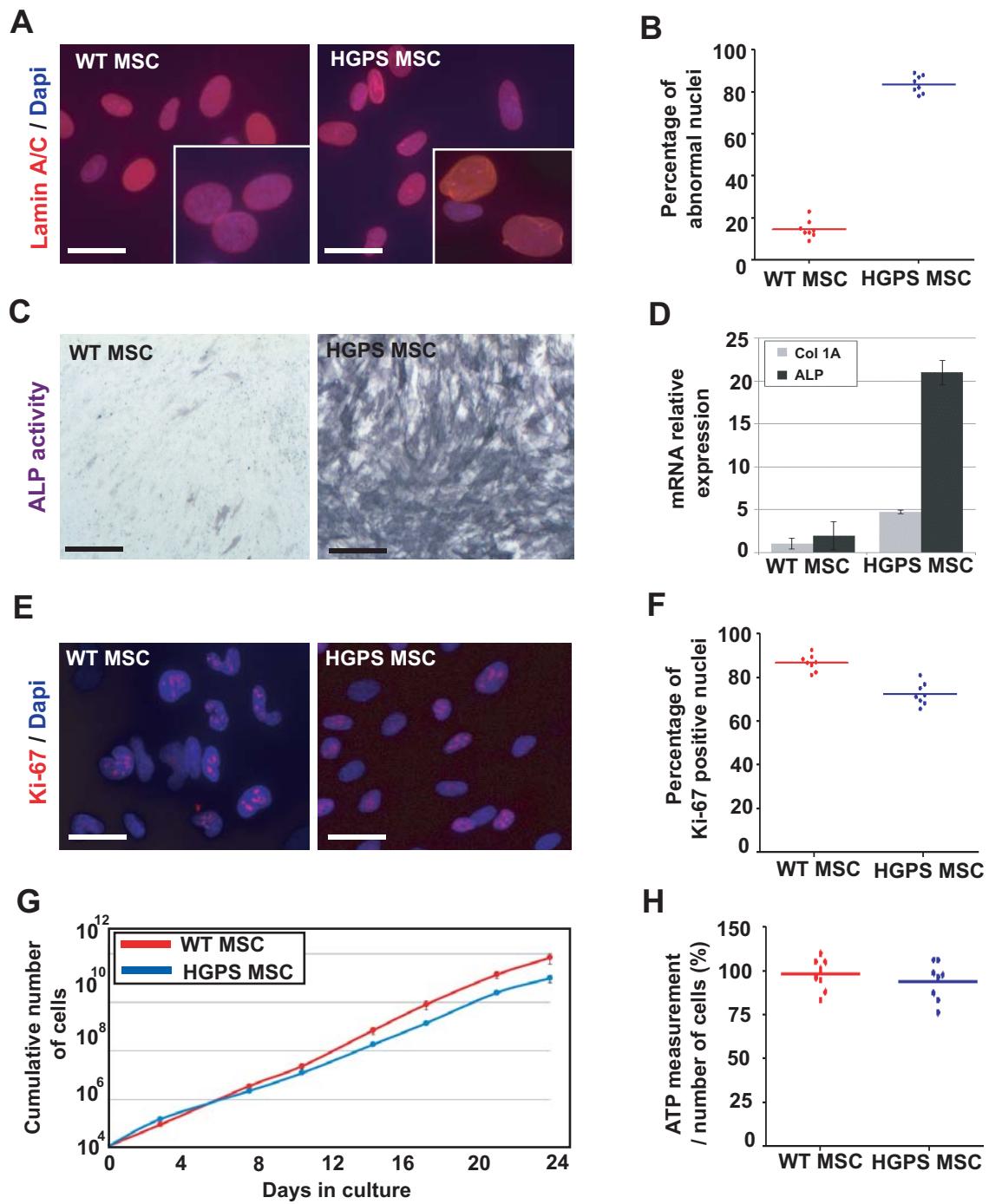


D



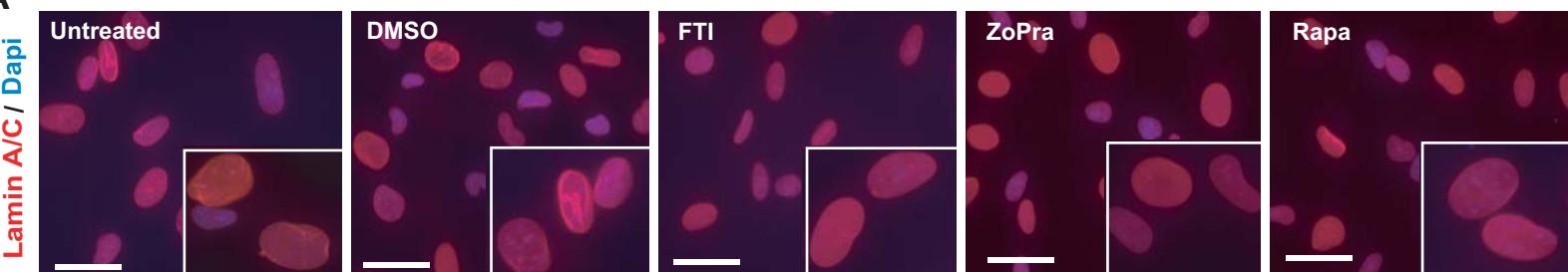
E



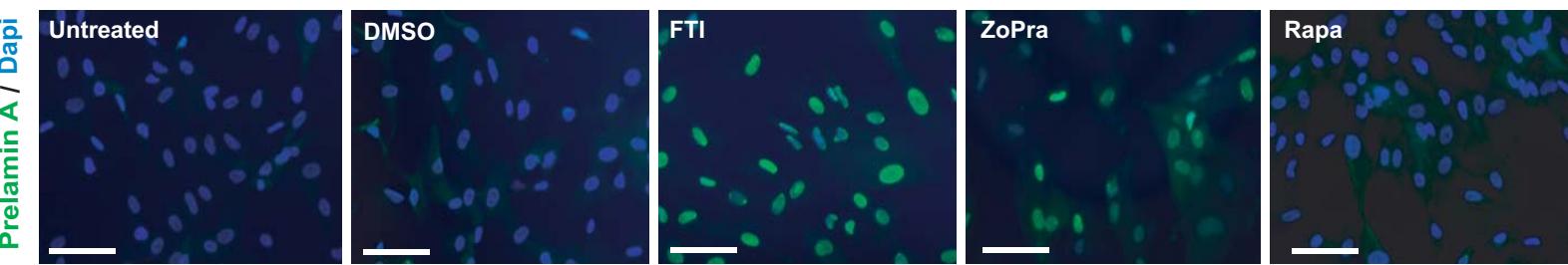


Blondel S et al., Figure 3

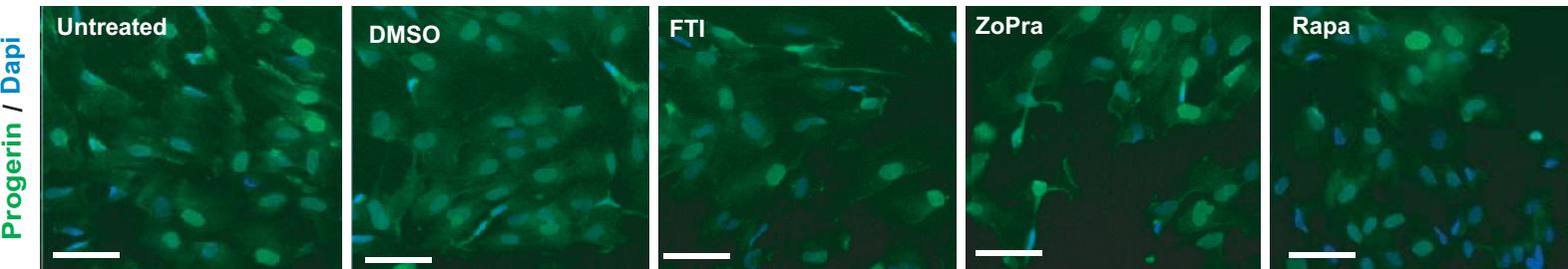
A



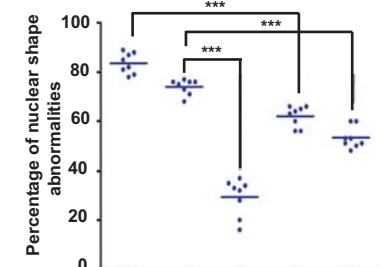
C



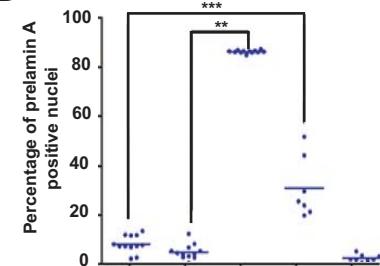
E



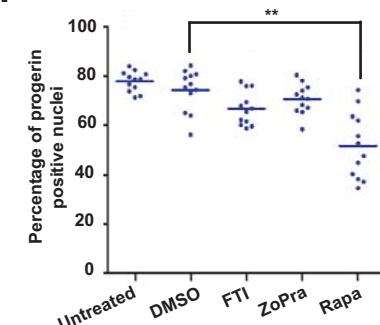
B



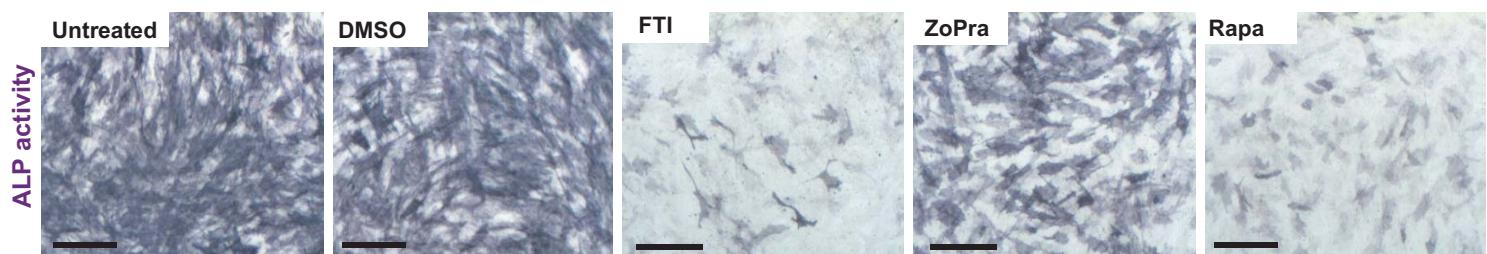
D



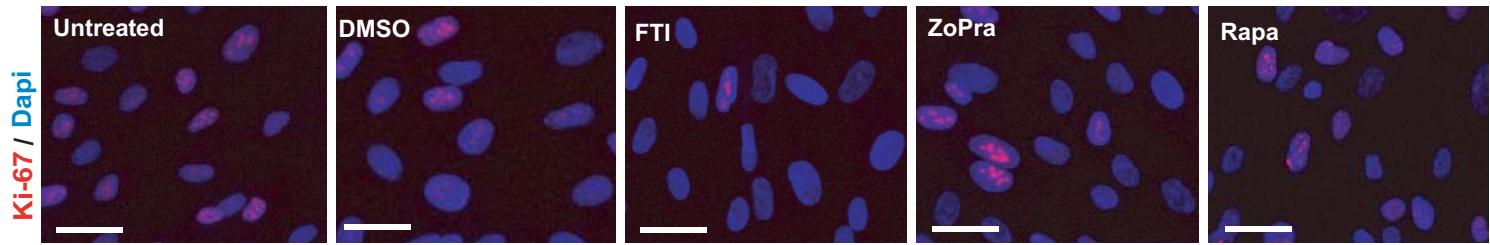
F



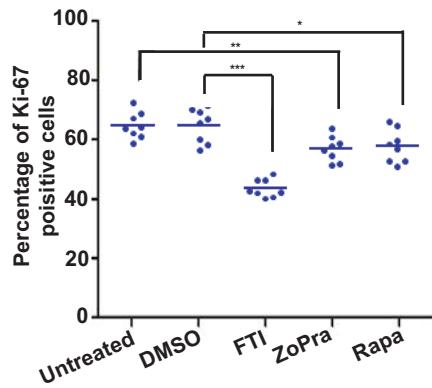
A



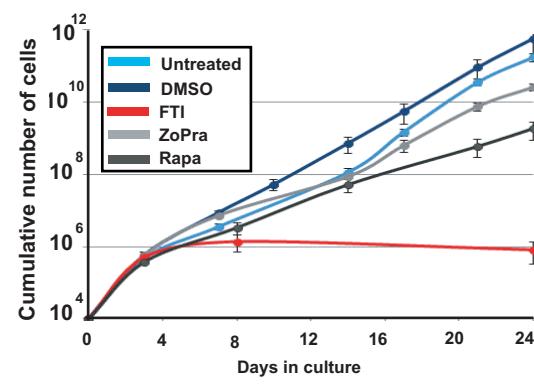
B



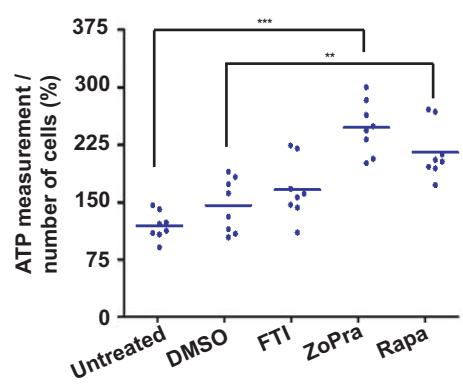
C



D

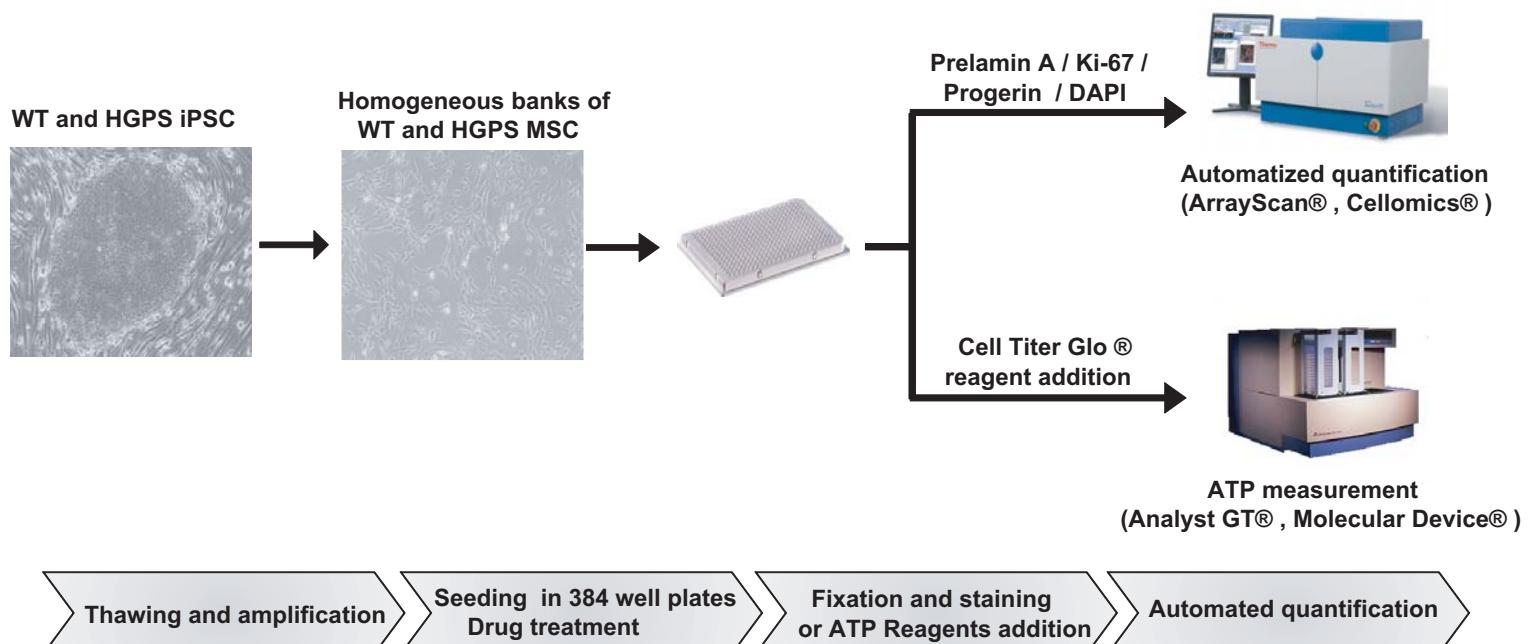


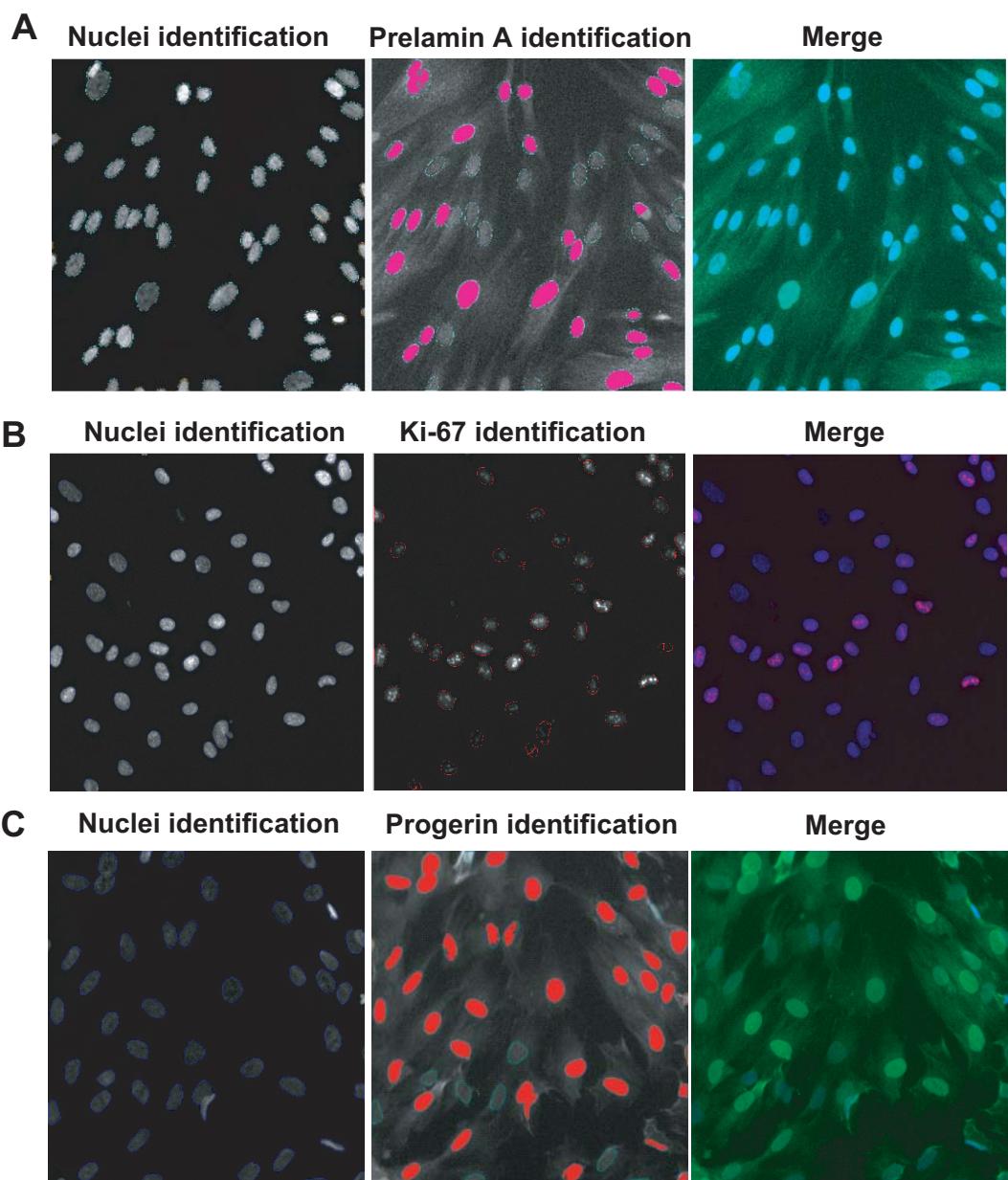
E

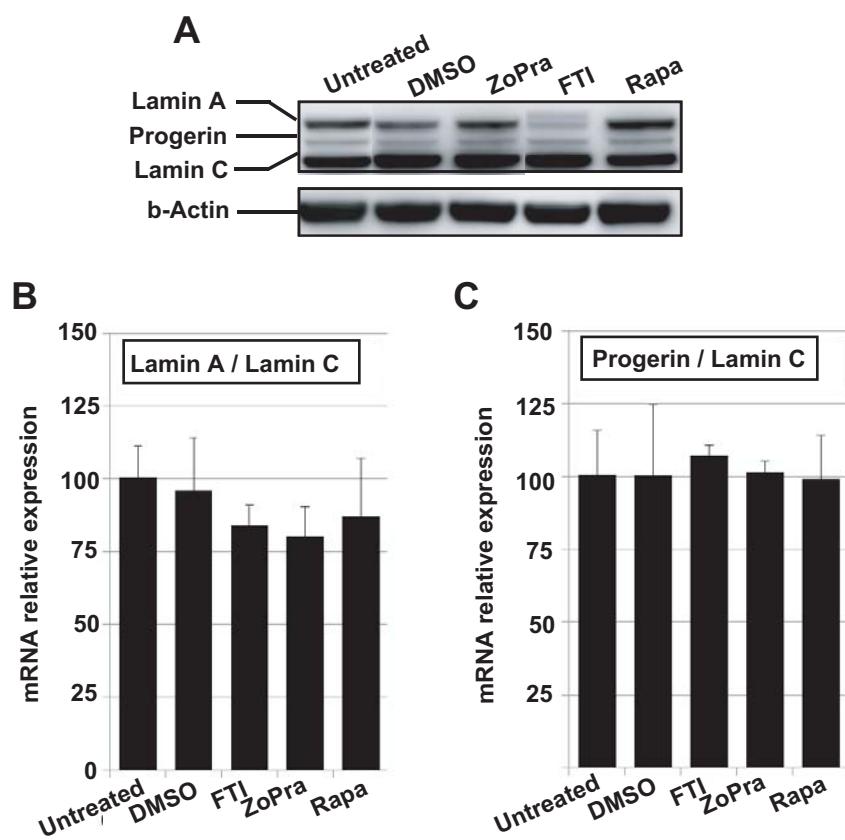


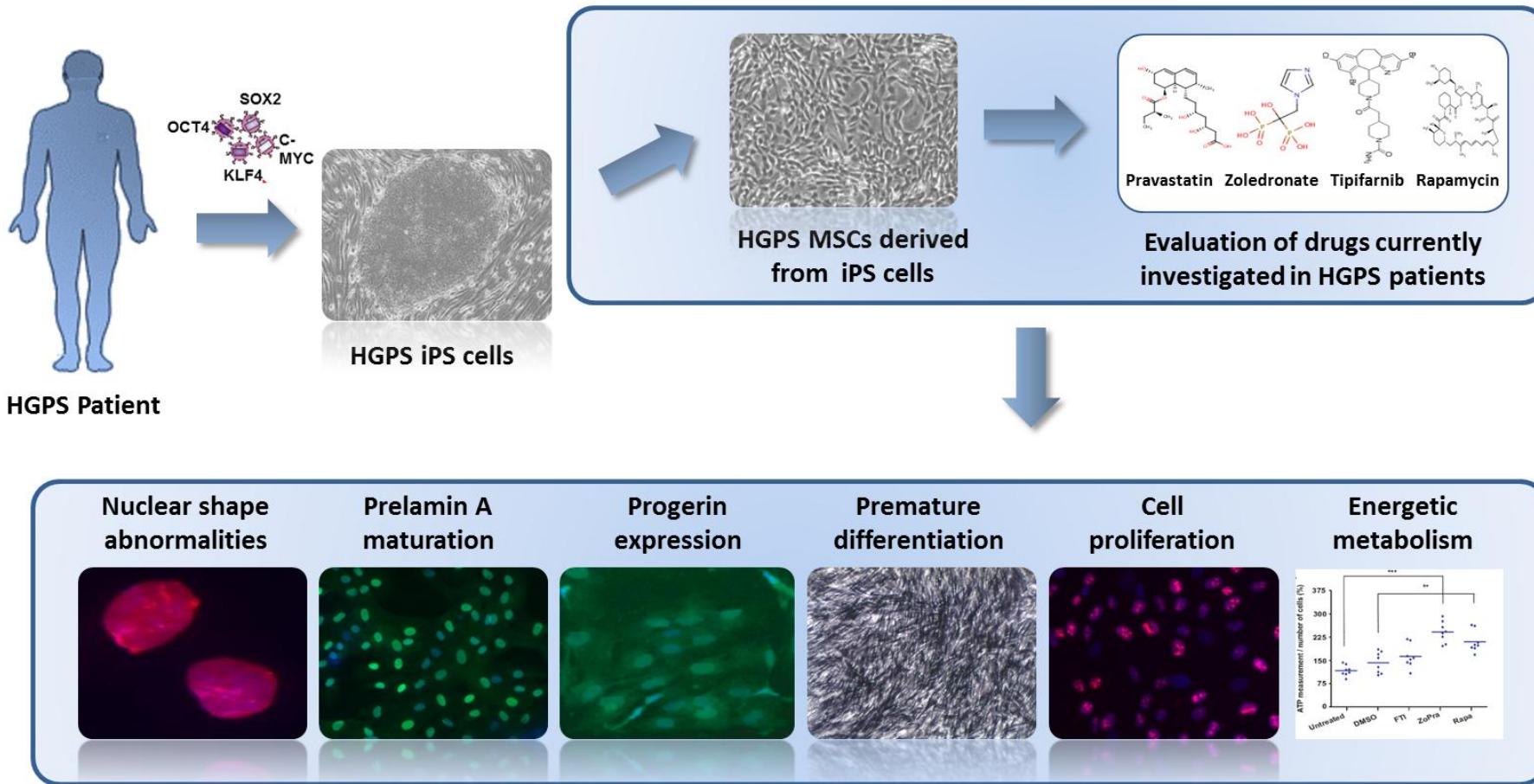
Recapitulation of the different drugs effects on HGPS pathological defects

	ZoPra	FTI	Rapamycin
Nuclear shape abnormalities	↓	↔	↓
Prelamin A maturation	↓	↓	↔
Progerin expressing cells	↔	↔	↓
LMNA splicing	↔	↔	↔
ATP / cell	↑↑	↔	↑
Premature osteogenesis	↓	↔	↔
Proliferation	↔	↓↓	↓









III. Réalisation d'un criblage à haut contenu de 20657 composés sur des MSCs dérivées d'iPSCs de patients atteints par la progéria

Titre de l'article : High throughput screening of chemical compounds identifies mono-aminopyrimidines as a new class of prelamin A modulators for the treatment of Hutchinson Gilford progeria syndrome.

Auteurs : Sophie BLONDEL, Delphine LAUSTRIAT, Anne-Laure JASKOWIAK, Anne-Laure EGESIPE, Amelie LE CORF, Pauline GEORGES, Johanna TOURNOIS, Melody MAZON, Claire NAVARRO, Annachiara DE SANDRE-GIOVANNOLI, Nicolas LEVY, Marc PESCHANSKI and Xavier NISSAN

III.1 Contexte de l'étude

Grâce à la preuve de concept de l'utilisation du modèle de MSCs progéria pour des approches pharmacologiques à large échelle décrite dans l'article précédent, nous avons tiré avantage de ces cellules pour étendre le champ d'action de ce modèle au criblage à haut contenu. A ce jour, aucun criblage à haut débit de petites molécules n'a été réalisé pour la progéria. Les composés actuellement proposés dans les études cliniques sont des médicaments habituellement prescrits dans d'autres indications qui ont été repositionnés dans la progéria. Le lonafarnib est un inhibiteur de la farnésylation utilisé en association dans des protocoles de chimiothérapie, la pravastatine est indiquée dans des dyslipidémies pour diminuer le LDL-cholestérol et le zolédonate est prescrit pour prévenir l'évolution de l'ostéoporose. L'ensemble de ces composés ont été sélectionnés pour leur capacité commune à inhiber la farnésylation, et notamment celle de la prélamine A. L'objectif de cette étude a consisté à utiliser les iPSCs pour réaliser un criblage à haut débit et identifier de nouvelles molécules potentiellement thérapeutiques pour la progéria. Ce travail fait l'objet d'une publication, soumise à la revue *Nature Biotechnology*.

III.2 Mise au point du test de criblage

Dans des conditions physiologiques, la prélamine A est synthétisée puis rapidement maturée en lamine A pour rejoindre la lamina nucléaire et le nucléoplasme. Dans la progéria, la prélamine A reste farnésylée et est anormalement accrochée à la membrane interne de

l'enveloppe nucléaire, l'empêchant de remplir ses fonctions (Sup Figure 1A, B et C). Afin d'éviter cette phase d'ancrage, l'objectif était de développer un test cellulaire permettant de d'identifier des molécules capables d'inhiber la maturation de la prélamine A. Ce test est basé sur un immunomarquage de la prélamine A avec un anticorps spécifique qui ne reconnaît pas les formes matures de lamine A et de la lamine C, réalisé sur des MSCs progéria (Figure 1A). Pour ce criblage, une chimiothèque de 20654 petites molécules reparties dans quatre librairies (Prestwich, ChemX, Curie et Lopac) a été retenue : (Sup Figure 2A). Alors que certaines contiennent des molécules qui possèdent déjà une autorisation de mise sur le marché, d'autres contiennent des composés qui ciblent des voies de signalisations connues mais la majorité des petites molécules ciblées n'ont pas de mécanismes d'action décrits. Le choix de ces librairies chimiques combine le criblage en aveugle avec une possibilité de repositionnement de drogue. Parallèlement, des contrôles positifs, MSCs traitées au tipifarnib 1 μ M, et négatifs, MSCs traitées au DMSO à 0,1 %, ont été ajoutés dans chaque plaque (Figure 1C).

III.3 Résultats du criblage

Le criblage primaire a consisté à évaluer la capacité de 20654 petites molécules à bloquer le processus de maturation de la prélamine A (Figure 1F). Chaque molécule a été testée en monoplicat en dose unique sur une durée de 48 heures (Figure 1B). Le résultat de ce criblage a mis en évidence cent un composés, nombre qui a été réduit à onze après re-test et réalisation de gamme de concentration (Figure 2A, B). Sept des onze hits ont été classés en trois familles chimiques : les mono-aminopyrimidines, les di-aminopyrimidines et les quinoléines carboxylamines. Les quatre autres sont des hits isolés appartenant à la famille des tetra-aminopyrimidines, des statines, des indoles surrogates et des spirochromanes (Figure 2C). Les statines et les quinoléines carboxylamines ont déjà été décrites dans la littérature comme ayant un lien avec l'inhibition de la farnésylation (Capell et al., 2005; Varela et al., 2008). Nous avons ensuite cherché à confirmer ces résultats par western blot puis à comprendre le mécanisme d'action de ces différentes molécules (Sup Figure 5B). Les résultats de cette étude ont ainsi démontré l'effet post-transcriptionnel de tous les hits identifiés (Sup Figure 6F). Nous avons ensuite cherché à étudier l'impact de ces différentes molécules sur l'état de l'enveloppe nucléaire des MSCs et avons montré que la majorité des hits isolés présentait une activité bénéfique sur ce défaut typique de la progéria. Dans cette étude, les trois membres de la famille des mono-aminopyrimidines se sont révélés être les molécules les plus efficaces avec une puissance similaire à celle obtenue avec les FTIs (Figure 3A et B). De manière

intéressante, nos travaux ont démontré que cette amélioration phénotypique n'était pas associée à une diminution de l'expression de la progérine mais bien de sa maturation. La caractérisation des effets potentiellement thérapeutiques dans la progéria a ensuite été investiguée par l'évaluation de la capacité des hits à ralentir la différenciation des MSCs vers le lignage ostéogénique, un autre défaut observé dans la progéria. Ces travaux démontrent que tous les hits, excepté deux, avaient la propriété de ralentir la différenciation vers ce lignage avec une efficacité différente, la famille des mono-aminopyrimidines faisant encore une fois partie des molécules les plus actives (Figure 3C et D).

Dans l'optique de s'assurer de l'innocuité de ces molécules, leur capacité à moduler la prolifération et le métabolisme énergétique a été étudiée démontrant que seules la simvastatine et la spirochromane provoquaient une faible diminution de la prolifération aux doses testées et qu'aucune n'avait d'influence sur le métabolisme énergétique (Figure 3E et F).

III.4 Conclusion

Cette étude a ainsi démontré la possibilité de réaliser un criblage à haut contenu sur des cellules issues de patients atteints par la progéria. Ainsi, onze molécules capables de bloquer la maturation de la prélamine A ont présenté un potentiel thérapeutique. Parmi ces molécules, la famille des mono-aminopyrimidines, semble avoir un intérêt particulier puisque thérapeutique sans toxicité apparente. Bien qu'il reste à mieux caractériser ces molécules aussi bien sur le plan pharmacologique que toxicologique, leur découverte ouvre de nouvelles pistes thérapeutiques pour la progéria.

High throughput screening of chemical compounds identifies mono-aminopyrimidines as a new class of prelamin A modulators for the treatment of Hutchinson Gilford progeria syndrome.

Sophie BLONDEL¹, Delphine LAUSTRIAT², Anne-Laure JASKOWIAK², Anne-Laure EGESIPE¹, Amelie LE CORF¹, Pauline GEORGES², Johanna TOURNOIS², Melody MAZON¹, Michel LEGRAVEREND³, Claire NAVARRO⁴, Annachiara DE SANDRE-GIOVANNOLI⁴, Nicolas LEVY⁴, Marc PESCHANSKI^{1,2} and Xavier NISSAN^{2*}

¹ INSERM/UEVE 861, I-STEM, AFM, Institute for Stem cell Therapy and Exploration of Monogenic diseases, 5 rue Henri Desbruères, 91030 Evry cedex, France

² CECS, I-STEM, AFM, Institute for Stem cell Therapy and Exploration of Monogenic diseases, 5 rue Henri Desbruères, 91030 Evry cedex, France

³ UMR 176, Institut Curie, Bât. 110-112, Centre Universitaire, 91405 Orsay, France

⁴ INSERM UMR S 910 Génétique médicale et génomique fonctionnelle, faculté de médecine Timone - Université de la Méditerranée

*correspondence xnissan@istem.fr, +33169908591

ABSTRACT

Hutchinson Gilford progeria syndrome (HGPS) is a rare genetic disorder causing a systemic accelerating aging in children. To date, because of the absence of cellular model compatible with high throughput screening, all the treatments evaluated on patients were drugs identified through hypothesis driven strategies and repositioning indications. Here we report the result of the first screening of small molecules performed on this disease. In this study, 20 654 small-molecules were evaluated on prelamin A maturation process in mesenchymal stem cells derived from HGPS induced pluripotent stem cells. Retest and dose responses experiments confirmed the efficiency of 11 compounds in absence of any cell toxicity. Structural analysis of these hits revealed that, among these 11 compounds, 3 were parts of the same chemical family named mono-aminopyrimidins (MAPs). Finally, secondary functional characterization demonstrated that MAPs were capable to efficiently restore two main phenotypes of this

disease namely nuclear shape abnormalities and premature osteoblastic differentiation. Altogether, our results open new therapeutical perspectives for the treatment of this incurable syndrome revealing the interest of a new class of molecules modulating prelamin A maturation.

LETTER

Thanks to their pluripotence and self-renewal properties, iPS cells offer a unique way to produce an unlimited and homogeneous biological resource for large scale drug screening and open new therapeutical perspectives for pathologies like Hutchinson Gilford progeria syndrome (HGPS) that do not dispose of curative treatment (Lee, nature biotech, 2012; McLaren, journal of biomolecular screening, 2013; Desbordes, nature protocol, 2013; Choi, hepatology, 2013). HGPS is an extremely rare genetic disease due to a single-base substitution (C1284T) in the exon 11 of *LMNA* gene (Burke and Stewart, 2006; De Sandre-Giovannoli et al., 2003). This mutation leads to the activation of a cryptic splicing donor site yielding to the deletion of 50 amino acid in prelamin A protein (Eriksson et al., 2003; Navarro et al., 2006). Because this deleted sequence is necessary to prelamin A maturation, the mutant form of lamin A, called progerin, can not be matured and accumulate at the nuclear membrane leading to disorganization of nuclear shape and a set of well characterized dysfunctions as premature senescence, defects in DNA repair, cell proliferation or differentiation (Blondel et al., 2013). Clinically, children affected by HGPS present a segmental premature aging with widespread phenotypic features and progressive atherosclerotic disease, origin of the death (Merideth et al., 2008). Since the discovery of the molecular mechanism leading to progerin accumulation, three different drugs were repositioned by hypothesis driven to HGPS for their ability to target prenylation process namely pravastatin, zoledronate and lonafarnib. These molecules were evaluated alone or in combination on HGPS patients. Although these drugs improve some of patient's phenotypes, to date, there is no curative treatment to that disease (Gordon et al.). One of the main reasons of this lack of treatment is, in the case of HGPS, that drug screening was not feasible because of the premature senescence of primary patient's cells.

In this study, we demonstrated the presence of several characteristic defects of HGPS in mesenchymal stem cells derived from iPS cells (HGPS MSC) and demonstrated their capacities to respond to modulators of prelamin A maturation improving their nuclear shape

architecture and their premature differentiation into osteoblastic lineage (Figure 1A). In physiological conditions, as well as in wild type cells as in HGPS cells, prelamin A is synthesized and immediately recruited by the endoplasmic reticulum to undertake post-translational modifications necessary for lamin A maturation (Sup Figure 1A) (Navarro et al., 2006). As previously described in the literature, FTIs and ZoPra treatment inhibit prelamin A maturation process leading to an accumulation of prelamin A at the nuclear membrane (Sup Figure 1B and 1C) (Varela et al., 2008; Yang et al., 2005; Yang et al.) Several studies demonstrated the relevance of these two approaches showing that this accumulation of prelamin A in the nuclear membrane was correlated with an improvement of nuclear shape and other cellular defects related to HGPS (Capell et al., 2005; Capell et al., 2008; Glynn and Glover, 2005; Varela et al., 2008; Young et al., 2013). However in the case of FTIs, several studies revealed toxicity associated to the treatment. Our results confirmed these observations revealing an improvement of nuclear shape abnormalities and osteogenic differentiation but a decrease of Ki-67 positive HGPS MSC after 48 hours of treatment with FTIs and a complete arrest of proliferation after 1 week (Figure 1A). In this study, we planned to use this unique biological resource to identify new drugs targeting the same pathway without this associated cell toxicity. Here we described the first high throughput screening of chemical compound performed on HGPS cells through the use of iPS cells derivatives. This screening assay is based on the detection of prelamin A localization in 384 well plates with the assumption that its nuclear localization is directly correlated to the inhibition of its maturation (Figure 1B). First, immunostaining of prelamin A was optimized up to obtain a homogeneous seeding of HGPS MSC in 384 well plates (Figure 1C). Quality control of this screening was then assessed by the calculation of a Z'factor between 192 negative and positive controls in 3 independent plates (Sup Figure 2A and 2B). Accordingly a Z' factor superior to 0.8 authorized the screen of 20 654 small-molecules were tested on HGPS MSC (Figure 1D). The compound library used for the screening is composed of 4 different libraries presenting an optimal chemical diversity (Sup Figure 3A). Screening rolled out in several steps (Sup Figure 3B). First, HGPS MSC were seeded in 384 well plates using a Biocell 1800 screening platform (Agilent) and 5 hours later treated with each of the 20 654 compounds contained in the compound library, negative controls (DMSO 0.1%) and positive controls (Tipifarnib 0.1%) for 48 hours. Each of the 72 plates of the screening were treated 48 hours, fixed and stained with the specific anti-prelamin A antibody using the optimized protocols previously described (Blondel et al., 2013). Quantification of prelamin A localization was performed using an automated imaging platform. Quality control of the screening was validated by a

Z'factor calculation in each plate with a mean of 0.8 (Sup Figure 4A). A threshold of 0.5 was used to qualify the different plates processed during the screening. Molecules inducing a detection of prelamin A stained nuclei were considered as potential candidates if their effect was superior to 3 standard deviation of the mean of all compounds tested (Sup Figure 4B). To prevent the discovery of toxic molecules, the number of cells per field was monitored and candidates showing mortality superior to 30% were excluded. Based on this analysis, a list of 57 candidates was identified (Figure 2A and Sup Table 1). Retest experiments excluded 41 among these 57 candidates considering them as false positives or toxic compounds (Sup Table 2). Finally, a list of 16 validated candidates was established and evaluated in dose response revealing that 11 of these molecules were considered as hits when their effects was superior to 50% without any cell toxicity (Figure 2B). Chemical structure analysis of these hits revealed that 7 of these hits could be classified in 3 distinct chemical families: quinolines carboxamides (QCs), mono-aminopyrimidines (MAPs), di-aminopyrimidines (DAPs). The 4 others hits were considered as isolated hits but belonging to known chemical families tetra-aminopyrimidines (TAPs), statins, indoles surrogates (ISs) and spirochomanes (SCMs) (Figure 2C and Sup Figure 5). To validate the results of the screening, the effects of these 11 hits were evaluated on prelamin A maturation process. First immunostaining of prelamin A confirmed the efficiency of the 11 hits on prelamin A accumulation in the nuclear membrane (Sup Figure 6A). Second, Western blot analysis confirmed that lamin C was not affected by any of the treatment whereas prelamin A was increased (Sup Figure 6B). Finally, the post-translational effect of the hits on prelamin A maturation was confirmed by quantitative PCR analysis revealing that neither lamin A, C nor progerin transcripts were modulated by any the 11 hits (Sup Figure 7A and 7B). Interestingly, this primary screening allows the identification of 2 hits belonging to the QC family. Drugs belonging to this chemical family were initially described for their inhibition of farnesylation of RAS to decrease proliferation in cancer indications (Sebti and Der, 2003) and evaluated in patients for their ability to treat malaria through the inhibition of farnesyl transferase in *plasmodium falciparum* (Eastman et al., 2006; Gupta and Prabhakar, 2008; Nallan et al., 2005; Van Voorhis et al., 2007). Following these studies, QCs were then evaluated in HGPS showing an improvement of nuclear shape abnormalities of patient's fibroblasts (Capell et al., 2005). In the same way, another chemical family previously described as known farnesylation inhibitor and potential HGPS treatment was identified, the statins (Varela et al., 2008). The identification of these known modulators of farnesylation strengthens the relevance of the approach suggesting moreover that therapeutical potential of the other hits identified. Function of spirochomanes family is more

elusive. Recent studies reported that some members of this family could be identified as Akt or histone deacetylase (HDAC) inhibitors but no relation with farnesylation was described as for the indole surrogates family or pyrimidines.

As previously described, HGPS MSCs recapitulate several aspect of the disease. Because nuclear shape abnormalities are the hallmark of the disease, the 11 hits were evaluated on their capacity to rescue of this parameter (Figure 3A and 3B, Sup. Figure 8). Results of this study revealed that the three MAPs were the most efficient compounds restoring respectively 30%, 39% and 40% of HGPS MSCs nuclear shape defects. As expected, QCs were also found to significantly restore this pathological structural defect. Interestingly 3 of the 11 hits, TAP, SIMVA had no effect on this parameter suggesting that mechanisms independent to farnesylation are involved. Even if 8 among the 11 hits were capable to restore this key parameter for HGPS, these results support the hypothesis that farnesylation inhibition is not systematically correlated to a decrease of abnormal nuclear architecture.

Previous studies revealed that overexpression of progerin in WT MSC could induce a premature osteogenic differentiation suggesting a similar mechanism in HGPS MSC (Scaffidi and Misteli, 2008). More recently, our team demonstrated that MSC derived from HGPS iPS cells presented the same increase of premature differentiation (Blondel et al., 2013). Accordingly, the effect of each of the 11 hits was monitored on this functional impairment *via* a measure of alkaline phosphatase activity following 7 days of osteogenic differentiation. Our results demonstrated that both MAPs and DAPs were capable to rescue this phenotype (Figure 3C and 3D, Sup Figure 9). SIMVA and more moderately IS and TAP were also capable to significantly restore this phenotypes. It is interesting to mention that, with the exception of QCs, all the other molecules restoring nuclear shape abnormalities are significantly improving this premature differentiation. Together, these results underscore the complexity to assess the pharmacological mechanism of action of chemical compounds in a context of systemic diseases such as HGPS. To date, the gold standard read out to assess the efficiency of a drug for HGPS is to quantify its effect on nuclear shape abnormalities (Cao et al., 2011; Capell et al., 2005; Varela et al., 2008). Our results open the discussion to the establishment of technical guideline permitting to describe a set of parameters to investigate and compare the effect of the drugs newly identified. This systematic study will standardize tests of efficiency for this syndrome and will allow predicting, more accurately, the beneficial effects which could bring these new treatments.

Finally, in the last part of this work, we focused on the assessment of potential negative off target effect of the molecules identified. For this, two parameters were investigated: Ki-67 quantification which conveys the proliferative potential of cells and ATP content measurement that reflect the metabolic cell activity. Quantification of Ki-67 positive cells following the different treatments revealed that only one compound could increase cell proliferation, the DAP1 (Figure 3E). In the same way ATP content quantification revealed that DAP1, QC1, IS and SIMVA were capable to significantly increase energetic metabolism whereas the most efficient compounds on nuclear shape and osteogenic differentiation were not improving this parameter (Figure 3F). Altogether, these results revealed two types of molecules presenting different profiles on HGPS defects. Most of the prelamin A modulators were shown to efficiently restore nuclear shape abnormalities without improving cell proliferation or energetic metabolism whereas others had no impact on nuclear shape abnormalities. In front of these data, one hypothesis is that, in the case of HGPS, any efficient drugs could be associated to a decrease of cell proliferation. This hypothesis is supported by lots of observations in the literature indicating that ZoPra, Rapamycin and FTIs treatments of HGPS cells were associated to a decrease of cell proliferation. Our results revealed that MAPs present an interesting profile rescuing several key aspect of this disease without decreasing cell proliferation. Altogether, this study report the first primary screening of chemical compounds performed on HGPS cells opening the door to their evaluation in relevant animal models (Osorio et al., 2011; Villa-Bellosta et al., 2013).

Since the discovery of human iPSCs, the use of disease-specific cells for drug validation and drug discovery has been an important goal. Besides the discovery of potential treatments for HGPS, this study represents also the most important high throughput screening of chemical compounds performed on iPS cells derivatives. In the last two years, several disease modeling studies have demonstrated the use of iPSC-derived cell types for validating small sets of drug candidates. More recently, technological barriers for the evaluation of thousands of molecules were raised by several groups. Proof of concept was recently reported by Lorenz Studer and colleagues performing the screening of a library of 6 912 small molecules on iPS cells derivatives and identifying 8 compounds rescuing expression of *IKBKAP*, the gene responsible for familial dysautonomia (Lee et al., 2012). Quantification of their effects on the disease-specific loss of autonomic neuronal marker expression, have finally permitted to identify one molecule, KF-86466, as a potential treatment for this disease. In the case of HGPS, this approach permitted to identify, not only known inhibitors of the farnesylation but

also new compounds capable to inhibit prelamin A maturation in HGPS MSC. However, before an evaluation in patients, several questions need to be addressed. First of all, these drugs need to be optimized in order to increase their bioavailability and reduce the potential off targets effect. A second important challenge to rise is to understand their mechanism of action to eventually try to combine these molecules to the currently used treatments. Finally, their functional benefit effects needs to be evaluated in mice models recapitulating most of the symptoms associated to this disease.

MATERIALS AND METHODS

Fibroblasts reprogramming

Fibroblasts used in this study were isolated from patient biopsies performed in the Assistance Publique Hôpitaux de Marseille for the patient 13-8243 and provided by Coriell Cell Repository (Camden, USA) for control DM4603. The fibroblasts were reprogrammed to iPSC using Yamanaka's original method with OCT4, KLF4, SOX2, c-Myc, transferred using retroviral vectors (Takahashi et al., 2007).

Pluripotent stem cells culture and differentiation

WT and HGPS iPSC were grown on STO mouse fibroblasts, inactivated with 10 mg/ml mitomycin C seeded at 30000/cm² and grown as previously described (Nissan et al., 2012). For differentiation, iPSC were differentiated into mesenchymal stem cells MSC using directed protocols for differentiation previously published by our group (Giraud-Triboult et al., 2010).

PrelaminA localization cell-based assay

2000 HGPS MSCs were plated in black 384-well clear-bottom plates (Corning). After 48h of drug treatment, cells were fixed in 4% paraformaldehyde (15 minutes, room temperature). Permeabilization, blocking and primary hybridization steps were done concomitantly in a PBS solution supplemented with 0.1% triton X-100 and 1% BSA (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) and rabbit anti-prelamin A (ANT0045, Diatheva) overnight at 4°C. Cells were stained with the species-specific fluorophore-conjugated secondary anti-rabbit antibody (Invitrogen) (one hour, room temperature) and nuclei were visualized with DAPI. These steps were automated using a washing/staining station (ELx405 Biotek, RapidStak Thermo, Multidrop Labsystems). Prelamin A localization was analyzed with an ArrayScan VTI HCS Reader

(Cellomics). The first channel was used for nucleus identification (DAPI staining) and the second one to identify prelamin A staining. Pictures were acquired with a 5x objective in high-resolution camera mode and were analyzed using the Spot Detector V4 Bioapplication. The robustness of the assay was evaluated using the Z' factor calculated as follows $Z' = 1 - [3(SDP + SDN) / (MP - MN)]$ where MP and MN correspond to the means of the positive (Tipifarnib 1 μ M) and negative (DMSO 0.1%) controls, respectively, and SDP and SDN correspond to their standard deviation.

Primary Screening Treatments

The primary screen was conducted on Biocel 1800 (Agilent). For this, 2000 HGPS MSCs were seeded in 38 μ L of 10% FBS culture medium per well into black 384-well clear-bottom plates coated with 0.1% of gelatin. Five hours after seeding, 2 μ L of 20X compounds from the chemical libraries were transferred in monoplicate into cell assay plates. In each plate, negative control (DMSO 0.1%) and positive control (Tipifarnib 1 μ M) were added in columns 1 and 2 respectively. Plates were then incubated for 48 hours and then processed for prelamin A detection assay.

Chemical library

Chemical library includes 20 654 compounds that belong to 4 different libraries distributed in 384-well plate format and obtained from Prestwick Chemical (Illkirch, France), LOPAC (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), CHEM-X-INFINITY (Romainville, France) and Curie Institute (Orsay, France). 1- The Prestwick Chemical library contains 1200 FDA approved drugs. This library was tested at two concentrations: 0.2 μ M and 5 μ M. 2- The LOPAC library (Sigma-Aldrich) contains a collection of 1264 pharmacologically active compounds. This library was tested at two concentrations: 0.2 μ M and 10 μ M. 3- The Chem-X-Infinity library is composed of 10 568 small organic molecules that belong to approximately 30 different chemical families. This library was tested at the concentration of 5 μ M. 4- The Institute Curie library contains 8640 small molecules that were obtained during optimization programs against different therapeutic targets including anti-HIV, anti-kinases, protein-protein interactions, phosphatase inhibitors. This library was tested at 2.5 μ g/mL that corresponds to concentrations comprise between 2 and 15 μ M.

Data analysis

Data analysis of the screening was performed using a customized Hiscreen application (Discngine, Paris, France) connected to Spotfire software (Tibco Co). Screening robustness was evaluated by calculating for each plate the Z'factor on the percentage of prelaminA nuclei parameter. Raw data related to the percentage of cells with prelamin A nuclei and to cell number per field were normalized to the average of DMSO controls. Hit selection was performed using in parallel a Z-score plate and a Z-score run method on these normalized data. Only hits whose Z-score plate and/or Z-score run was ≥ 3 and that did not decrease cell number by more than 30% compared to DMSO condition were selected for subsequent validation steps. These latter were retested in quadruplicate at the same concentration as for the primary screen. Validated hits were then tested at gradual concentrations for parallel exploration of their efficacy, potency and toxicity.

Osteogenic differentiation

MSC were seeded at 1000 cells per well in 384 well plate in MSC culture medium and treated as previously described. After 48 hours, MSC medium was replaced by STEMPRO osteogenic induction medium (Invitrogen) in presence or not of the different drugs. Medium was replaced every 2 days. After 7 days of treatment, cells were fixed with ethanol 95% and stained by adding a colorimetric substrate of the alkaline phosphatase, the 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/Nitro blue tetrazolium (Sigma-Aldrich).

Immunocytochemistry

Cells were fixed in 4% paraformaldehyde (15 minutes, room temperature) before permeabilization and blocking in PBS supplemented with 0.1% triton X-100 and 1% BSA (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Primary antibodies were incubated one hour at room temperature in blocking buffer. Antibodies included mouse anti-lamins A/C (clone JOL2, Millipore, Billerica, USA), rabbit anti-prelamin A (ANT0045, Diatheva) and anti-Ki67 (clone Ki-S5, MAB4190, Millipore, Billerica, USA). Cells were stained with the species-specific fluorophore-conjugated secondary antibody (Invitrogen) (one hour, room temperature) and nuclei were visualized with DAPI.

ATP measurement

HGPS and control MSC were seeded in a 96 well plates (3917, Corning) (5 000 cells/well) and treated with the different drugs. After 48 hours of treatment in unique dose, ATP content

was measured using CellTiter Glo® (Promega) accordingly to the manufacturer recommendations. Luminescence was measured with an Analyst GT multimode plate reader (Molecular devices). In parallel, Hoechst stained nuclei were counted in each well thanks to an automated microscope. The results exploited are given in the ratio between ATP measurement and the number of nuclei counted.

Western immunoblotting

Whole-cell lysates of MSC were collected, separated by SDS-PAGE, and transferred onto PVDF membrane by liquid transfer method. Blots were blocked in 10% skim milk (Bio-Rad) in tween 0.1% tris-buffered saline (TTBS) 1X one hour at room temperature. The primary antibodies used were a mouse anti-lamins A/C 1:200 (Millipore, JOL2), a rabbit anti-prelamin A 1/100 (ANT0045, Diatheva) and a β -actin 1/200 000 (Sigma). Membranes were incubated during the night at 4°C. Antigen-antibody binding was detected using horseradish peroxidase-conjugated species-specific secondary antibodies (GE-Healthcare, Little Chalfont, UK) followed by enhanced chemiluminescence Western blotting detection reagents (Perkin-Elmer, Waltham, USA).

Quantitative PCR

Total RNA was isolated using RNeasy Mini extraction kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) according to the manufacturer's protocol. An on-column DNase I digestion was performed to avoid genomic DNA amplification. RNA level and quality were checked using the Nanodrop technology. A total of 500 ng of RNA was used for reverse transcription using the Superscript III reverse transcription kit (Invitrogen). Q-PCR analysis was performed using a ABI 7900 system (Applied biosystem) and TaqMan gene expression Master Mix (Roche) following the manufacturer's instructions. Quantification of gene expression was based on the DeltaCt Method and normalized on 18S expression (Assay HS_099999). PCR primers were previously described by S. Rodriguez and colleagues (Rodriguez S et al., 2009). Primer sequences were lamin A (exons 11/12), 5'-TCTTCTGCCTCCAGTGTACG-3' and 5'-AGTTCTGGGGCTCTGGT-3'; lamin C (exons 9/10), 5'-CAACTCCACTGGGGAAAGAAGT-3' and 5'-CGGCGGCTACCACTCAC-3' and Progerin (exons 11/12), 5'-ACTGCAGCAGCTGGGG-3' and 5'-TCTGGGGCTCTGGGC-3'. Taqman MGB probe sequences were lamin A (exon 11), 5'-ACTCGCAGCTACCG-3'; lamin C (exon10), 5'-ATGCGCAAGCTGGT-3' and Progerin (exon 11), 5'-CGCTGAGTACAACCT-3'. Reporter and quencher dyes for the LMNA locus assays were 5'

6FAM and 3'- nonfluorescent quencher dye (NFQ; Applied Biosystems).

Statistical analysis

Statistical analysis has been performed by one-way analysis of variance (ANOVA), using the Dunnet's comparison test. Values of $p < 0.05$ were considered significant (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

FIGURE LEGENDS

Figure 1: High throughput screening of 20 654 small molecules on prelamin A maturation

- (G) Effect of FTI on prelamin A maturation process (prelamin A immunostaining), nuclear shape abnormalities (lamin A/C immunostaining), osteogenic differentiation (Alkaline phosphatase activity) and cell proliferation (Ki-67 immunostaining) in HGPS MSC in comparison to WT MSC.
- (H) Workflow of the high throughput screening of prelamin A modulators.
- (I) Prelamin A and DAPI immunostaining in HGPS MSC treated with FTIs.
- (J) Primary screen cell based assay for prelamin A localisation. Dot plot representation of the effects of the 20 654 compounds on prelamin A maturation process and cell viability. The red rectangle represents the defined thresholds for the hit selection.

Figure 2: Identification of new chemical compounds targeting prelamin A maturation process

- (A) Description of the different key steps of screening validation.
- (B) Dose-response experiments of the 11 prelamin A modulators identified. Each chart represents cell viability (in blue) and percentage of prelamin A positive nuclei (in red). Each point represents the mean +/- SD of the percentage of 8 replicates.
- (C) List of the 11 prelamin A modulators identified after screening validation.

Figure 3: Pharmacological evaluation of the 11 prelamin A modulators on HGPS defects

- (A) Measure of nuclear shape abnormalities (lamin A/C immunostaining) in HGPS MSCs following 48 hours of treatments with each of the 11 prelamin A modulators. Each chart represents the mean +/- SD of 8 independent experiments (* p< 0.05, ** p<0.01, *** p<0.001).
- (B) Lamin A/C immunostaining of HGPS MSCs following 48 hours of treatments with each of the three most efficient compounds on this parameter (MAP1, MAP2 and MAP3). Scale bar represents 50µm.
- (C) Measure of osteogenic differentiation (Alkaline phosphatase activity) in HGPS MSCs following 7 days of differentiation in presence of each of the 11 prelamin A modulators. Each chart represents the mean +/- SD of 8 independent experiments. Data are normalized on cell number (* p< 0.05, ** p<0.01, *** p<0.001).
- (D) Alkaline phosphatase activity of HGPS MSCs following 7 days of differentiation in presence of each of the three most efficient compounds on this parameter (SIMVA, MAP1 and DAP1). Scale bar represents 50µm.
- (E) Measure of cell proliferation (Ki-67 immunostaining) in HGPS MSCs following 48 hours of treatments with each of the 11 prelamin A modulators. Each chart represents the mean +/- SD of 8 independent experiments (* p< 0.05, ** p<0.01, *** p<0.001).
- (F) Measure of ATP content per cell in HGPS MSCs following 48 hours of treatments with each of the 11 prelamin A modulators. Each chart represents the mean +/- SD of 8 independent experiments (* p< 0.05, ** p<0.01, *** p<0.001).

Sup Figure 1: Schematic representation of prelamin A maturation process in WT cells

(A), HGPS cells (B) and cells treated with inhibitors of farnesylation (C)

Sup Figure 2: Development of a high throughput screening assay to quantify the effect of chemical compounds on prelamin A maturation in 384 well plates.

- (A) Automated quantification of prelamin A-stained nuclei in HGPS MSCs following 48 hours of treatment with a FTI positive control (Tipifarnib 1µM). Scale bar represents 50µm.

(B) Determination of the Z' factor following a regular immunostaining protocol and the optimized protocol in 384 well plates. Each dot represents in blue negative controls (DMSO 0,1%) and in red positive controls (Tipifarnib)

Sup Figure 3: Experimental procedure of the screening of prelamin A modulators

(A) Composition of the different chemical compounds libraries used in the screening
(B) Main steps of the screening procedure

Sup Figure 4: Results of the screening of prelamin A modulators on HGPS MSC

(A) Quality control of the screening procedure. Each chart represents the internal Z' factor calculation of each of the 384 well plates.
(B) Dot plot representation of the screening results on prelamin A maturation. Blue dots represent negative controls (DMSO 0,1%), red plots positive controls (Tipifarnib) and grey plots, each of the 20654 compounds tested

Sup Figure 5: Chemical structures of the 11 validated compounds targeting prelamin A maturation process

Sup Figure 6: Effect of the 11 validated compounds on prelamin A maturation process

(A) Prelamin A immunostaining of HGPS MSCs following 48 hours of treatments with each of the 11 validated compounds. Scale bar represents 50 μ m.
(B) Western blot analysis of lamin A/C, prelamin A and β -actin expression in HGPS MSC following 48 hours of treatments with each of the 11 validated compounds.

Sup Figure 7: Effect of the 11 validated compounds on LMNA splicing and progerin expression

(A) Gene expression analysis of lamin A/C ratio in HGPS MSC following 48 hours of treatments with each of the 11 validated compounds. Data are normalized on DMSO 0.1% treated HGPS MSC. Each chart represents the mean +/- SD of three independent experiments (* p< 0.05, ** p<0.01, *** p<0.001).

(B) Gene expression analysis of progerin expression in HGPS MSC following 48 hours of treatments with each of the 11 validated compounds. Data are normalized on DMSO 0.1% treated HGPS MSC. Each chart represents the mean +/- SD of three independent experiments (* p< 0.05, ** p<0.01, *** p<0.001).

Sup Figure 8: Lamin A/C immunostaining of HGPS MSCs following 48 hours of treatments with each of the 11 validated compounds. Scale bar represents 50μm.

Sup Figure 9: Alkaline phosphatase activity of HGPS MSCs following 7 days of differentiation in presence of the each of the 11 validated compounds. Scale bar represents 50μm.

Acknowledgments

The authors thank Pauline Poydenot and Yves Maury for their part in certain experiments, Drs. Gisele Bonne, Alexandre Méjat, Pierre Cau, Walter Habeler and Cecile Martinat for helpful discussions. This work was supported by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), University Evry Val d'Essonne (UEVE), Association Française contre les Myopathies (AFM), and Genopole.

Références bibliographiques

- **Burke B, and Stewart CL** (2006). The laminopathies: the functional architecture of the nucleus and its contribution to disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 7, 369-405.
- **Cao K, Graziotto JJ, Blair CD, Mazzulli JR, Erdos MR, Krainc D, and Collins FS** (2011). Rapamycin reverses cellular phenotypes and enhances mutant protein clearance in Hutchinson-Gilford progeria syndrome cells. *Sci Transl Med* 3, 89ra58.
- **Capell BC, Erdos MR, Madigan JP, Fiordalisi JJ, Varga R, Conneely KN, Gordon LB, Der CJ, Cox AD, and Collins FS** (2005). Inhibiting farnesylation of progerin prevents the characteristic nuclear blebbing of Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 12879-12884.
- **Capell BC, Olive M, Erdos MR, Cao K, Faddah DA, Tavarez UL, Conneely KN, Qu X, San H, Ganesh SK, Chen X, Avallone H, Kolodgie FD, Virmani R, Nabel EG, and Collins FS** (2008). A farnesyltransferase inhibitor prevents both the onset and late

progression of cardiovascular disease in a progeria mouse model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 15902-15907.

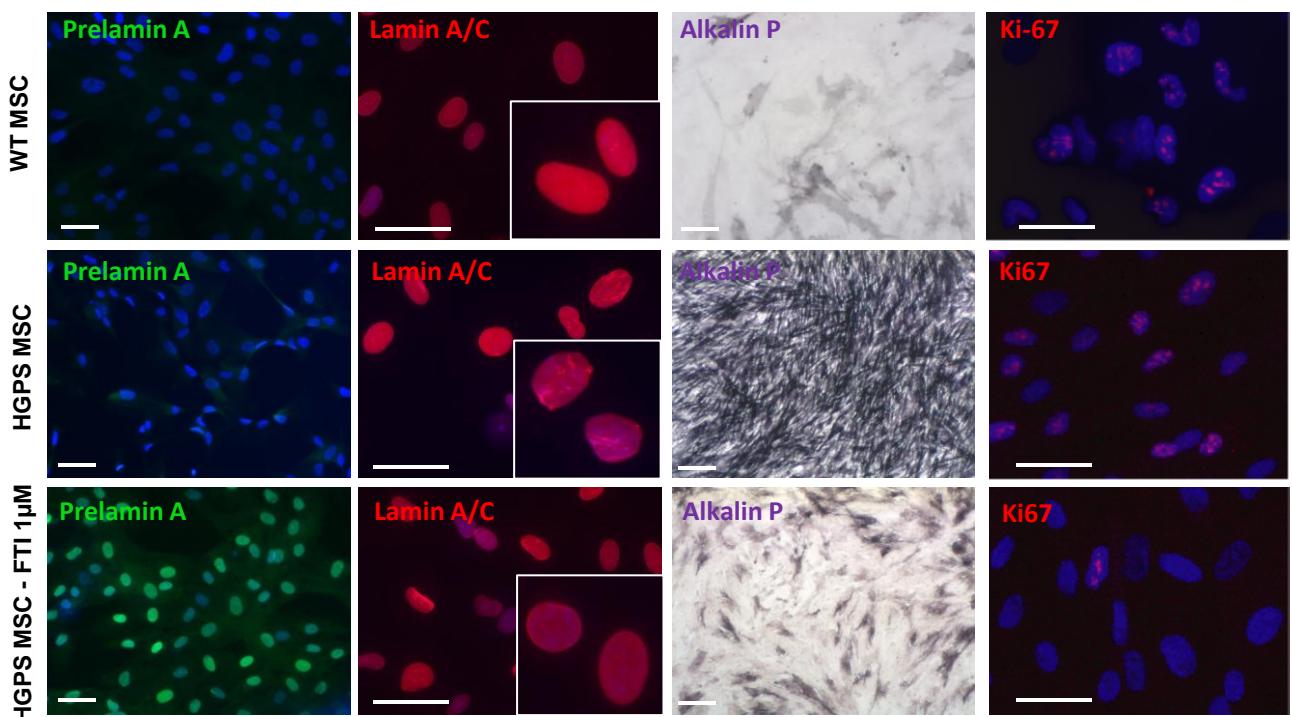
- **De Sandre-Giovannoli A, Bernard R, Cau P, Navarro C, Amiel J, Boccaccio I, Lyonnet S, Stewart CL, Munnich A, Le Merrer M, and Levy N** (2003). Lamin a truncation in Hutchinson-Gilford progeria. *Science* 300, 2055.
- **Eastman RT, Buckner FS, Yokoyama K, Gelb MH, and Van Voorhis WC** (2006). Thematic review series: lipid posttranslational modifications. Fighting parasitic disease by blocking protein farnesylation. *J Lipid Res* 47, 233-240.
- **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, and Collins FS** (2003). Recurrent de novo point mutations in lamin A cause Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Nature* 423, 293-298.
- **Giraud-Triboult K, Rochon-Beaucourt C, Nissan X, Champon B, Aubert S, and Pietu G** (2010). Combined mRNA and microRNA profiling reveals that miR-148a and miR-20b control human mesenchymal stem cell phenotype via EPAS1. *Physiol Genomics* 43, 77-86.
- **Glynn MW, and Glover TW** (2005). Incomplete processing of mutant lamin A in Hutchinson-Gilford progeria leads to nuclear abnormalities, which are reversed by farnesyltransferase inhibition. *Hum Mol Genet* 14, 2959-2969.
- **Gordon LB, Kleinman ME, Miller DT, Neuberg DS, Giobbie-Hurder A, Gerhard-Herman M, Smoot LB, Gordon CM, Cleveland R, Snyder BD, Fligor B, Bishop WR, Statkevich P, Regen A, Sonis A, Riley S, Ploski C, Correia A, Quinn N, Ullrich NJ, Nazarian A, Liang MG, Huh SY, Schwartzman A, and Kieran MW** Clinical trial of a farnesyltransferase inhibitor in children with Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 16666-16671.
- **Gupta MK, and Prabhakar YS** (2008). QSAR study on tetrahydroquinoline analogues as plasmodium protein farnesyltransferase inhibitors: a comparison of rationales of malarial and mammalian enzyme inhibitory activities for selectivity. *Eur J Med Chem* 43, 2751-2767.
- **Lee G, Ramirez CN, Kim H, Zeltner N, Liu B, Radu C, Bhinder B, Kim YJ, Choi IY, Mukherjee-Clavin B, Djaballah H, and Studer L** (2012). Large-scale screening using familial dysautonomia induced pluripotent stem cells identifies compounds that rescue IKBKAP expression. *Nat Biotechnol* 30, 1244-1248.
- **Merideth MA, Gordon LB, Clauss S, Sachdev V, Smith AC, Perry MB, Brewer CC, Zalewski C, Kim HJ, Solomon B, Brooks BP, Gerber LH, Turner ML, Domingo DL, Hart TC, Graf J, Reynolds JC, Gropman A, Yanovski JA, Gerhard-Herman M, Collins FS, Nabel EG, Cannon RO, 3rd, Gahl WA, and Introne WJ** (2008). Phenotype and course of Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *N Engl J Med* 358, 592-604.
- **Nallan L, Bauer KD, Bendale P, Rivas K, Yokoyama K, Horney CP, Pendyala PR, Floyd D, Lombardo LJ, Williams DK, Hamilton A, Sebti S, Windsor WT, Weber PC, Buckner FS, Chakrabarti D, Gelb MH, and Van Voorhis WC** (2005). Protein farnesyltransferase inhibitors exhibit potent antimalarial activity. *J Med Chem* 48, 3704-3713.
- **Navarro CL, Cau P, and Levy N** (2006). Molecular bases of progeroid syndromes. *Hum Mol Genet* 15 Spec No 2, R151-161.
- **Nissan X, Blondel S, Navarro C, Maury Y, Denis C, Girard M, Martinat C, De Sandre-Giovannoli A, Levy N, and 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.

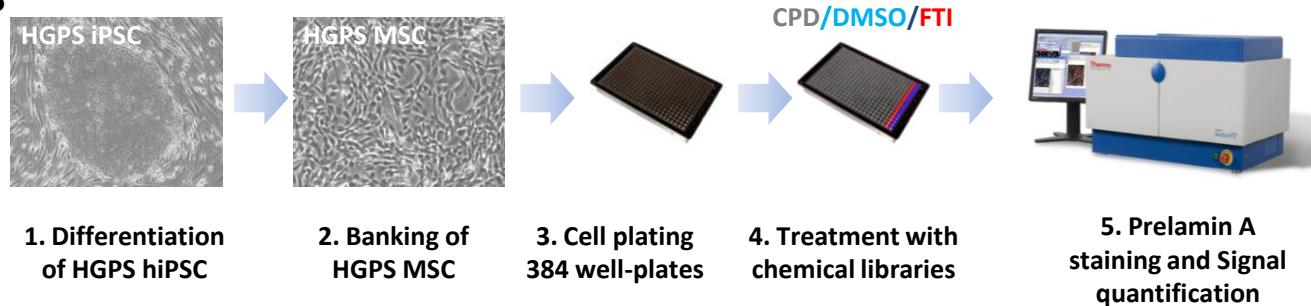
- **Osorio FG, Navarro CL, Cadinanos J, Lopez-Mejia IC, Quiros PM, Bartoli C, Rivera J, Tazi J, Guzman G, Varela I, Depetris D, de Carlos F, Cobo J, Andres V, De Sandre-Giovannoli A, Freije JM, Levy N, and Lopez-Otin C** (2011). Splicing-directed therapy in a new mouse model of human accelerated aging. *Sci Transl Med* 3, 106ra107.
- **Scaffidi P, and Misteli T** (2008). Lamin A-dependent misregulation of adult stem cells associated with accelerated ageing. *Nat Cell Biol* 10, 452-459.
- **Sebti SM, and Der CJ** (2003). Opinion: Searching for the elusive targets of farnesyltransferase inhibitors. *Nat Rev Cancer* 3, 945-951.
- **Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, and Yamanaka S** (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131, 861-872.
- **Van Voorhis WC, Rivas KL, Bendale P, Nallan L, Horney C, Barrett LK, Bauer KD, Smart BP, Ankala S, Hucke O, Verlinde CL, Chakrabarti D, Strickland C, Yokoyama K, Buckner FS, Hamilton AD, Williams DK, Lombardo LJ, Floyd D, and Gelb MH** (2007). Efficacy, pharmacokinetics, and metabolism of tetrahydroquinoline inhibitors of *Plasmodium falciparum* protein farnesyltransferase. *Antimicrob Agents Chemother* 51, 3659-3671.
- **Varela I, Pereira S, Ugalde AP, Navarro CL, Suarez MF, Cau P, Cadinanos J, Osorio FG, Foray N, Cobo J, de Carlos F, Levy N, Freije JM, and Lopez-Otin C** (2008). Combined treatment with statins and aminobisphosphonates extends longevity in a mouse model of human premature aging. *Nat Med* 14, 767-772.
- **Villa-Bellosta R, Rivera-Torres J, Osorio FG, Acin-Perez R, Enriquez JA, Lopez-Otin C, and Andres V** (2013). Defective extracellular pyrophosphate metabolism promotes vascular calcification in a mouse model of hutchinson-gilford progeria syndrome that is ameliorated on pyrophosphate treatment. *Circulation* 127, 2442-2451.
- **Yang SH, Bergo MO, Toth JI, Qiao X, Hu Y, Sandoval S, Meta M, Bendale P, Gelb MH, Young SG, and Fong LG** (2005). Blocking protein farnesyltransferase improves nuclear blebbing in mouse fibroblasts with a targeted Hutchinson-Gilford progeria syndrome mutation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 10291-10296.
- **Yang SH, Chang SY, Andres DA, Spielmann HP, Young SG, and Fong LG** (2013). Assessing the efficacy of protein farnesyltransferase inhibitors in mouse models of progeria. *J Lipid Res* 51, 400-405.
- **Young SG, Yang SH, Davies BS, Jung HJ, and Fong LG** (2013). Targeting protein prenylation in progeria. *Sci Transl Med* 5, 171ps173.

Blondel S et al. Figure 1

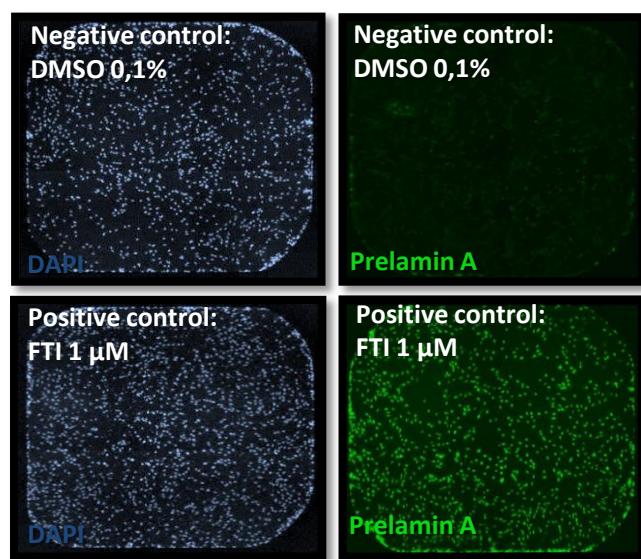
A



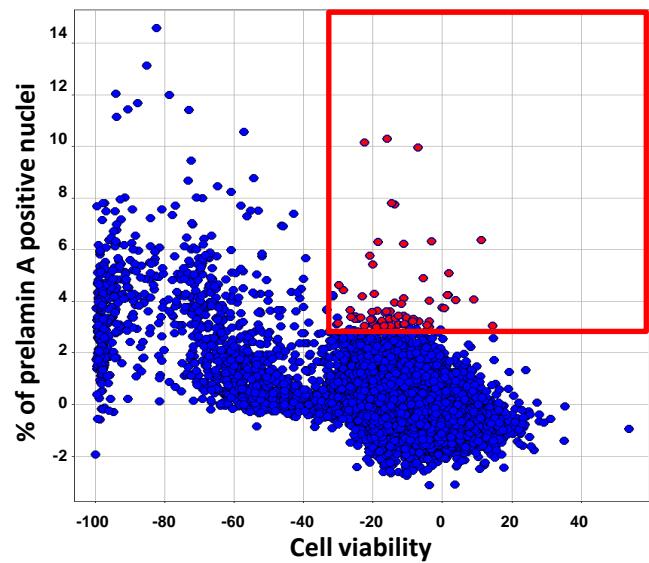
B



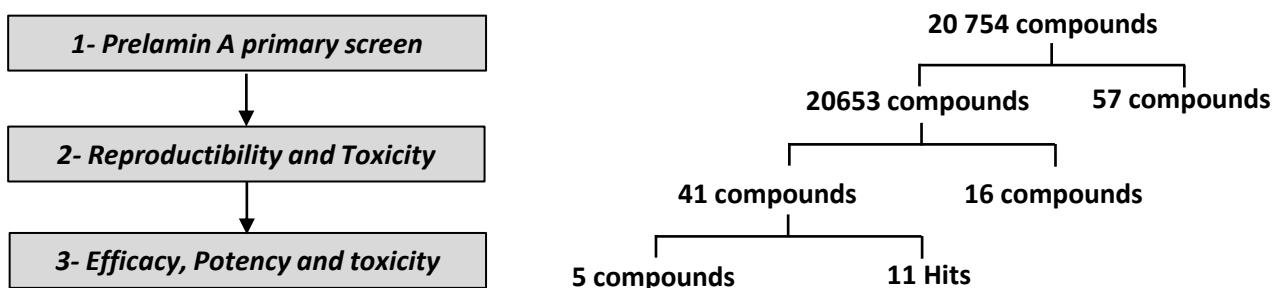
C



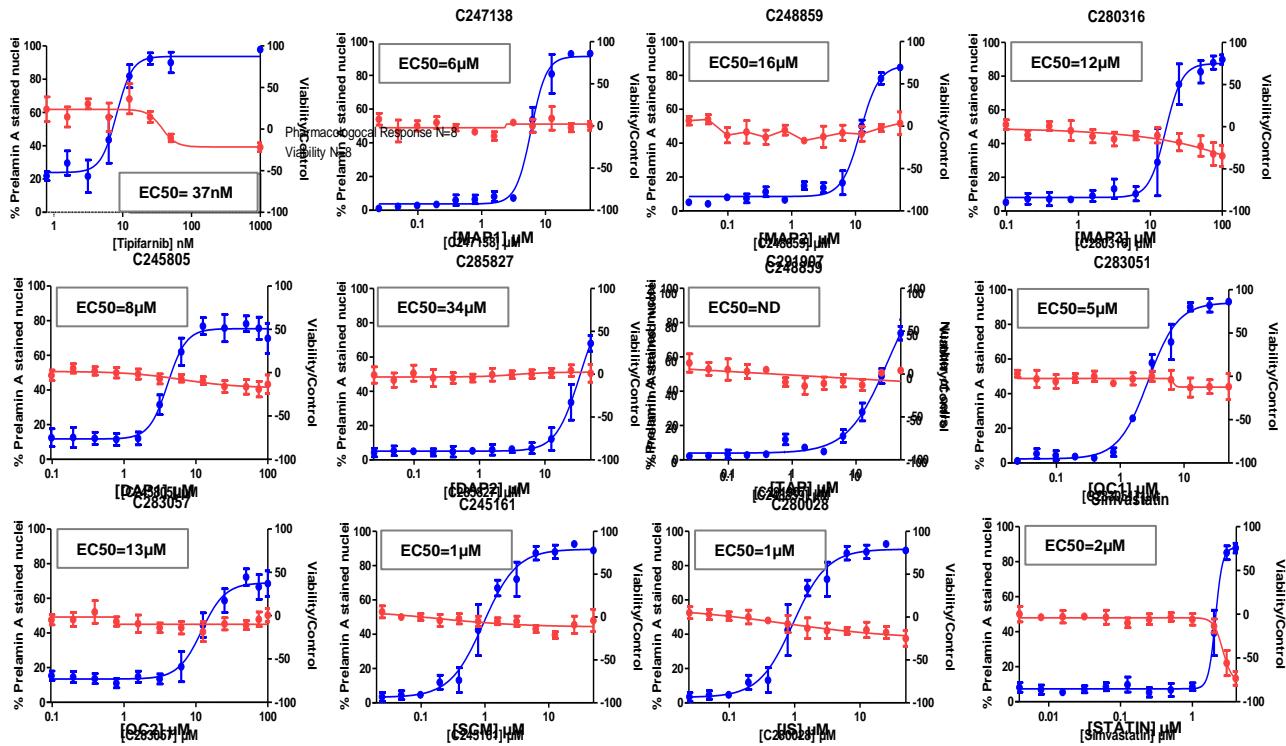
D



A



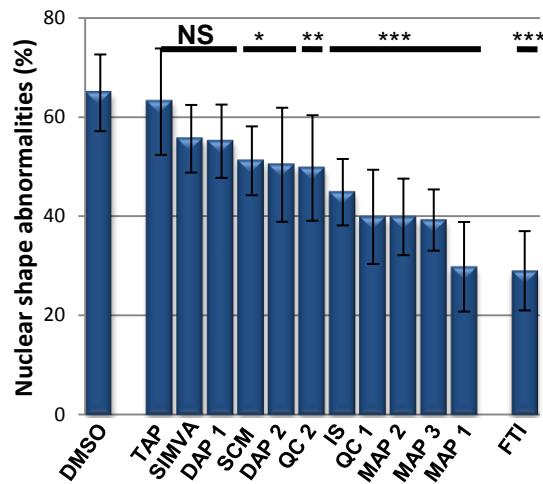
B



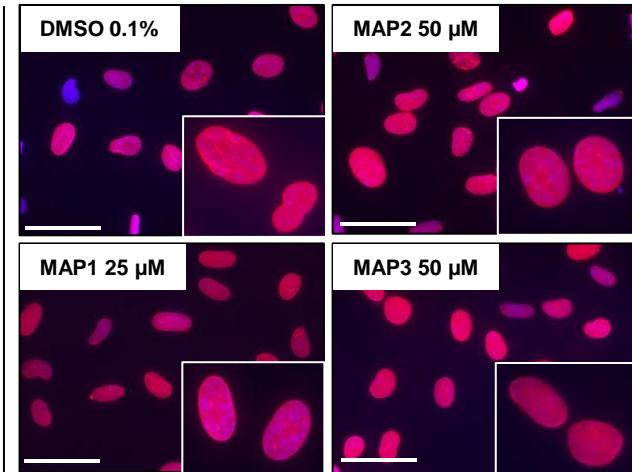
C

Sample Name	Chemical classification	FORMULA	Molecular weight (g/mol)	EC ₅₀ (μM)
QC1	Quinoline carboxamide	C ₂₃ H ₂₂ N ₂ O ₄	390,44	5
QC2	Quinoline carboxamide	C ₂₃ H ₂₃ FN ₂ O ₃	394,45	13
DAP1	Di-aminopyrimidine	C ₃₂ H ₃₂ N ₆ O	516,65	8
DAP2	Di-aminopyrimidine	C ₂₉ H ₃₃ N ₇ O	495,63	34
MAP1	Mono-aminopyrimidine	C ₂₂ H ₂₁ FN ₆	388,45	6
MAP2	Mono-aminopyrimidine	C ₂₃ H ₂₃ N ₅ O	390,47	16
MAP3	Mono-aminopyrimidine	C ₂₀ H ₁₈ N ₆ OS	385,47	12
TAP	Tetra-aminopyrimidine	C ₂₃ H ₂₆ N ₆ O	402,5	ND
IS	Indole surrogate	C ₂₂ H ₂₃ N ₃ O ₂	361,45	1
SCM	Spirochromane	C ₃₀ H ₃₂ N ₂ O ₃	468,60	1
SIMVA	Simvastatin	C ₂₅ H ₃₈ O ₅	418,57	2,1

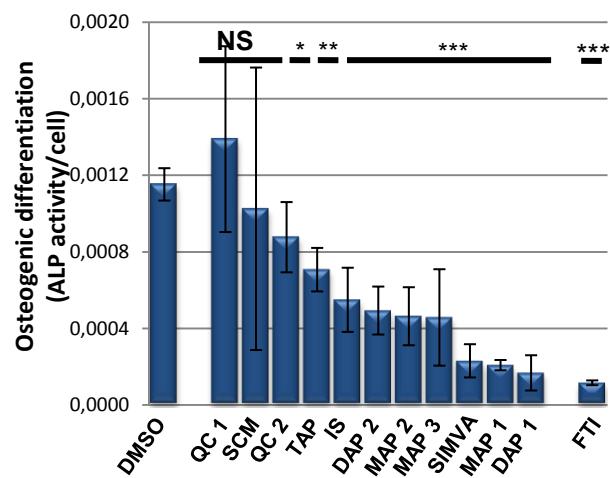
A



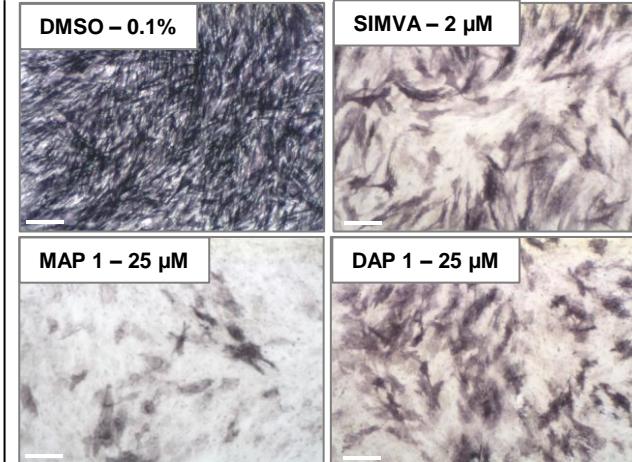
B



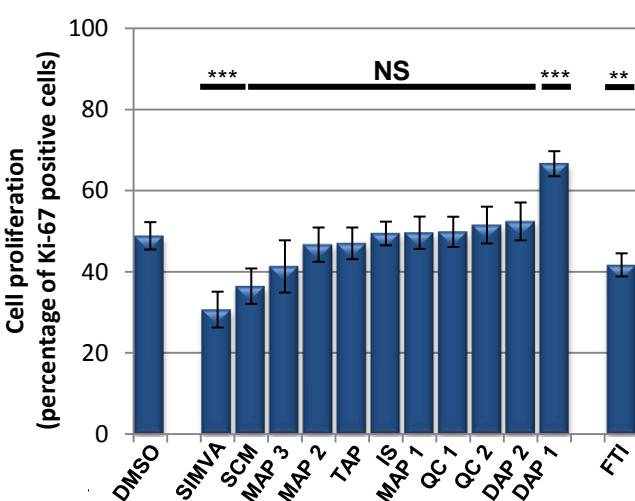
C



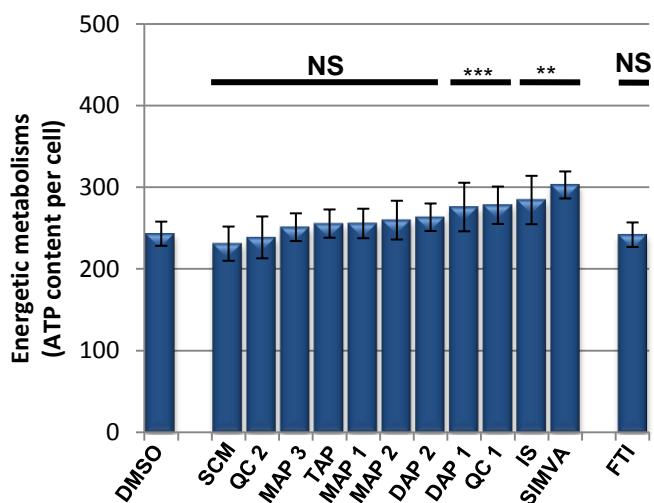
D



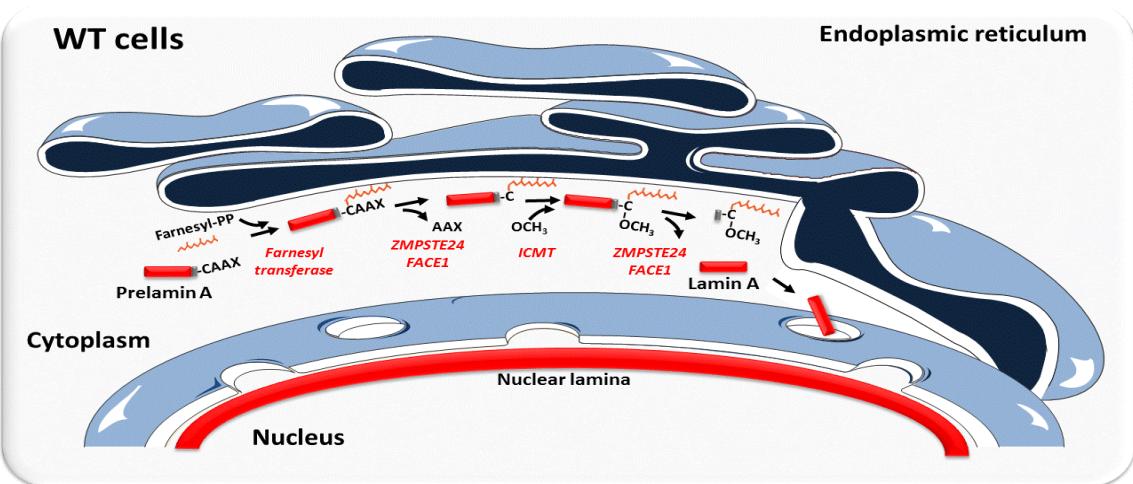
E



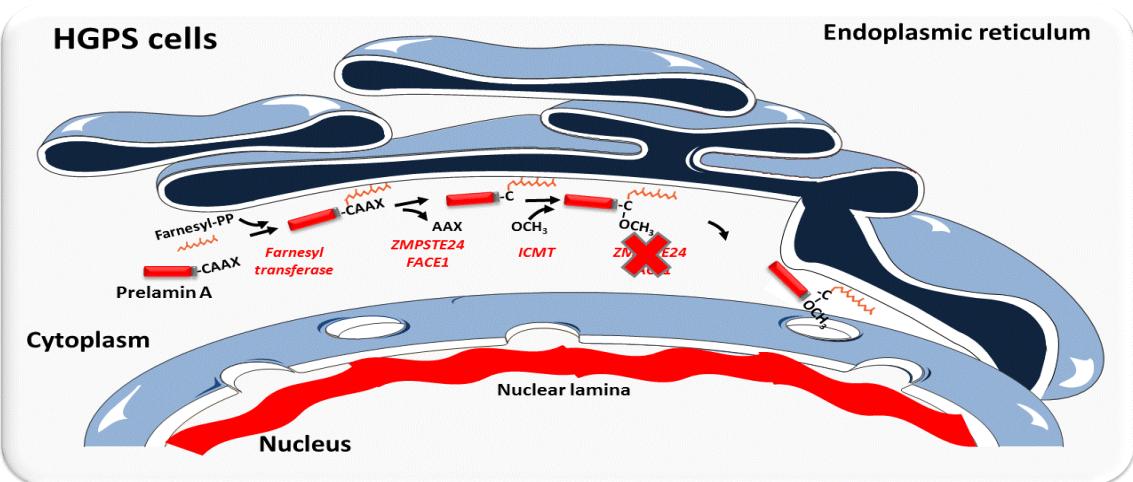
F



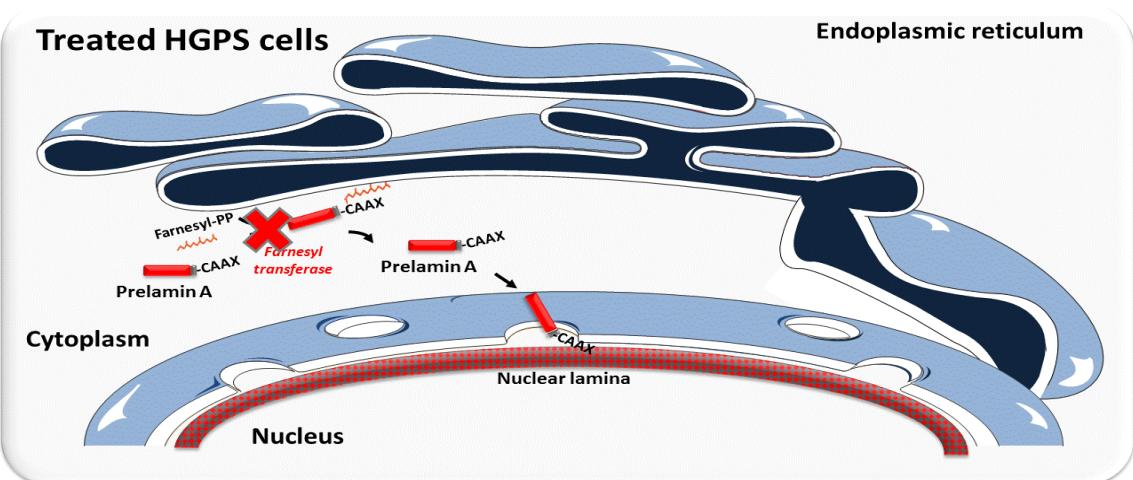
A



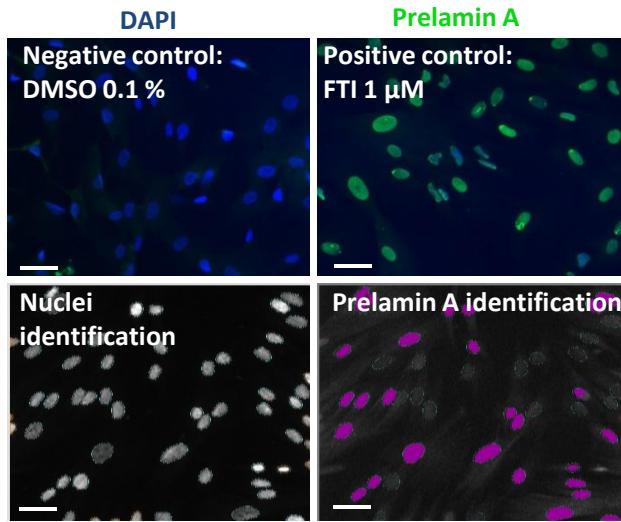
B



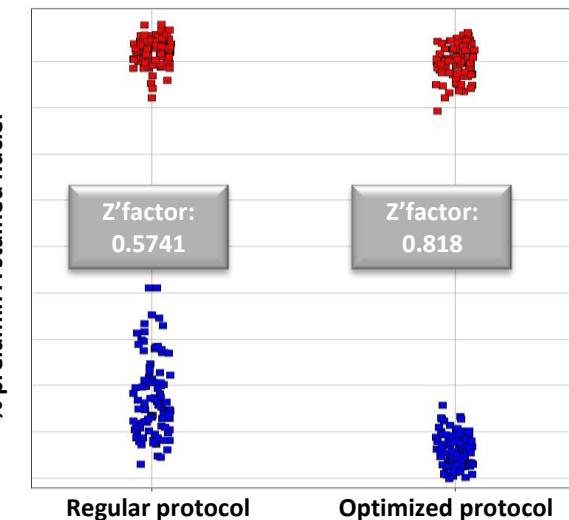
C



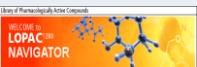
A



B



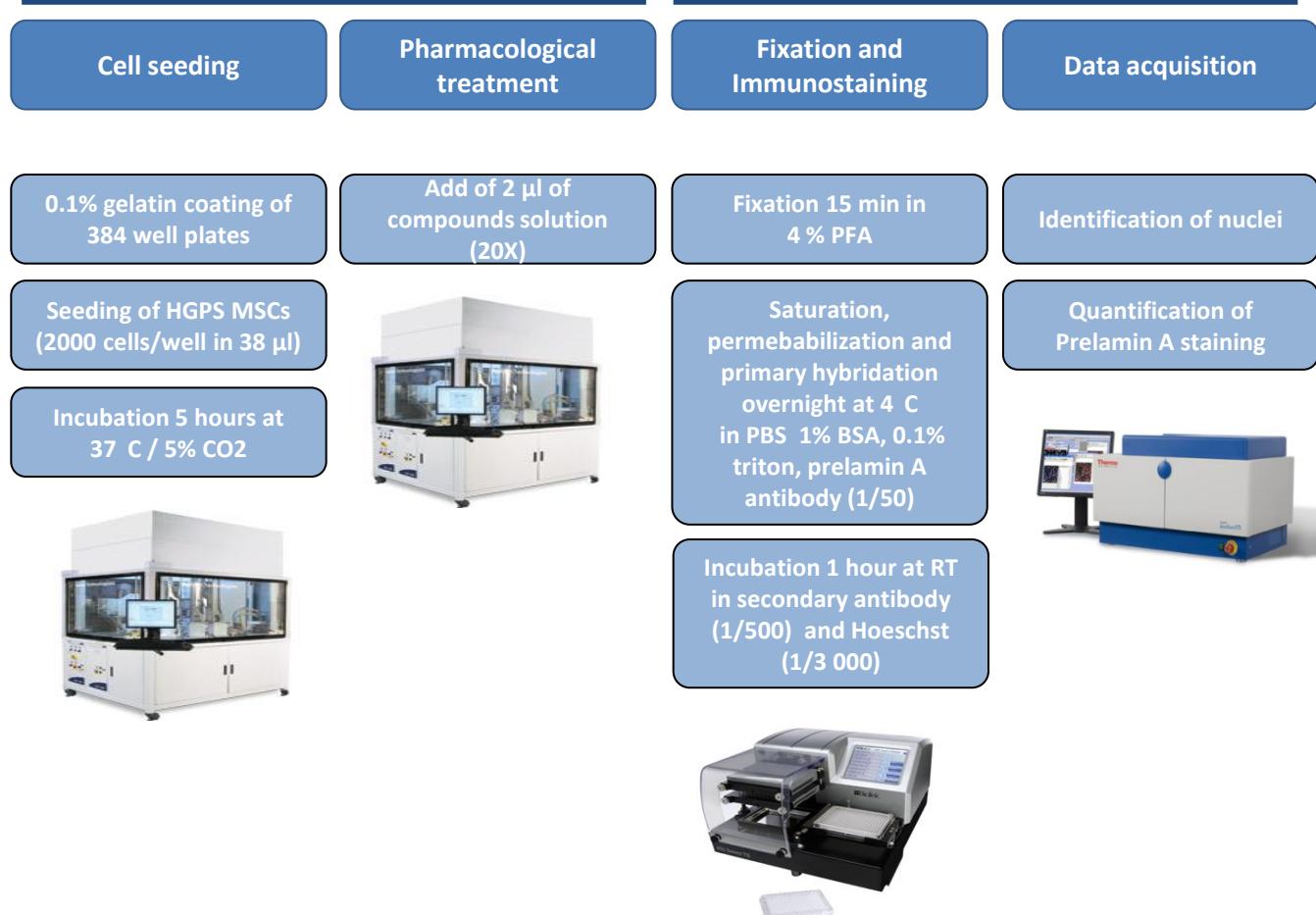
A

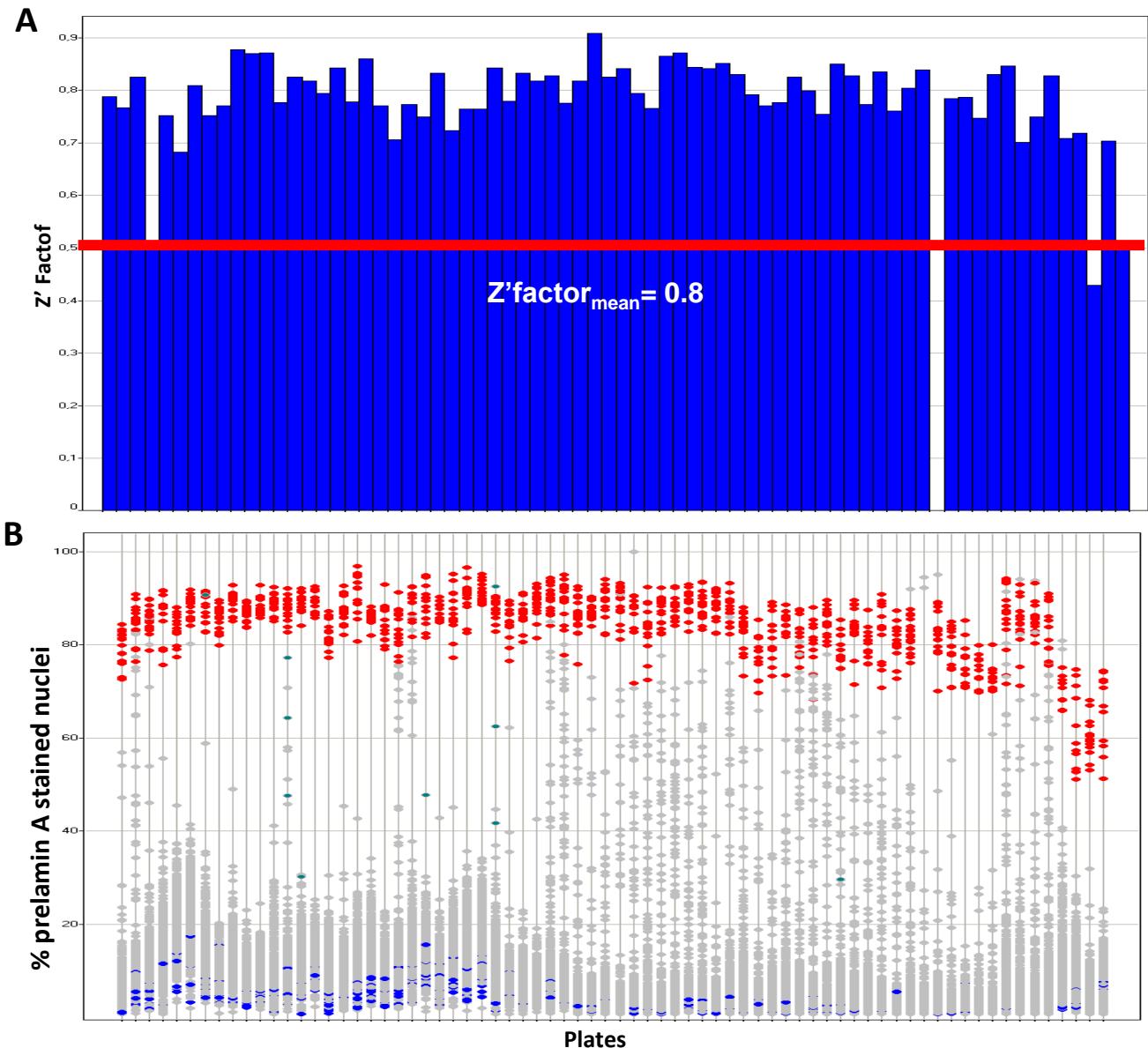
	Nb compounds	Concentration	Chemical diversity
	1200	5 and 0.2 μ M	- FDA approved drugs - Interesting for a drug repositioning approach
	1280	10 and 0.2 μ M	- Pharmacologically active compounds - Use to identify biological pathways
	8640	2-15 μ M	- Synthetic analogues that were obtained during optimization programs against different therapeutic targets (anti-HIV, kinases inhibitor, protein-protein interactions, phosphatase inhibitors...).
	10568	5 μ M	- Small molecules that belong to approximately 30 different chemical families

B

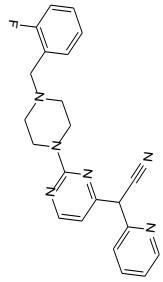
Day 0

Day 2

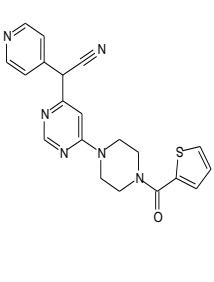




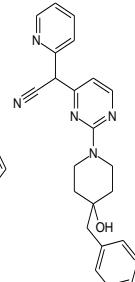
Mono-aminopyrimidine (MAP)



MAP 1

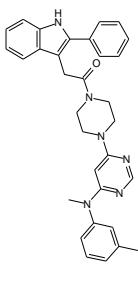


MAP 2

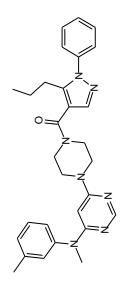


MAP 3

Di-aminopyrimidine (DAP)

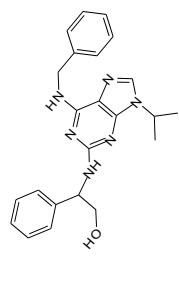


DAP 1



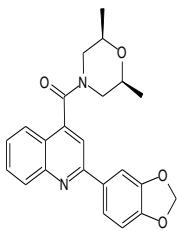
DAP 2

Tetra-aminopyrimidine (TAP)

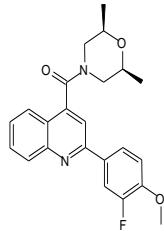


TAP

Quinoline carboxylamide (QC)

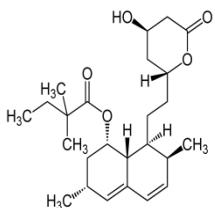


QC 1



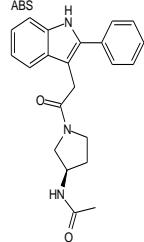
QC 2

Simvastatin (STATIN)



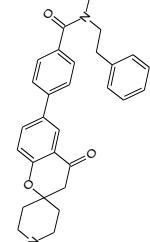
SIMVA

Indole surrogate (IS)

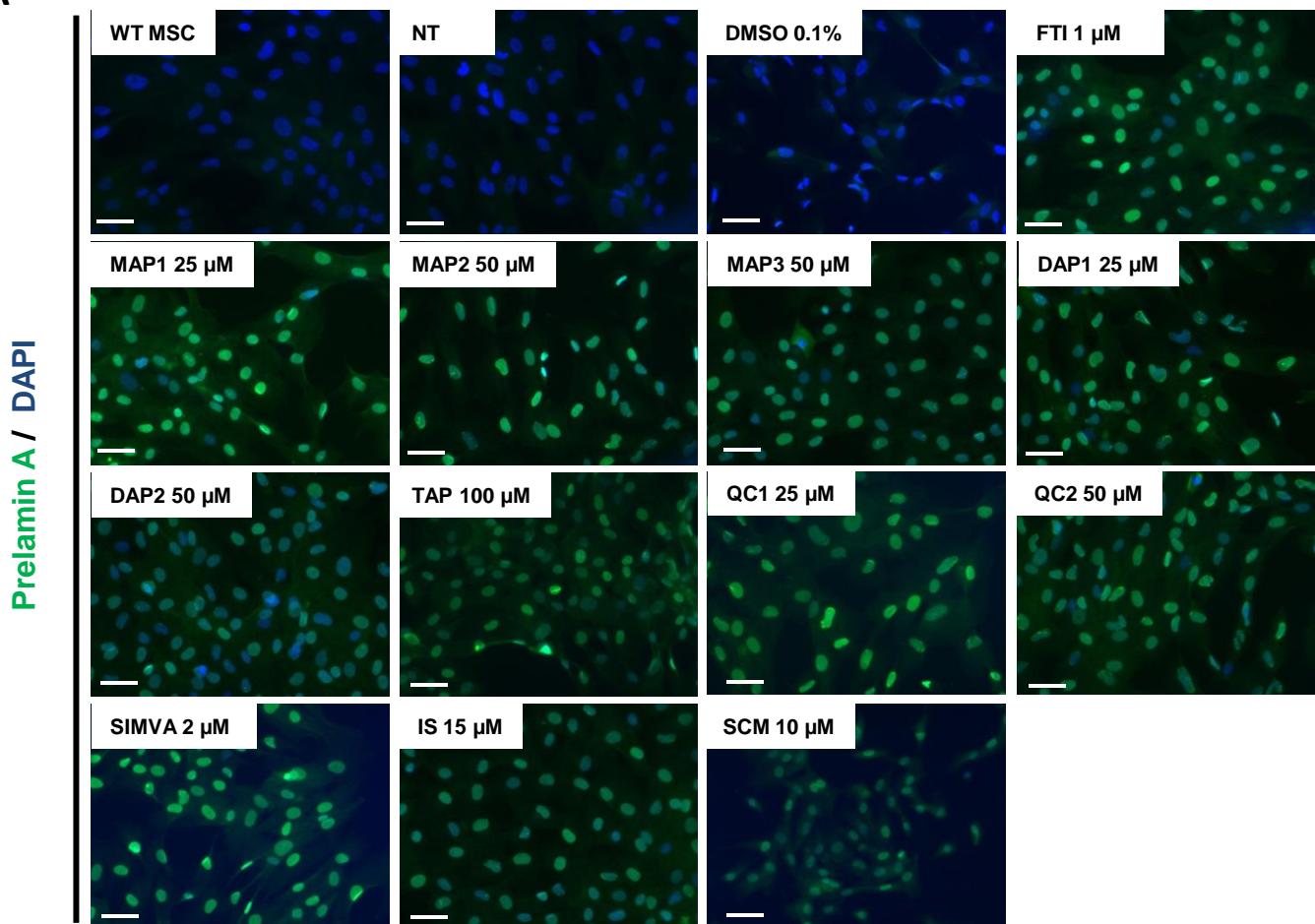
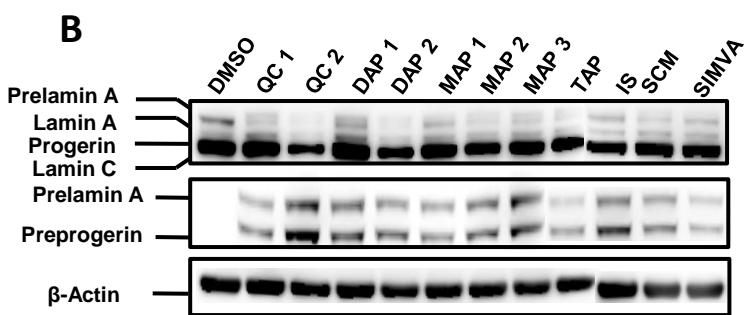


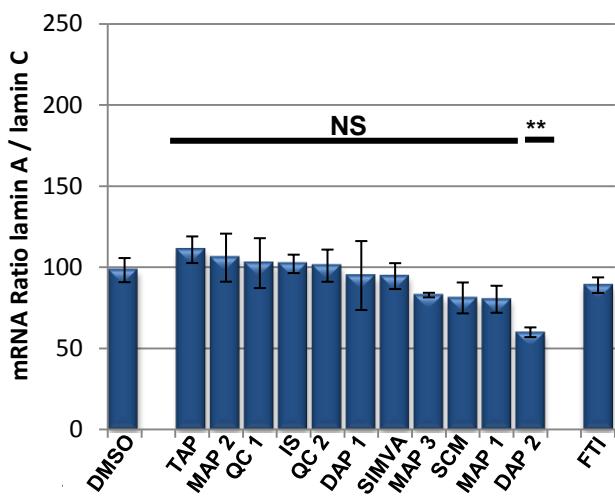
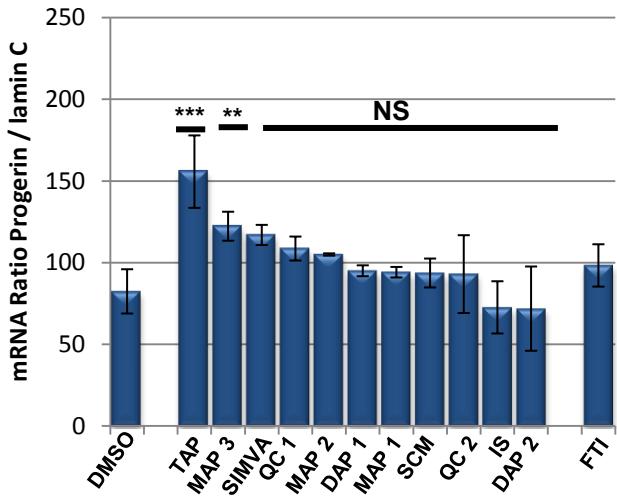
IS

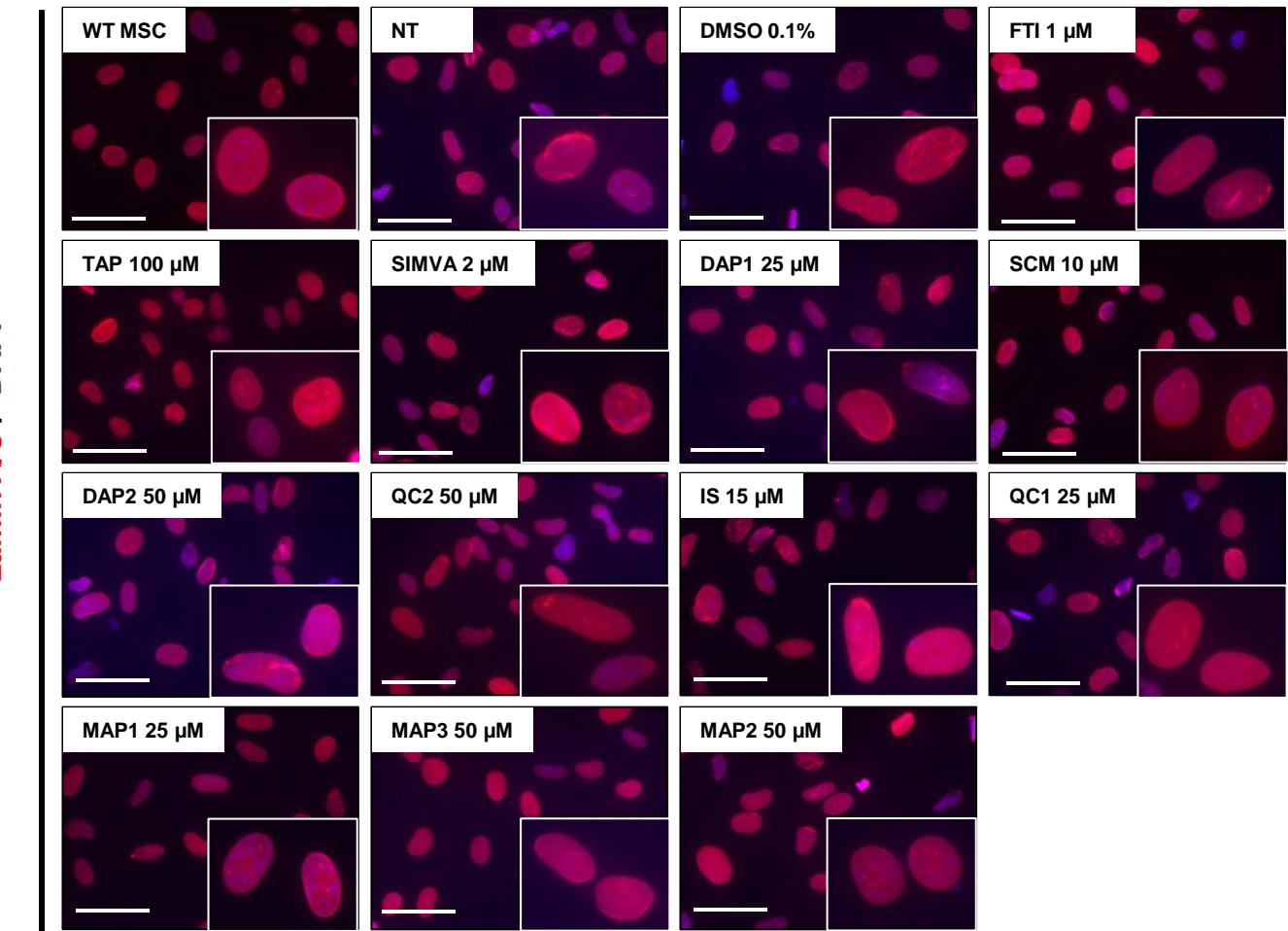
Spirochromane (SCM)



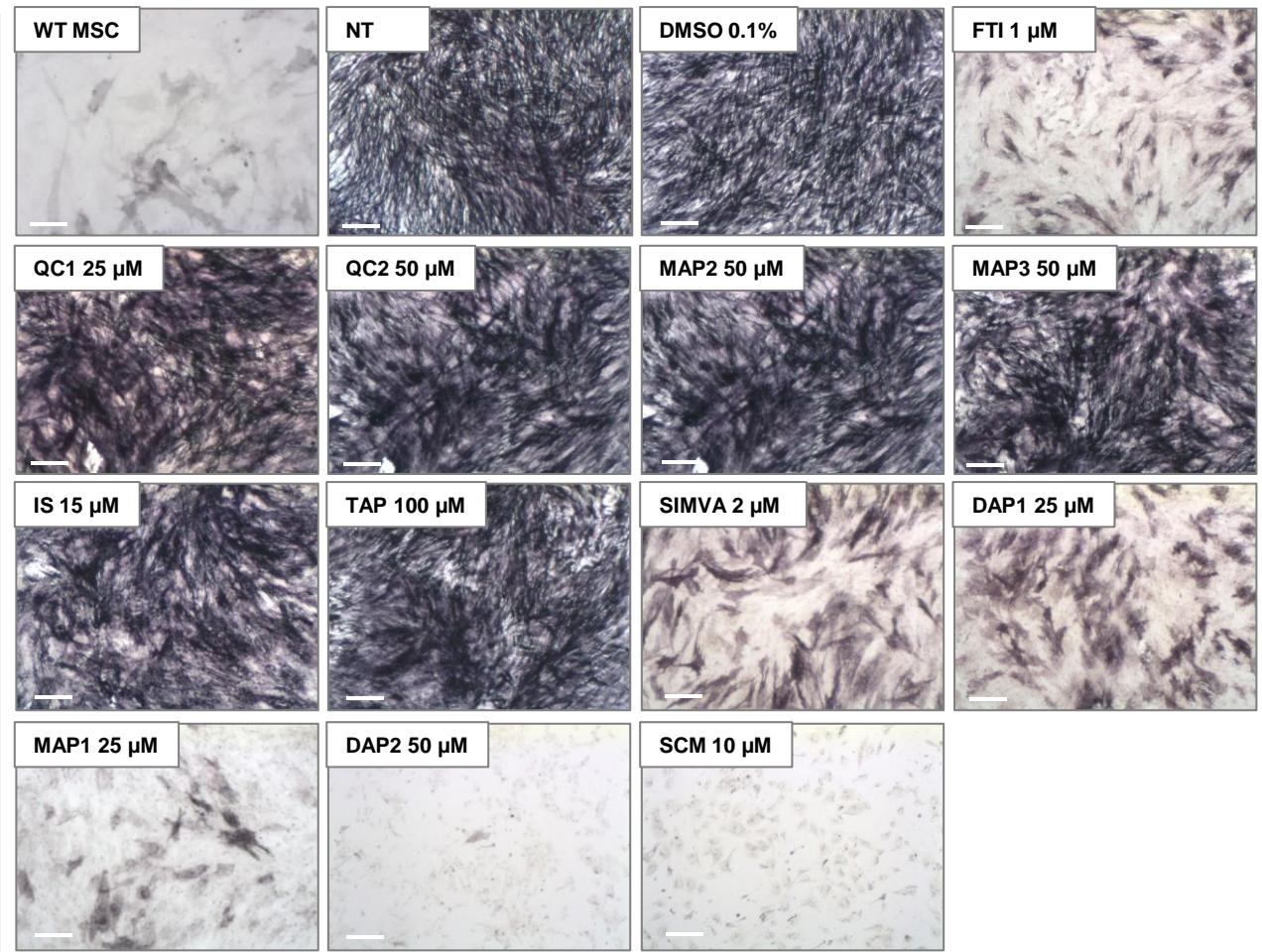
SCM

A**B**

A**B**



ALP activity / DAPI



Discussion et perspectives

De la recherche fondamentale aux applications thérapeutiques

I. La modélisation pathologique de la progéria

I.1 Mise en place du modèle d'iPSCs progéria

I.1.1 Reprogrammation des iPSCs progéria

Dans cette étude, les iPSCs progéria ont été reprogrammées à partir de deux lignées de fibroblastes de patients. La première lignée a été générée en 2010 et la deuxième en janvier 2011. A cette époque, la méthode de reprogrammation de référence utilisée au laboratoire consistait à introduire les facteurs de Yamanaka grâce à des vecteurs rétroviraux (Oct4, Sox2, Klf4 et c-Myc) (Takahashi et al., 2007). Nous avons alors rencontré des difficultés pour reprogrammer les cellules. En effet, les rétrovirus ne peuvent infecter que les cellules en réplication. Or les fibroblastes progéria sont rapidement sénescents et prolifèrent très peu (Park et al., 2001). Afin d'augmenter le rendement de conversion, ces cellules ont été traitées avec du ZoPra à 1 μ M avant et pendant la reprogrammation. Cette alternative a ainsi permis de générer des clones d'iPSCs avec cependant, un rendement très faible. Sachant que la suite de nos travaux a démontré que le traitement au ZoPra ne provoquait pas d'augmentation de la prolifération des MSCs progéria, son rôle dans l'optimisation de la reprogrammation doit emprunter une autre voie qui reste à découvrir. Il serait ainsi informatif de chercher à reprogrammer d'autres lignées de fibroblastes non progéria pour vérifier si la combinaison ZoPra stimule la reprogrammation dans un contexte différent de la progeria. Auquel cas, leur utilisation pourrait être envisagée, au même titre que d'autres petites molécules, pour augmenter le rendement de reprogrammation. Par ailleurs, une approche alternative aurait pu consister à augmenter le nombre de facteurs utilisés pour la reprogrammation en y ajoutant (Lin28 et Nanog). En effet en 2011, l'équipe de Jean-Marc Lemaître a démontré que la combinaison des facteurs décrits par Shinya Yamanaka avec ces deux facteurs pouvait permettre la reprogrammation de fibroblastes âgés probablement par une réactivation de la télomérase (Lapasset et al., 2011).

Les techniques de reprogrammation ayant beaucoup évoluées depuis, nous envisageons de dériver de nouvelles lignées d'iPSCs progéria, à partir des mêmes fibroblastes, mais avec cette fois-ci des techniques de reprogrammation non intégratives.

I.1.2 Crédit d'un modèle d'étude récapitulant la pathologie

La modélisation pathologique *in vitro* est un véritable enjeu pour un grand nombre de maladies, notamment les maladies génétiques. Le principe même repose sur la compréhension des mécanismes physiopathologiques et la recherche de nouvelles pistes thérapeutiques. A ce titre, les cellules souches pluripotentes se positionnent comme un outil à fort potentiel pour ces études de par leur propriété d'autorenouvellement et de pluripotence. Ces capacités garantissent d'une part l'accessibilité à une ressource biologique illimitée permettant de travailler dans des conditions reproductibles et uniformisées, indispensables aux études comparatives. D'autre part, elles ouvrent l'accès à une diversité de types cellulaires jamais étudiés, de par les techniques invasives nécessaires à leur obtention. C'est le cas notamment des cellules neurales que nous avons exploitées dans une partie de cette thèse (Nissan et al., 2012). Jusqu'en 2007, seules les ESCs permettaient de telles approches. Cependant, dans le cas de la progeria, cette technologie n'était pas envisageable du fait de l'absence de diagnostic préimplantatoire pour cette pathologie. Avec l'arrivée de la technologie de reprogrammation, l'obtention d'iPSCs progéria a donc été un élan vers de nouvelles techniques d'étude de la maladie (Liu et al., 2011a; Liu et al., 2011b; Zhang et al., 2011b). Dans la continuité de ces travaux, nous avons généré un modèle d'iPSCs progéria qui nous a permis de réaliser de la modélisation pathologique mais également des études pharmacologiques à large échelle.

I.2 Mécanismes moléculaires impliqués dans la physiopathologie de la progeria: émergence du rôle des microARNs

Ce modèle d'iPSCs nous a permis d'entreprendre des études mécanistiques pour comprendre l'origine de la préservation des fonctions cognitives des patients. Ce travail a mis en évidence l'expression spécifique de mir-9 dans les progéniteurs neuronaux et les neurones expliquant la non expression de lamine A et de progérine dans ces types cellulaires, à l'origine de l'absence de défauts.

I.2.1 Implication des microARNs dans la progéria

Outre le microARN mir-9, il existe d'autres microARNs dérégulés dans la progéria. En 2010, l'équipe de Carlos López-Otín a mis en évidence la surexpression de miR-1 dans le foie, les reins, le tissu musculaire des souris *Zmpste24^{-/-}* ainsi que dans des fibroblastes issus de patients atteints par la progéria (Marino et al., 2010). Une des cibles de miR-1 identifiée dans cette étude est IGF-1. La liaison de ce microARN sur cette hormone peptidique entraîne une diminution de l'expression au niveau de son transcrit et au niveau protéique. L'implication de miR-1 explique ainsi pourquoi IGF-1 est diminué alors que l'hormone de croissance GH, décrite pour stimuler la production d'IGF-1, a été détectée à un haut niveau d'expression dans la circulation des animaux *Zmpste24^{-/-}*. Cette étude apporte également un lien entre l'augmentation des dommages à l'ADN et la surexpression de miR-9, sans toutefois expliquer le mécanisme de causalité (Marino et al., 2010).

De la même manière, la famille miR-29 comprenant miR-29a, miR-29b et miR-29c, a été montrée comme étant surexprimée dans les muscles, le foie et les fibroblastes issus de souris *Zmpste24^{-/-}* (Ugalde et al., 2011). Cette même étude a démontré que leur expression était augmentée avec l'âge des souris et au cours des passages en culture. Une corrélation entre leur surexpression et l'augmentation des cassures double brin de l'ADN a été faite comme avec miR-1. MiR-29 agirait, quant à lui, dans la signalisation cellulaire impliquant Ppm1d/Wip1 phosphatase et le suppresseur de tumeur p53, qui sont activés dans le vieillissement physiologique et pendant la réponse aux dommages chroniques de l'ADN (Marino et al., 2010).

Ces deux exemples apportent la preuve que miR-9 n'est pas le seul microARN impliqué dans la physiopathologie de la progéria, mais est un acteur parmi plusieurs autres modulateurs. La variété de défauts associés à la progéria révèle la complexité de la maladie et explique pourquoi il est si difficile de trouver un traitement pour guérir cette maladie orpheline.

I.2.2 MicroARNs et spécificité tissulaire

Alors qu'un grand nombre de microARNs sont exprimés de manière ubiquitaire, certains sont spécifiquement exprimés dans un seul et unique type cellulaire ou dans un processus biologique ciblé. C'est le cas de miR-9 dont le rôle dans la biologie des cellules neurales est abondamment décrit (Ambasudhan et al., 2011; De Pietri Tonelli et al., 2008; Delaloy et al.,

2010; Leucht et al., 2008; Yoo et al., 2009; Zhao et al., 2009). Nous avons également pu mesurer cette spécificité tissulaire dans les dérivés de cellules iPSCs, en montrant que miR-9 n'était exprimé que dans les cellules du lignage neural (Nissan et al., 2012). Quelques mois avant la publication de nos travaux l'équipe de Loren Fong a fait la même découverte, mais dans un modèle de souris, démontrant que les neurones n'exprimaient pas la lamine A et que miR-9 régulait la production de lamine A et de progérine (Jung et al., 2012). Cette étude a confirmé en tous points nos résultats et a conforté le rôle de ce microARN dans la régulation de ce gène. D'autres exemples présentent miR-1, miR-133 et miR-206 comme des microARNs spécifiques du muscle, permettant le développement et le fonctionnement du muscle cardiaque et des muscles squelettiques. Ils ont également été impliqués dans des hypertrophies, dystrophies musculaires ou des dysfonctionnements de la conduction (Townley-Tilson et al., 2010). En multipliant les types cellulaires étudiés pour chaque microARN, la caractérisation de leur rôle et de leur fonction serait d'autant plus détaillée et permettrait d'anticiper leur action délétère ou bénéfique en cas de surexpression ou d'inhibition. Les modèles iPSCs sont, pour cela, un outil de choix, de par leur capacité à se différencier en différents progéniteurs ou types cellulaires matures. Les caractérisations au stade de progéniteurs permettraient de renseigner si tel ou tel microARN est spécifique d'un lignage en particulier ou est impliqué dans les phénomènes d'organogénèse ou de différenciation. Parallèlement, des études au stade mature apporteraient des informations principalement sur le rôle des microARNs dans la fonctionnalité des cellules en question. Ainsi, la prédiction de l'effet systémique de l'introduction d'un microARN ou d'un anti-microARN pourrait être envisagée de manière précise.

I.2.3 mir-9 un traitement de la progéria ?

La découverte du rôle protecteur de miR-9 dans les neurones amène à la question d'une potentielle utilisation de ce microARN comme traitement de la progéria. L'utilisation de microARNs ou d'anti-microARNs est déjà une réalité clinique dans certaines pathologies et notamment dans des indications de pathologies cancéreuses ou infectieuses (Kasinski and Slack, 2011). Récemment, Sicard et al. ont montré que la diminution d'expression de miR-21, exprimé dans les phases précoces d'adénocarcinome pancréatique, diminuait la prolifération cellulaire et induisait l'apoptose des cellules cancéreuses aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* sur des modèles murins d'adénocarcinome pancréatique sévère (Sicard et al., 2013). De même, différentes études ont montré que l'inhibition de miR-122, un microARN essentiel à

l'accumulation du virus de l'hépatite C dans les cellules hépatiques, entraînait une suppression de la virémie durable chez le primate (Lanford et al., 2010). Une étude de phases IIa, publiée cette année, a démontré chez 36 patients infectés par le virus de l'hépatite C, traités par un miravirsen ciblant miR-122 pendant vingt-neuf jours, à raison de cinq injections par semaine, une disparition complète de leur charge virale (Janssen et al., 2013). Aujourd'hui, la question de la technique de délivrance des microARNs reste entière même si les lipides cationiques ou les nanoparticules magnétiques semblent être non toxiques et efficaces pour libérer les microARNs dans les cellules ciblées (Hsu et al., 2013; Schade et al., 2013). La progéria étant une maladie pleiotropique, l'utilisation des microARNs à des fins thérapeutiques nécessiterait une introduction systémique dans l'organisme. Or miR-9 a de nombreuses autres cibles que la lamine A dans les cellules. Une analyse *in silico* (TargetScan) en dénombre 1237. Dans la littérature, miR-9 a été identifié comme étant un microARN impliqué dans de nombreux cancers tels que des leucémies, le cancer du colon ou encore le cancer du sein (Cekaite et al., 2012; Chen et al., 2013; Selcuklu et al., 2012). En outre, miR-9 régulerait l'expression de gènes dont la dérégulation peut également être à l'origine de dysfonctionnements tels que PPAR δ (Coolen et al., 2012; Thulin et al., 2013), CAMTA1 (Schraivogel et al., 2011) ou encore PDGFR- β (Zhang et al., 2011a). Surexprimer miR-9 chez les patients atteints par la progéria risquerait donc d'engendrer des effets inattendus voir encore plus délétères que la maladie elle-même. Ainsi, tant que les technologies ne permettront pas de contrôler les effets non ciblés de miR-9, selon nous, sa surexpression ne semble pas être une piste de traitement de la progéria. En conséquence, la suite de nos recherches s'est focalisée sur d'autres approches pour tenter d'identifier de nouvelles solutions thérapeutiques.

I.3 Mise en place d'un modèle pharmacologique de la progéria

I.3.1 Choix des MSCs comme modèle d'étude

Après avoir montré que les iPSCs progéria pouvaient être utilisé pour modéliser la pathologie, nous nous sommes intéressés à la valence pharmacologique de modèle. La preuve de concept a été réalisée en évaluant l'efficacité des petites molécules sur différents phénotypes pathologiques de la progéria. La première étape a consisté à choisir un type cellulaire, accessible avec les protocoles de différenciation à notre disposition et relevant car affecté

dans ce syndrome. Notre choix s'est ainsi orienté vers les progéniteurs du lignage mésenchymateux capables de se différencier en ostéoblastes, chondrocytes, adipocytes ou encore en cellules musculaires vasculaires lisses, cellules les plus sévèrement touchées dans la progeria. Le fait de modéliser la pathologie dans des cellules précurseurs a cependant restreint nos possibilités d'analyse. En effet, un des principaux défauts communément observé dans la progeria est une perte des capacités prolifératives. Or ces cellules étant très prolifératives, cette anomalie n'a pu être que très faiblement mise en évidence. De même, il n'est pas apparu de dysfonctionnement du métabolisme énergétique des MSCs alors que cela avait été souligné par Goldstein et al. et Viteri et al. (Goldstein et al., 1982; Viteri et al., 2010). Au stade où elles ont été utilisées, les cellules n'étaient pas entrées en sénescence, expliquant cette absence d'aberrations.

I.3.2 Utilisation de ce modèle comme plateforme pharmacologique pour l'étude de combinaison de molécules

Toutefois, les MSCs progeria présentent d'autres atteintes associées à la progeria qui ont permis de créer une plateforme pharmacologique pour tester l'efficacité de petites molécules. Ainsi, alors que nos travaux ont montré que tous les composés testés avaient un impact bénéfique sur l'architecture nucléaire, un certain nombre de différences mécanistiques n'ont pu être détectées. Ils ont notamment présenté des actions complémentaires, alors que l'un diminue la progérine, l'autre ralentit la différentiation vers le lignage ostéogénique et le dernier stimule le métabolisme énergétique. Cette étude comparative ouvre la perspective de tester l'efficacité des composés associés les uns aux autres. Plusieurs combinaisons pourraient être investiguées avec un objectif double. Tout d'abord, ce travail permettrait d'étudier l'éventuel effet synergique de telles associations, chaque molécule apportant son mécanisme d'action et ses effets thérapeutiques propres. D'autre part, il serait possible d'évaluer l'effet de la combinaison avec une diminution des concentrations de chaque molécule. En effet, ces trois traitements diminuent indépendamment, avec plus ou moins de puissance, la prolifération cellulaire. Abaisser les concentrations pourrait donc diminuer cet effet délétère sans affecter les actions bénéfiques. Cette étude, jamais réalisée sur les modèles cellulaires ou animaux de la progeria, apporterait un argument pour justifier ou pas de l'utilisation d'une trithérapie pour traiter les patients atteints par la progeria, combinaison déjà testée cliniquement chez les patients (NCT00916747). Ce modèle d'étude pourrait également être utilisé pour explorer le potentiel thérapeutique de l'association d'une petite molécule et d'un

oligonucléotide morpholino (Osorio et al., 2011), les petites molécules apportant une action symptomatique alors que l’oligonucléotide morpholino aurait une action sur la cause même de la pathologie.

Par ailleurs, le potentiel de ce concept de plateforme pourrait être étendu à d’autres défauts de la progéria afin de compléter les connaissances mécanistiques et fonctionnelles de chaque molécule testée. Dans la littérature progéria, seuls quelques paramètres sont systématiquement étudiés : l’organisation de l’enveloppe nucléaire, la production de progérine et la maturation de la prélamine A. Afin d’uniformiser les études pharmacologiques sur cette pathologie et de pouvoir ainsi comparer les traitements entre eux, la création de recommandations techniques décrivant un ensemble de paramètres à étudier apporterait une standardisation inter-étude qui bénéficierait à la communauté de chercheurs travaillant sur cette pathologie.

I.3.3 Extension du principe à d’autres laminopathies

La connaissance du fond génétique des cellules de départ ouvre la possibilité d’étendre les travaux menés sur la progéria à d’autres syndromes progéroïdes causés par d’autres mutations du même gène. Ces études permettraient de comparer les mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans les différentes pathologies et d’anticiper la possibilité d’étendre les traitements proposés aux patients porteurs de la mutation c.1824C>T aux patients porteurs des autres mutations.

II. Le criblage à haut contenu, et ensuite ?

Le modèle d’iPSCs progéria ayant montré sa valence pharmacologique avec l’étude comparative des molécules proposées en cliniques, nous avons envisagé son extension vers des études pharmacologiques à large échelle. La dernière étape de ce travail de thèse s’est attelée à développer et réaliser un test de criblage à haut débit. Parmi les tests les plus pertinents développés au cours de la première partie de cette thèse, notre choix s’est orienté vers la détection de l’état de maturation de la prélamine A. Le test que nous avons choisi repose sur le fait que lorsque la prélamine A non maturée rejoint le noyau, le phénotype pathologique se trouve en partie restauré (Capell et al., 2005; Capell et al., 2008; Glynn and Glover, 2005; Varela et al., 2008; Young et al., 2013). Fort de cette littérature abondante et de

nos résultats, nous avons entrepris de développer le premier test de criblage à haut contenu sur ce paramètre.

II.1 Le choix de la chimiothèque

Le choix de la chimiothèque est toujours délicat dans un criblage. Il conditionne une stratégie de développement pharmaceutique dans son ensemble. Lorsque le choix s'oriente vers une chimiothèque constituée de principes actifs possédant une AMM (Autorisation de Mise sur le Marché), le repositionnement de molécules est envisagé. Si le hit est identifié dans cette chimiothèque, le développement est beaucoup plus court du fait de la partie sécurité et ADME qui n'a pas besoin d'être reproduite. L'unique objectif est alors de prouver l'efficacité de la molécule dans une nouvelle indication. Ainsi, les coûts de développement sont amoindris, et la molécule arrivera plus rapidement sur le marché (Muthyala et al., 2011). Une deuxième possibilité est d'utiliser des librairies orientées qui ont un intérêt pour comprendre les mécanismes moléculaires ou cellulaires impliqués dans une pathologie ou ne cibler qu'un type de molécule donné. Également, le criblage peut se faire au hasard, avec des chimiothèques diverses dont les mécanismes d'action ne sont pas connus ouvrant les portes à de réelles innovations.

Dans le cadre de ce criblage, la stratégie a été de combiner l'ensemble des approches pour ne manquer aucun candidat éventuel et élargir le champ d'investigation. L'intérêt d'avoir associé plusieurs chimiothèques est l'accessibilité à une grande variété moléculaire. En effet, les collections Curie et ChemX ont deux origines différentes. Alors que la première regroupe des inhibiteurs de kinases, inhibiteurs de phosphatases ou d'anti-HIV, la deuxième est formatée autour d'une trentaine de familles chimiques ciblant des kinases, des peptidominétiques ou encore des petites protéines G. En choisissant la banque Lopac, constituée de molécules ciblant des voies de signalisation connues, l'objectif était de rechercher de nouveaux mécanismes d'action et d'obtenir des informations rapides sur les cibles des hits isolés, facilitant leur développement. Dans le même temps, la collection Prestwick a apporté la possibilité de repositionner des médicaments, accélérant le temps de développement, temps non négligeable pour les patients.

Parmi les onze hits qui ont été identifiés, neuf ont été isolés de la chimiothèque ChemX, un de la librairie Curie et un autre de la collection Prestwick. De manière intéressante, le hit provenant de la Prestwick a été la simvastatine. Les statines font déjà partie des molécules

proposées aux patients atteints par la progéria (Varela et al., 2008) (NCT00731016), ce qui a renforcé la pertinence de notre test. D'autre part, le hit Curie, s'est révélé inefficace sur les tests phénotypiques secondaires et n'a, de fait, pas été inclus dans les perspectives de développement. Cependant, les résultats obtenus avec ce composé ont indiqué que le fait de bloquer la maturation de la prélamine A n'est pas nécessairement associé à une amélioration des défauts de la pathologie. Enfin, les hits ChemX ont présenté une efficacité variable d'une molécule à l'autre sur les tests secondaires. Néanmoins, une famille chimique, celle des mono-aminopyrimidines (MAPs) a été identifiée comme la plus efficace apportant ainsi de nouvelles pistes thérapeutiques à explorer dans la progéria.

II.2 Recherche du mécanisme d'action des molécules nouvellement identifiées

II.2.1 Limites et avantages du criblage phénotypiques

Lors de la sélection du test de criblage, le choix s'est orienté vers un criblage phénotypique plutôt que vers un criblage basé sur la cible en raison d'une correspondance phénotypique entre la maturation de la prélamine A et le bénéfice thérapeutique observé par ailleurs. Cependant, deux limitations sont couramment reprochées aux tests de ce type. Tout d'abord, le nombre de paramètres à analyser étant très important, le débit est souvent moins élevé que dans des approches basées sur la cible qui ne se concentrent uniquement sur un paramètre (Swinney and Anthony, 2011). Dans le cas du développement de notre test de criblage, le nombre d'étapes de la procédure et le nombre de variables analysées ont, pour cela, été minimalisés. La deuxième limitation réside dans l'ignorance du mécanisme d'action des hits isolés (Xia and Wong, 2012). Il est donc nécessaire de mener des études mécanistiques post-criblage pour caractériser les effets pharmacologiques et éventuellement les effets inattendus des composés. Ainsi, l'anticipation d'effet délétère pourra être permise par cette connaissance. En outre, en identifiant le mécanisme d'action, et donc la cible, cela aidera à optimiser chimiquement la molécule. Les forces d'interactions chimiques entre un ligand et sa cible se calculent et se prédisent, aidant les chimistes à designer une molécule qui sera plus efficace (Bello et al., 2013).

II.2.2 Les hypothèses mécanistiques des molécules identifiées

Dans le cas de notre criblage, la cible des hits mis en évidence n'est pas connue. Le test de détection mis en place permet de visualiser la localisation subcellulaire de la prélamine A. Si cette prélamine A est nucléaire, cela signifie qu'elle n'a pas terminé sa maturation. Les modulateurs de la maturation de la prélamine A recherchés peuvent agir, *à priori*, à plusieurs niveaux. Nous émettons l'hypothèse que les hits identifiés peuvent soit :

- inhiber le processus de farnésylation. Pour cela, une analyse supplémentaire serait nécessaire pour déterminer si cette inhibition est directe ou indirecte et quelle enzyme, impliquée dans la génération des groupements farnésyls, est inhibée. Si l'enzyme ciblée n'est ni l'HMG Co-A réductase, ni la farnésylpyrophosphate synthase, ni la farnésyltransférase, alors cet inhibiteur inhibe certes la farnésylation mais emprunte un chemin différent pour y parvenir, ce qui peut être intéressant à investiguer.
- dégrader une partie du groupement farnésyl. Ainsi, la partie restante ne serait pas suffisamment longue pour s'ancrer dans la membrane interne de l'enveloppe nucléaire, libérant une prélamine A *quasi* mature.
- être des ligands du groupement farnésyl, masquant la chaîne hydrophobe ce qui empêcherait la prélamine A d'être liée à la membrane interne de l'enveloppe nucléaire.

II.2.3 Perspectives de recherche pour la compréhension des mécanismes d'action des molécules identifiées

Afin d'identifier l'état farnésylé ou géranylgeranylé de la prélamine A après traitement avec les hits, il est envisagé de réaliser des analyses biochimiques par spectrométrie de masse, à l'image de ce qui a été fait dans l'étude démontrant le mode d'action du ZoPra (Varela et al., 2008). En parallèle, la transfection de MSCs progéria avec un plasmide codant pour le domaine CaaX de Ras, couplé à la GFP, est planifié après traitement avec les hits. La petite protéine G Ras étant également farnésylée, le fait de traiter les cellules transfectées avec ce plasmide renseignera sur la capacité des hits à inhiber la farnésylation. Si c'est le cas, au lieu que Ras soit retenue à la membrane cytoplasmique par le groupement farnésyl, elle sera libérée dans le cytoplasme des cellules (Sane et al., 2010). Ainsi, en suivant la localisation de la GFP après traitement avec chacun de nos hits, nous serons en mesure de savoir si les composés agissent sur ce processus de maturation. Ces deux tests complémentaires, apporteront les premiers éléments d'information sur le mécanisme d'action des drogues.

Enfin des techniques de « docking » *in silico* seront mises en œuvre pour prédire la capacité de liaison des hits isolés sur leurs cibles potentielles (Ou-Yang et al., 2012).

II.3 Optimisation chimique des hits

II.3.1 Le processus hit-to-lead

Les hits isolés lors d'un criblage à l'aveugle sont rarement utilisés tel quel. Ils nécessitent une étape d'optimisation chimique pour les transformer en tête de série, plus communément appelé lead. En 2009, le pourcentage de hits ayant nécessités une optimisation chimique a varié entre 48 et 84 % en fonction des industries pharmaceutiques (Macarron et al., 2011). Cette étape est une étude de la relation structure-activité ou SAR, identifiant des pharmacophores indispensables à l'effet pharmacologique, les fonctions toxiques ou encore celles qui apportent un caractère chimique particulier (Duffy et al., 2012). L'objectif premier est d'augmenter la puissance et la spécificité des molécules. Les EC₅₀ des hits isolés du criblage sont de l'ordre du micromolaire. L'idéal serait de les diminuer à des concentrations aux alentours du nanomolaire voire du dizaine de nanomolaires. Parallèlement, le but est d'obtenir un lead qui possède des caractéristiques physicochimiques optimales (LogP bas, soluble dans l'eau, faible poids moléculaire...), reflétant un profil pharmacocinétique et une biodisponibilité attendus.

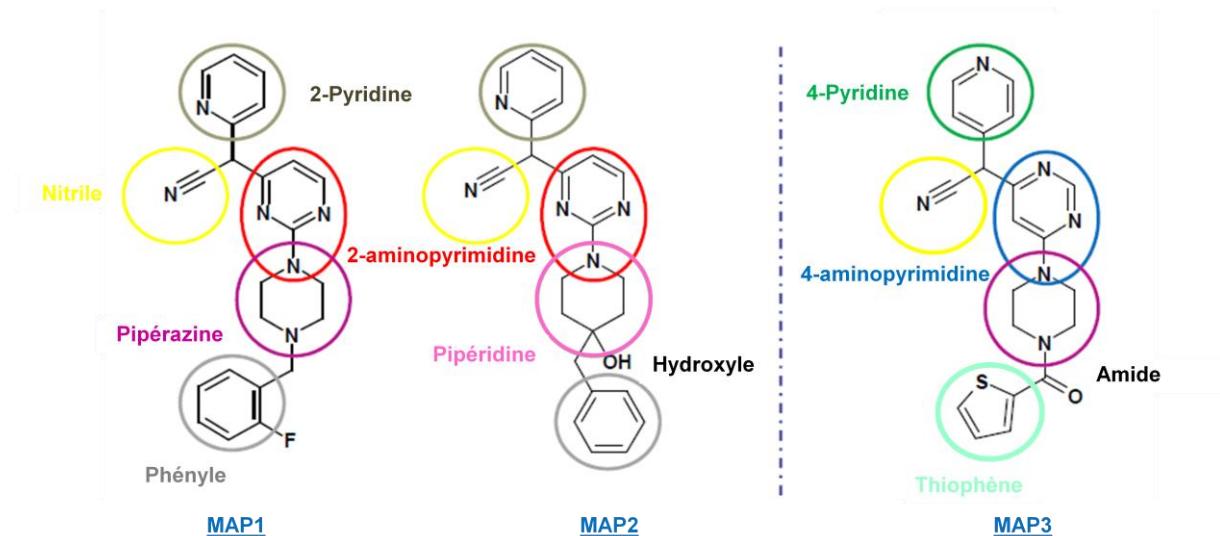


Figure 36 : Formules chimiques des MAPs isolées du criblage

La famille chimique la plus active, isolée lors du criblage, est celle des mono-aminopyrimidines (MAPs). Parmi ces trois molécules, deux se ressemblent davantage car la fonction amine est greffée en position 2 sur la pyrimidine (MAP1 et MAP2) (Figure 35), alors qu'elle est greffée en position 4 dans la structure de la MAP3 (Figure 35). Afin d'optimiser chimiquement les molécules, l'utilité et la position de chaque fonction, distinguée par des cercles colorés (Figure 35), sera évaluée. Ainsi, une série d'analogues de ces molécules va être synthétisée pour tester leur efficacité.

II.3.2 Le concept de « druggability »

Les petites molécules se voient souvent attribuer ce que l'on appelle un « drug score », paramètre qui prédit la capacité d'une molécule à devenir un médicament. Cette notion part du paradigme selon lequel une molécule n'aboutira pas à un médicament si elle ne répond pas aux critères de ressemblance des composés qui possèdent déjà une AMM (Makley and Gestwicki, 2013). Ce concept de « druggability » est pour le moins une barrière à l'innovation et exclut des molécules qui peuvent présenter un intérêt thérapeutique malgré tout. Certes ce paramètre aide à prédire une réussite ou un échec, mais il n'en reste pas moins que tant que l'on n'a pas essayé et échoué, une part de chance demeure. Dans le cadre notre étude, les trois molécules les plus actives (MAPs), ont un « drug score » satisfaisant, qui leur garantit, selon les critères définis ci-dessus, une plus grande chance, en termes physicochimiques, de parvenir à être un médicament.

II.4 Apport du modèle iPSCs à d'autres points clés du développement des hits

II.4.1 Variété de type cellulaire

Les iPSCs offrent la possibilité d'être différenciées, en théorie, vers tous les types cellulaires de l'organisme (Takahashi et al., 2007). Au sein du laboratoire, les protocoles de différenciation en une dizaine de progéniteurs ou de cellules en différenciation terminale sont validés et standardisés (Aubry et al., 2008; Giraud-Triboult et al., 2011; Guenou et al., 2009; Habeler et al., 2009; Nissan et al., 2011). Afin d'anticiper les répercussions de l'effet des hits sur les différentes atteintes de la progéria, il est envisagé de tester ces molécules sur d'autres

types cellulaires. Notamment, un des types cellulaires qui présentent des défauts majeurs dans la maladie sont les cellules vasculaires musculaires lisses. Ainsi, en collaboration avec l'équipe de Lino Ferreira basée au Portugal, nous envisageons d'évaluer l'efficacité des hits à restaurer les anomalies nucléaires, à diminuer la sénescence prématuée et à répondre au stress mécanique de cellules vasculaires musculaires lisses. De la même manière, nous envisageons de tester l'efficacité des hits sur des kératinocytes ou des mélanocytes grâce aux protocoles de différenciation disponibles au laboratoire. En effet, même si les affections cutanées ne sont pas la cause de décès chez les patients, ces deux types cellulaires sont néanmoins touchés dans la progéria (Lima et al., 2011). En revanche cette étape demandera un développement et une caractérisation de ces nouveaux modèles.

II.4.2 La toxicologie prédictive

Outre la diversification des tests d'efficacité sur différents types cellulaires, les modèles iPSCs ouvrent la perspective de prédire la toxicité éventuelle des hits avant leur administration chez les enfants (Laustriat et al., 2010). L'avantage d'un modèle de ce type est la possibilité d'évaluer la sécurité d'utilisation d'une molécule sur différents types cellulaires, mais également sur des génotypes variés pour prédire le plus fidèlement possible la réaction de chaque individu (Anson et al., 2011). Cependant, de telles approches sont encore au stade de développement, notamment à I-Stem, et nécessitent l'obtention de populations homogènes et fonctionnelles de dérivés d'iPSCs. Une étude récente a présenté la génération de culture d'hépatocytes-like en 3D qui a répondu à des modulateurs hépatiques (Takayama et al., 2013). De même, Sinnecker et al. ont démontré la possibilité d'utiliser des cardiomyocytes pour modéliser le syndrome du QT long (Sinnecker et al., 2013). Ces techniques de toxicologie prédictive ne pourront pas être appliquées aux molécules du criblage isolées dans cette étude, mais apporterons, aux criblages futurs, un élément de sécurité supplémentaire en aval de la sélection, lorsqu'elles seront optimisées.

II.4.3 Conclusion

En conclusion de cette partie du projet, le criblage à haut contenu nous a permis d'identifier une famille de molécules particulièrement actives sur les phénotypes pathologiques étudiés. Les étapes subséquentes seront donc menées sur ces trois molécules. Le chemin est encore long pour parvenir à un candidat médicament. Une fois que les molécules seront optimisées

chimiquement et qu'elles répondront aux critères de pharmacologie et toxicologie, leur efficacité d'action et la sécurité de leur utilisation seront testées sur un modèle murin. Les souris G609G récapitulent le plus de défauts caractéristiques de la progéria (Osorio et al., 2011). Il semble être le modèle *vivo* le plus prédictif de la pathologie et, pour ces raisons, a été sélectionné pour l'évaluation préclinique des leads de ce criblage.

III. Autre piste thérapeutique : les modulateurs d'épissage alternatifs

III.1 Recherche de modulateurs d'épissage alternatifs dans la progéria

III.1.1 Epissage alternatif du gène *LMNA* dans la progéria

La mutation c.1824C>T, responsable de la progéria, est à l'origine de l'activation d'un site cryptique d'épissage (5'SS) dans l'exon 11 du gène *LMNA*. L'épissage alternatif réduit simultanément le transcrit de la prélamine A saine et augmente la production d'un transcrit de la prélamine A mutée, délétée de 150 nucléotides (De Sandre-Giovannoli et al., 2003). Cependant, l'utilisation de ce 5'SS de la progérine est possible en l'absence de mutation, notamment dans le vieillissement physiologique, bien qu'à un niveau beaucoup plus faible (Haithcock et al., 2005; McClintock et al., 2007; Rodriguez et al., 2009; Scaffidi and Misteli, 2008). De même, l'induction de ce site d'épissage dans des fibroblastes contrôles, grâce à un oligonucléotide anti-sens ciblant l'exon 11, supporte l'hypothèse que ce 5'SS de la progérine est un site alternatif à celui de la lamine A (Fong et al., 2009).

Les acteurs principaux de l'épissage font partie d'un complexe appelé le spliceosome. Ce sont cinq petits ARN nucléaires (snRNA pour small nuclear RNA), U1, U2, U3, U4, U5 et U6 (Will and Luhrmann, 2001). Ils interagissent avec le pré-ARN messager en créant des appariements des bases avec leur séquence d'environ 150 pb. À ces ARNs viennent se complexer des régulateurs protéiques de l'épissage tels que des hnRNP (heterogenous RibonNcleoPotein) et des protéines de la famille des SR (Sérine-Arginine). Tous deux possèdent des domaines de liaison à l'ADN et des domaines d'interaction protéine-protéine, pouvant se lier au pré-ARNm avec une faible spécificité (Bourgeois et al., 2004; Tazi et al., 2009).

Le mécanisme d'épissage qui implique la production de la progérine est encore peu décrit dans la progéria. Cependant, il apparaît clairement que jouer sur la modulation de cet épissage au niveau de l'assemblage du spliceosome pourrait avoir une retombée bénéfique dans cette maladie.

III.1.2 SRSF1 et SRSF6 : Nos cibles pour atteindre la progérine

Une étude menée en 2011 a été consacrée à la compréhension des mécanismes d'épissage impliqués dans la progéria (Lopez-Mejia et al., 2011). Les auteurs ont tout d'abord mis en évidence que le segment de l'ARNm de la position 1804 à 1851, qui contient le site 5'SS de la progérine, possédait une structure 2D compacte, limitant l'accès des RNases. Cette structure caractéristique a été appelée boucle souche (SL pour Stem Loop) de la progérine. En revanche, ils ont montré que le site 5'SS de la lamine A était localisé dans une région très accessible d'ARN simple brin. Dans le transcrit possédant la mutation c.1824C>U, la boucle souche de la progérine est apparue ouverte, augmentant l'accessibilité du site 5'SS aux U1 snRNA. En outre, la modification de ce nucléotide implique une augmentation de la complémentarité de U1 snRNA, expliquant, en partie, l'augmentation de l'utilisation de ce site dans la progéria. Ainsi, ces données ont indiqué que la mutation c.1824C>T renforce une faiblesse du 5'SS de la progérine mais ne crée pas de 5'SS *de novo* (Lopez-Mejia et al., 2011).

Dans cette étude, les auteurs ont démontré, au travers d'expériences de gain et perte de fonctions, que SRSF1 était un activateur du 5'SS de la lamine A. A l'inverse ils ont mis en évidence que SRSF6 agissait comme un répresseur de la production de progérine en se liant à sa séquence SL et activant de manière indépendante le 5'SS la lamine A. Parallèlement à cette découverte, Ola Larsson et al. ont mis en évidence, grâce à une étude sur des cellules tumorales mammaires MCF7, que la metformine, biguanide indiquée dans les diabètes de type II, était responsable de la diminution de l'expression de plusieurs centaines de gène dont SRSF1 et SRSF6 (Larsson et al., 2012). Ainsi, dans le cadre d'une collaboration avec une autre équipe d'I-Stem, j'ai participé à un travail sur l'impact de la metformine sur certains régulateurs de l'épissage (Annexe 3). Cette étude s'est intéressée au potentiel thérapeutique de la metformine dans la dystrophie myotonique de type I (DM1), une maladie génétique caractérisée par des changements d'épissage d'un certain nombre de gènes. Nous avons pu mettre en évidence qu'un traitement de 48h à la metformine en dose répétée entraînait une

diminution dose-dépendante de l'expression de SRSF1 tant au niveau transcriptionnel que protéique, sans moduler l'expression de SRSF6 dans un modèle de MSCs DM1 dérivées d'ESCs (Annexe 3). Partant du lien établi entre la diminution de l'expression de la progérine lors de l'extinction de SRSF1 et de la diminution de l'expression de SRSF1 après traitement à la metformine, nous nous sommes donc intéressés à un effet thérapeutique éventuel de la metformine dans la progéria.

III.2 Mise en évidence de la metformine pour le traitement de la progeria

La première étape de ce projet a consisté à étudier l'expression des lamines après un traitement de 72h en dose répétée de metformine (Figure 36 A) à différentes concentrations allant de 320 nM à 25 mM. L'analyse western blot (Figure 36 B) a révélé que ce traitement induisait une diminution significative de lamine A et de la progérine mais pas de la lamine C. Dans le même temps, nos travaux ont démontré que le traitement à la metformine diminuait également l'expression de SRSF1. Afin de s'assurer que cette diminution d'expression était due à une réduction de l'expression des transcrits, une analyse de RT-qPCR de l'expression des lamines a été menée. Les résultats de ce test ont révélé que l'expression de l'ARNm de la lamine A (Figure 36 C) et de la progérine (Figure 36 D) était diminuée après traitement à la metformine de manière dose-dépendante. En revanche, l'expression de l'ARNm de la lamine C n'a pas été modulée par la metformine (Figure 36 E). Enfin, l'analyse par qPCR de l'expression de SRSF1 a, quant à elle, démontré que ce facteur d'épissage clé était diminué par le traitement à la metformine, et ce, également de manière dose-dépendante (Figure 36 F).

Dans la littérature, la diminution de la progérine a systématiquement été associée à une amélioration de l'état de l'enveloppe nucléaire des cellules progéria (Cao et al., 2011; Osorio et al., 2011). Nous avons donc cherché à savoir si la metformine pouvait améliorer ce défaut structural. La concentration de metformine choisie pour réaliser cette analyse a été de 5 mM, dose à laquelle la diminution de lamine A et progérine est maximale. Le dénombrement des noyaux bulleux réalisés grâce à un marquage anti-lamine A/C (Figure 36 G) a mis en évidence que la metformine restaurait partiellement ce paramètre, et ce de manière équivalente à celle observée après traitement avec un FTI (le tipifarnib) (Figure 36 H).

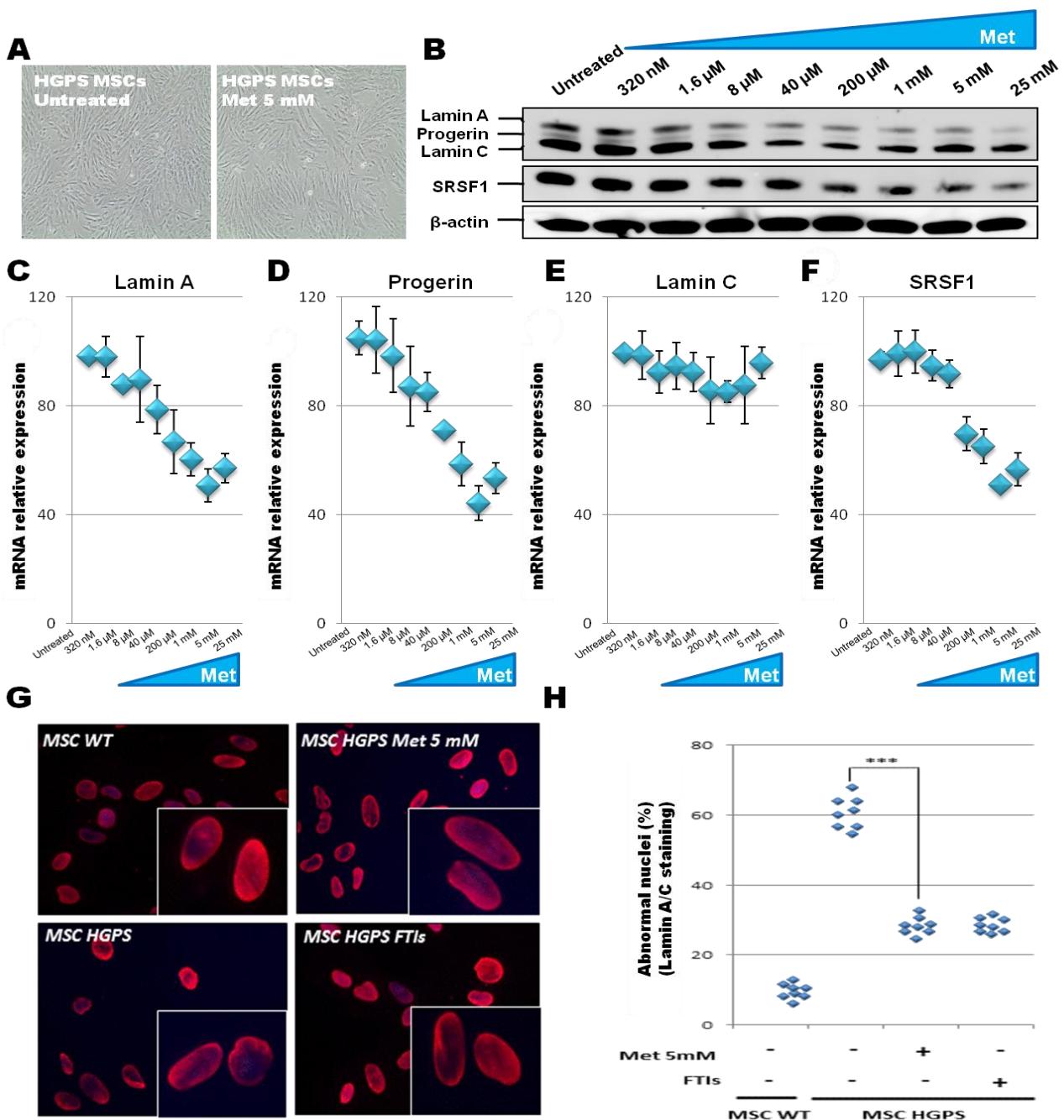


Figure 37 : Effet de la metformine sur l'expression

Traitement des MSCs progéria pendant 72 h en dose répétée. A) Photographie prise en microscopie à contraste de phase de MSCs progéria non traitées et traitées à la metformine. B) Analyse western blot de l'expression de la lamine A, de la progéride, de la lamine C (Millipore, JOL2), et de SRSF1 (LSBio, B2340) après traitement en dose croissante de metformine. C) D) E) F) Analyse RT-qPCR de l'expression de la lamine A, progéride, lamine C et SRSF1 après traitement en dose croissante de metformine. G) Immunomarquage réalisé avec un anticorps anti-lamine A/C (Millipore, JOL2) mettant en évidence des noyaux anormaux dans des MSCs contrôles (WT) et progéria (HGPS) traitées ou pas à la metformine (Met) 5mM, ou au FTI 1 μM, H) Quantification des noyaux anormaux dans les conditions de G.

III.3 Conclusions et perspectives

Les premiers résultats générés ont révélé que la recherche d'agent pharmacologique modifiant les facteurs d'épissage était une alternative de recherche à fort potentiel. Ces travaux ont démontré que la metformine était capable de diminuer significativement la progérine provoquant une amélioration du phénotype pathologique au travers d'une diminution du facteur d'épissage SRSF1.

III.3.1 Identification du mode d'action de la metformine

Afin d'élucider le mécanisme d'action emprunté par la metformine, des études mécanistiques doivent être entreprises. Les pistes d'investigation vers lesquelles nous concentrons nos efforts sont celles du lien entre aurora kinase A (AURKA) et SRSF1. AURKA est une kinase du cycle cellulaire impliquée dans la formation et/ou la stabilisation des microtubules du pôle du fuseau mitotique pendant la ségrégation des chromosomes (Reboutier et al., 2013). Plusieurs arguments nous ont menés vers cette perspective d'étude. Tout d'abord, la diminution de aurora kinase A entraîne une réduction de SRSF1 dans des cellules humaines (Montecucco and Biamonti, 2013; Moore et al., 2010). Deuxièmement, diminuer AURKA par un inhibiteur chimique comme le tozasertib induit une diminution de SRSF1 dose-dépendante (Moore et al., 2010). Enfin, différentes études ont montré que le traitement à la metformine à 10 mM diminuait l'expression de AURKA dans des ovocytes de bovins bloqués au stade de vésicule germinale (Tosca et al., 2007; Uzbekova et al., 2008). Ainsi, nous sommes en train de vérifier si, dans le modèle MSCs progéria traitées à la metformine, AURKA diminue et entraîne la diminution de SRSF1, pouvant expliquer l'inactivation du 5'SS de la progérine. En parallèle, nous étudions l'effet d'inhibiteurs chimiques d'AURKA, B et C, l'alisertib et le tozasertib pour renforcer notre hypothèse mécanistique (Sehdev et al., 2013).

III.3.2 Études *in vivo* et optimisation chimique

La metformine est un antidiabétique utilisé chez les patients depuis 1959. Très bien documenté chez l'adulte, son utilisation a été étendue aux indications pédiatriques (Al-Shareef et al., 2012; Giampatzis and Tziomalos, 2012) avec une très bonne tolérance (Copeland et al., 2013; Gottschalk et al., 2007; Jones et al., 2002). La metformine possédant déjà une AMM, son évaluation clinique chez les enfants pourrait se planifier rapidement.

Avant d'envisager cette phase, une étude préclinique chez la souris G609G (Osorio et al., 2011) va être réalisée par l'équipe de Nicolas Lévy pour montrer d'une part l'innocuité de la molécule dans ce contexte pathologique et d'autre part, pour mettre en évidence un bénéfice thérapeutique au sein d'un organisme entier. Par ailleurs, la metformine est couramment utilisée à des posologies élevées chez les patients diabétiques, un à trois grammes par jour. Bien que très peu d'effets indésirables soient imputés à ce médicament, il apparaît nettement que la metformine ait un manque de spécificité pour sa/ses cibles. En collaboration avec une autre équipe d'I-Stem et des chimistes de l'entreprise ChemX, nous avons donc générée une série d'analogues de la metformine afin de chercher une molécule qui possèderait les mêmes capacités que la metformine mais avec une sélectivité plus importante. Une telle molécule permettrait de diminuer les concentrations d'utilisation chez les patients atteints de progeria.

III.3.3 Autres molécules ciblant les épissages

Outre les aspects d'oligonucléotides anti-sens capables de bloquer l'accès au spliceosome déjà envisagés dans la progéria (Osorio et al., 2011; Scaffidi and Misteli, 2005), l'utilisation de petites molécules qui affectent la décision d'épissage est une piste thérapeutique intéressante à suivre. Les efforts de l'équipe sont actuellement concentrés sur l'étude des effets de la metformine et ses analogues, cependant, il existe un grand nombre de petites molécules synthétiques capables de moduler les épissages. En 2008, Sumanasekera et al les ont classées par famille identifiant des inhibiteurs de l'histone désacétylase, des inhibiteurs de kinases et de phosphatases, des hormones stéroïdiennes, des modulateurs de canaux ioniques, des inhibiteurs d'interaction protéiques ou encore des inhibiteurs de la topoisomérase de type II (Sumanasekera et al., 2008). Il apparaît donc que d'autres petites molécules pourraient jouer un rôle bénéfique dans la progéria en inhibant l'activation de ce site cryptique d'épissage. Afin de les identifier, un criblage ciblé de molécules connues pour moduler les épissages pourrait être envisagé dans le modèle de MSCs dérivés d'iPSCs caractérisé et validé au cours de ce travail de thèse.

IV. Conclusion générale

A travers ce projet de thèse, nous avons mis en place un modèle cellulaire pathologique récapitulant certains paramètres clés de la progéria. Ce modèle nous a permis de mettre en évidence de nouveaux mécanismes moléculaires impliqués dans ce syndrome mais également

d'étudier l'effet de molécules thérapeutiques. La mise au point et la réalisation d'un criblage de plus de 20 000 molécules a également ouvert de nouvelles pistes thérapeutiques que nous sommes en train d'explorer. Enfin, les premiers résultats en faveur de la metformine proposent une alternative aux autres solutions envisagées.

Cette contribution à l'avancée des connaissances sur la progéria n'est probablement qu'une brique parmi toutes celles qui constituent un édifice solide. Cependant les enjeux qui en découlent sont majeurs pour les enfants atteints par la progéria mais également pour d'autres laminopathies ou pathologies associées au vieillissement physiologique.

Annexes

Index des annexes

I. miR-9 : la sentinelle des neurones dans la progéria

Auteurs : Sophie Blondel, Claire Navarro, Nicolas Levy, Marc Peschanski et Xavier Nissan

Journal : Médecine/Sciences 2012 ; 28 : 663-6

II. In vitro pathological modelling using patient-specific induced pluripotent stem cell: the cas of progeria

Auteurs : Sophie Blondel, Xavier Nissan et Marc Peschanski

Journal : Biochemical Society Translational 2011, 39 (6) : 1775-9

III. Metformin control of multiple alternative RNA splicing opens new therapeutic potentials

Auteurs : Delphine Laustriat1, Jacqueline Gide, Laetitia Barrault, Alban Vignaud, Aline Huguet, Geneviève Gourdon, Nicolas Guerchet, Guillaume Tanniou, Sophie Blondel, Marie-Hélène Petit, Odile Juy, Guillaume Charpentier, Guillaume Bassez, Geneviève Piétu, Denis Furling, Xavier Nissan, Marc Peschanski, Sandrine Baghdayan

Journal : En révision dans le journal Nature sous forme de « Letter ».

miR-9 : la sentinelle des neurones dans la progéria

Sophie Blondel^{1,2,3}, Claire Navarro⁴, Nicolas Lévy^{4,5},
Marc Peschanski^{1,2,3}, Xavier Nissan^{1,2,3}

Lamine A, progéria et vieillissement prématué

La progéria typique (*Hutchinson-Gilford progeria syndrome - HGPS*) est un syndrome extrêmement rare (prévalence d'environ 1 sur 4 à 8 millions de naissances) qui est caractérisé par un vieillissement accéléré des patients. En 2003, deux équipes, dont celle du Pr Nicolas Lévy, ont identifié le défaut moléculaire responsable de cette pathologie [1, 2] : dans la majorité des cas il s'agit d'une mutation *de novo* localisée dans l'exon 11 du gène *LMNA* (c.1824C>T ; p.G608G) codant pour les lamines A et C. Bien que prédictive comme silencieuse au niveau protéique, cette substitution entraîne l'activation d'un site cryptique d'épissage, cinq nucléotides en amont de la mutation, et la production d'une isoforme tronquée de la lamine A, appelée « progérine ». D'un point de vue moléculaire, l'expression de cette protéine aberrante a des conséquences graves. Cette lamine A tronquée de 50 acides aminés dans sa partie carboxy-terminale ne peut plus subir la dernière étape de sa maturation post-traductionnelle qui, dans les conditions physiologiques, permet au précurseur de la lamine A d'être transformé en lamine A mature (Figure 1). En effet, au cours de ce processus de maturation, l'ancrage puis le décrochage de ce précurseur du réticulum endoplasmique se font normalement via l'ajout d'un groupement farnésyl, puis le clivage de cette partie carboxy-terminale

farnésylée [3]. Or, c'est cette dernière étape qui fait défaut dans la progéria du fait de l'absence du site de reconnaissance de l'enzyme *ZMPSTE24/FACE1* (*zinc metalloproteinase Ste24 homolog/ farnesylated proteins converting enzyme 1*). Au niveau cellulaire, ce défaut de maturation se traduit par une accumulation de progérine qui reste ancrée à la membrane nucléaire interne, entraînant une déstructuration de l'enveloppe nucléaire et un dysfonctionnement de nombreuses fonctions biologiques majeures, dont la réparation de l'ADN ou la prolifération cellulaire [3].

D'un point de vue clinique, cette maladie est caractérisée par l'apparition précoce d'un ensemble de symptômes le plus souvent associés au vieillissement physiologique. Les enfants malades présentent un retard statural sévère ainsi que des altérations de nombreux tissus/organes incluant les tissus squelettique, adipeux, cutané, musculaire ou encore cardiovasculaire. C'est cette atteinte du système cardiovasculaire qui est, dans la plupart des cas, à l'origine de leur décès prématué. Alors qu'une grande majorité de tissus et d'organes sont affectés dans cette pathologie, le système nerveux central est, de façon surprenante, épargné. Quels sont les mécanismes à l'origine de cette protection ? Cette question était restée jusqu'à présent sans réponse, du fait de la difficulté à accéder au tissu nerveux humain et de l'absence de modèle cellulaire adapté.

¹ CECs, I-STEM (Institute for stem cell therapy and exploration of monogenic diseases), AFM, 5, rue Henri Desbruères, 91030 Évry Cedex, France ;

² Inserm U-861, I-STEM, AFM, 5, rue Henri Desbruères, 91030 Évry Cedex, France ;

³ UVE U-861, I-STEM, AFM, 5, rue Henri Desbruères, 91030 Évry Cedex, France ;

⁴ AMU-Inserm UMR_S 910, génétique médicale et génomique fonctionnelle, faculté de médecine la Timone, 27, boulevard Jean Moulin, 13385 Marseille, France ;

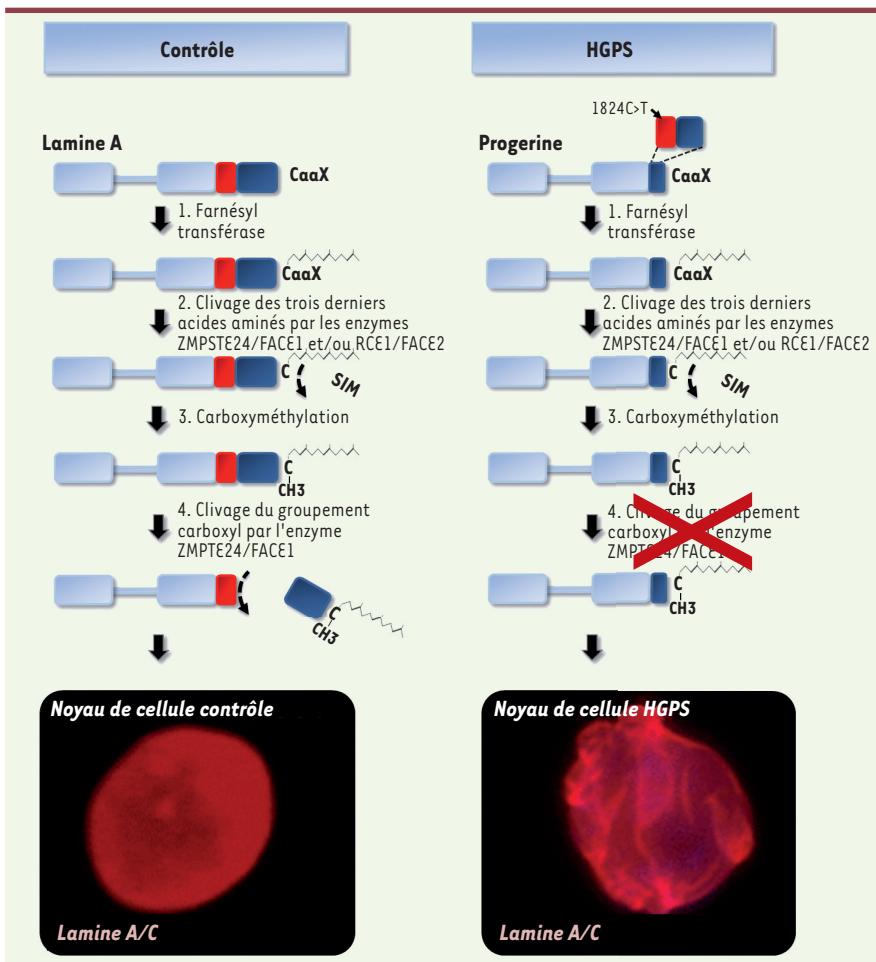
⁵ Département de génétique médicale, Hôpital d'enfants la Timone, 264, rue Saint-Pierre, 13385 Marseille, France.

xnissan@istem.fr

Apport des cellules iPS à la modélisation de la progéria

Depuis 2007 et la découverte des *induced pluripotent stem cells* (iPS) par l'équipe du Pr Shinya Yamanaka (université de Kyoto, Japon) [4], de nombreuses équipes ont pu modéliser *in vitro* des pathologies pour lesquelles l'absence de modèle adapté était justement un obstacle à l'étude des mécanismes en jeu et à la recherche de nouveaux traitements. En effet, comme nous l'avons récemment développé dans les colonnes de *médecine/sciences* [5, 6], les cellules souches pluripotentes présentent deux propriétés fondamentales qui en font une ressource potentiellement inépuisable de cellules humaines de tout phénotype d'intérêt, l'autorenouvellement illimité et la capacité à se différencier vers l'ensemble des types cellulaires de l'organisme.

En 2011, trois équipes ont ainsi successivement mis en évidence la pertinence de cette stratégie pour modéliser la progéria en montrant que les cellules iPS porteuses de la mutation, une fois différencierées en cellules souches mésenchymateuses, en fibroblastes ou en cellules musculaires lisses, exprimaient la progérine et des défauts de structuration de la matrice nucléaire, de prolifération et de réparation de l'ADN comparables à ceux qui sont observés dans des cultures de cellules



de reconnaissance, la dernière étape (4) fait défaut. Cette protéine reste en conséquence anormalement farnésylée, s'accumule au niveau de la membrane nucléaire et entraîne des déformations de l'enveloppe nucléaire des cellules de patients.

primaires [7-9]. Dans ce contexte, notre équipe a cherché à utiliser le même modèle d'étude pour comprendre ce qui pouvait être à l'origine de l'étonnante préservation des capacités cognitives des patients. Nous avons donc produit des lignées de cellules iPS à partir de cellules d'enfants atteints de progéria et les avons ensuite différenciées en un panel de types cellulaires : osseux, épidermique, rétinien et neural. Nos résultats, publiés dans la revue *Cell Reports* [10], ont ainsi montré que parmi tous ces types cellulaires, les neurones présentaient une originalité qui pouvait être à l'origine de cette singularité clinique, celle de ne pas exprimer les lamines de types A. Nous avons alors tenté de percer les mécanismes moléculaires physiologiques qui étaient à l'origine de cette absence d'expression de la lamine

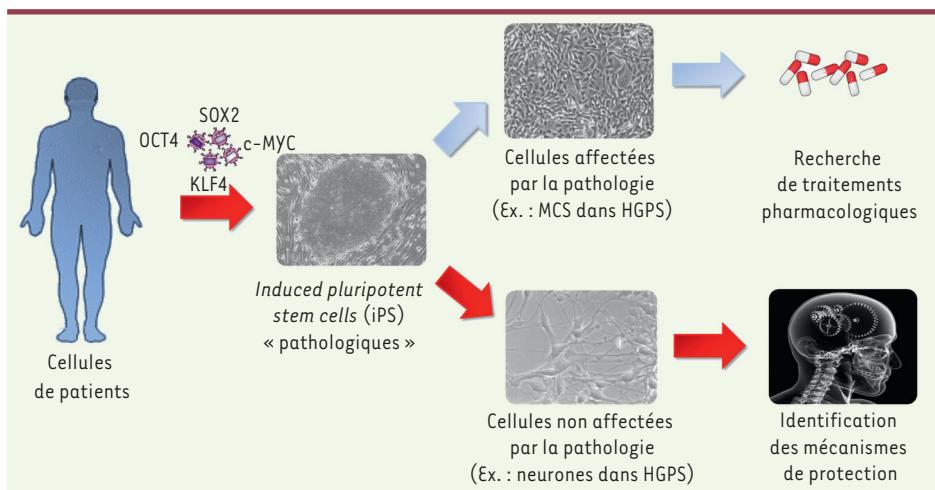
A dans les neurones. Dans ce but, nous sommes partis à la recherche de facteurs qui pourraient interférer spécifiquement avec l'expression du gène *LMNA* au niveau du système nerveux central, et avons ainsi mis en évidence l'implication d'un microARN, miR-9 [10] (Figure 2).

Identification du rôle clé de miR-9 dans la protection des neurones chez les patients atteints de progéria

Découverts dans un premier temps chez la plante en 1990, les microARN sont des petits ARN de 21 à 25 nucléotides qui participent aux mécanismes endogènes de régulation post-transcriptionnelle [11]. À ce jour, près de 2 000 microARN ont été décrits chez l'homme et l'on estime qu'ils modulent l'expression d'environ 30 % des

Figure 1. Bases moléculaires de la progéria : un défaut de maturation post-traductionnelle de la prélamine A. Le processus de maturation post-traductionnelle de la prélamine A en lamine A est affecté dans le progéria. La première étape de ce processus est : (1) l'ajout d'un groupement farnésyl au niveau de la cystéine du motif de farnésylation CaaX terminal (CSIM). Cette étape réalisée par une farnésyl-transférase est ensuite suivie (2) d'un clivage des trois derniers acides aminés par les enzymes ZMPSTE24/FACE1 et/ou RCE1/FACE2. (3) par une carboxyméthylation de la cystéine farnésylée par une isoprénylcystéinecarboxy-méthyl-transférase (ICMT). La dernière étape est enfin (4) un clivage des 15 derniers acides aminés de la protéine par l'enzyme ZMPSTE24/FACE1. À la suite de cette dernière étape, la lamine A mature se localise à la fois sous l'enveloppe nucléaire, dans la lamina nucléaire, et dans le reste du nucléoplasme. Dans la progéria (à droite), la mutation se situe au niveau de la partie déletée de la progéria. Le rectangle rouge représente la partie 5' de l'exon 11 jusqu'au site de coupe reconnu par ZMPSTE24/FACE1. Du fait de la délétion de ce site

gènes. D'un point de vue moléculaire, les microARN ciblent principalement les ARN messagers (ARNm) au niveau de leur partie 3' transcrive mais non traduite (3'UTR) pour en diminuer l'expression, soit en entraînant leur dégradation, soit en inhibant leur capacité de traduction, ou encore en provoquant la dégradation de la protéine néosynthétisée. Bien que ce mécanisme de régulation post-transcriptionnelle ait été à ce jour associé au contrôle de très nombreux processus biologiques, la majorité des études attribue aux microARN surtout un rôle dans la régulation des processus de prolifération et de différenciation. Plus récemment, certains microARN ont toutefois été impliqués aussi dans le contrôle d'autres mécanismes moléculaires associés au vieillissement : ainsi, miR-34a et miR-22



d'identifier et éventuellement corriger des défauts moléculaires qui en sont associé (Flèches bleues). Nos travaux décrivent une approche originale (flèches rouges). Elle consiste, lorsque la pathologie présente un tableau clinique différentiel, de comparer les phénotypes de cellules affectées de cellules non affectées offrant ainsi la possibilité de mettre en évidence des mécanismes de protection endogène qui pourraient, dans certains cas, permettre l'identification de nouvelles pistes thérapeutiques.

interviennent dans la réponse au stress cellulaire et miR-24 dans le contrôle de la sénescence réplicative et la réparation de l'ADN. En 2011, l'équipe du Dr Carlos López-Otín a, par ailleurs, mis en évidence le rôle de deux microARN, miR-1 et miR-29, dans la régulation de deux des principales voies de signalisation associées au vieillissement normal et pathologique, les voies de l'IGF1 (*insulin growth factor 1*) et de p53 [12]. Partant du constat de ce rôle majeur joué par les microARN dans le contrôle de l'expression génique, nous avons réalisé une étude bio-informatique dans le but d'identifier un ou plusieurs microARN capables de se fixer sur la séquence 3'UTR de l'ARN codant pour la lamine A. Les résultats obtenus par le croisement de trois algorithmes différents nous ont ainsi permis de définir une liste restreinte de microARN, parmi lesquels miR-9 a plus particulièrement attiré notre attention (1) parce qu'il n'est exprimé massivement que par les cellules neurales et (2) parce qu'il participe à la régulation de nombreux processus neuronaux. Dans un premier temps, nous avons confirmé l'interaction prédictive entre miR-9 et la région 3'UTR de la lamine A d'un point de vue fonctionnel, en réalisant une étude de gain de fonction de miR-9 dans des

cellules qui, physiologiquement, ne l'expriment pas, en l'occurrence des cellules souches mésenchymateuses. Ces expériences ont démontré que la surexpression de ce microARN pouvait induire une diminution d'expression de la lamine A dans des cellules mésenchymateuses issues de cellules iPS contrôles et de la progérine dans des cellules mésenchymateuses dérivées des lignées iPS - progéria (Figure 2). Ces résultats contribuant à faire de miR-9 un candidat solide pour le mécanisme neuroprotecteur que nous recherchions, nous avons dans un deuxième temps cherché à évaluer l'effet de la surexpression de ce microARN sur l'un des principaux défauts cellulaires associé à cette pathologie, les déformations de l'enveloppe nucléaire. Nos résultats ont effectivement montré que l'expression dans des cellules non neurales dérivées des lignées iPS-progéria du prémiR-9 validait cette hypothèse en provoquant une diminution significative de la proportion de noyaux anormaux dans les cultures cellulaires. Parallèlement à notre étude, une autre, menée par l'équipe du Dr Loren Fong (UCLA, Los Angeles) a identifié un mécanisme similaire chez une souris transgénique modèle de la maladie [13]. L'ensemble des travaux réalisés de manière concomitante

Figure 2. Utilisations des cellules souches induites à la pluripotence pour la modélisation pathologique.

Les cellules souches induites à la pluripotence (ou iPS) permettent, au travers de la surexpression de 4 facteurs OCT4, SOX2, KLF4 et c-Myc, de générer des cellules souches pluripotentes à partir d'une simple biopsie faite chez le patient. Lorsque le patient est atteint d'une pathologie, cette technique offre la possibilité de produire une quantité théoriquement inépuisable de matériel biologique permettant

par nos deux équipes, dans deux modèles différents, établissent donc clairement que c'est l'expression physiologique du microARN miR-9 dans les cellules nerveuses qui assure la préservation du système nerveux central, et des fonctions cognitives qu'il sous-tend, chez les patients atteints de progéria (Figure 3).

Conclusions

Au-delà de la mise en évidence du rôle de miR-9 dans la protection des neurones progéria, nos travaux soulèvent la question de l'utilisation de microARN à des fins thérapeutiques. Peut-on envisager de surexprimer miR-9 dans toutes les cellules d'un patient en vue de le guérir ? Bien que l'utilisation de microARN ou d'anti-microARN soit déjà une réalité clinique [14], et ce principalement en cancérologie, il est bien évidemment trop tôt pour envisager de les utiliser pour traiter un individu entier. Ce changement d'échelle non négligeable nécessite le développement de nouveaux outils à commencer par les vecteurs d'administration qui doivent permettre d'atteindre toutes les cellules du patient. Un second défi qui devra être relevé consistera à limiter les effets off target d'un tel traitement.

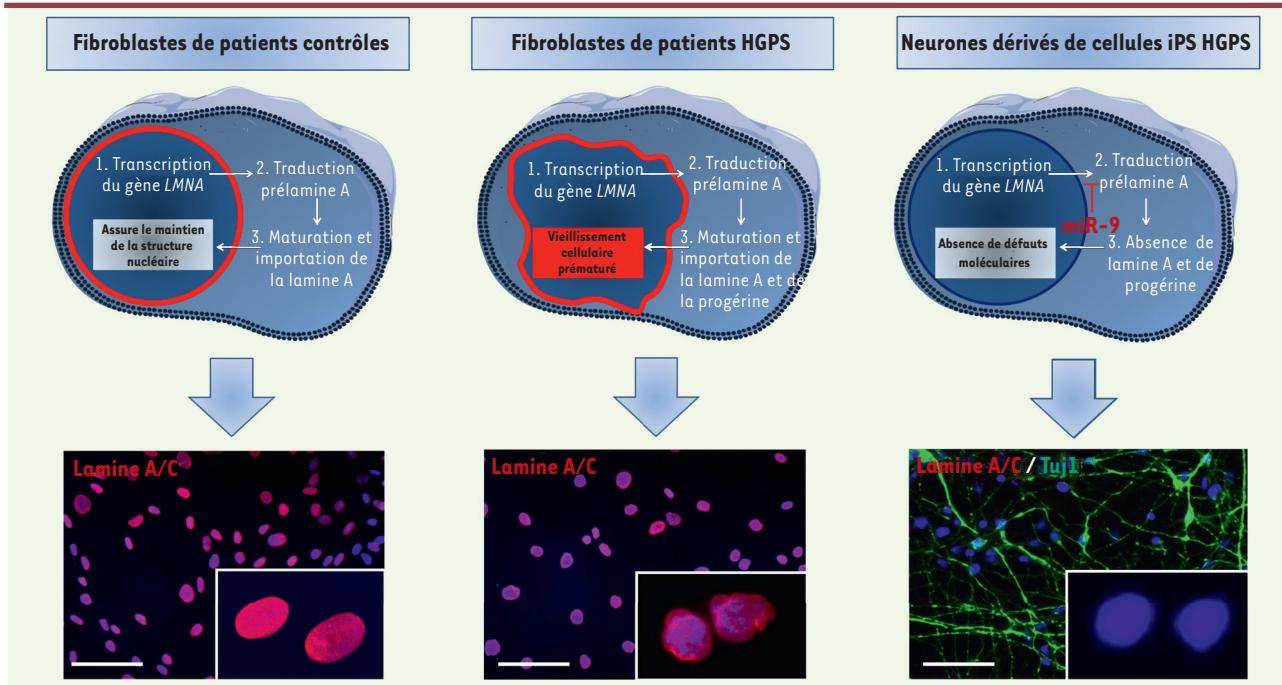


Figure 3. Identification du rôle de miR-9 dans la progéria. Représentation schématique du rôle de miR-9 dans la régulation de l'expression de la lamine A au niveau de fibroblastes ou de neurones dérivés de cellules iPS progéria. Dans des fibroblastes d'individus contrôles, la lamine A participe à un grand nombre de fonctions nucléaires dont la régulation de l'expression génique ou encore la réparation de l'ADN, et joue un rôle clé dans le maintien de la structure de la *lamina* nucléaire. Dans des fibroblastes progéria, le défaut de maturation de la lamine A conduit à de nombreux dysfonctionnements cellulaires se traduisant phénotypiquement par une forme anormale de l'enveloppe nucléaire comme en témoigne la photo de noyaux marqués par un anticorps anti-lamine A/C. En revanche, dans les neurones progéria (cellules TUJ1 positives), nos travaux démontrent que miR-9 inhibe l'expression de la lamine A, permettant ainsi de les protéger d'un vieillissement prématûre.

En effet par définition les microARN sont des régulateurs capables d'affecter plusieurs centaines, voire milliers de cibles différentes. La surexpression d'un microARN dans une cellule qui, dans des conditions physiologiques, ne l'exprime pas, pourrait, par exemple, entraîner la répression de nombreux gènes nécessaires à la survie ou aux fonctions de cette cellule. À ce jour de tels outils ne sont pas encore à notre disposition, mais leur développement pourrait, à terme, rendre ce type d'alternative thérapeutique possible. ♦

miR-9: the sentinel of neurons in progeria

REMERCIEMENTS

Ce travail a été cofinancé par l'Association française contre les myopathies (AFM) et l'Institut national de la santé et de la recherche médicale (Inserm), et a bénéficié de soutiens complémentaires de l'Université d'Évry Val d'Essonne (UEVE), d'un contrat ANR, et de Genopole.

LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

RÉFÉRENCES

1. De Sandre-Giovannoli A, Bernard R, Cau P, et al. Lamin A truncation in Hutchinson-Gilford progeria. *Science* 2003 ; 300 : 2055.
2. Eriksson M, Brown WT, Gordon LB, et al. Recurrent de novo point mutations in lamin A cause Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Nature* 2003 ; 423 : 293-8.
3. Navarro CL, Poitelon Y, Lévy N. Lamines A et syndromes progéroïdes : une farnesylation persistante aux conséquences dramatiques. *Med Sci (Paris)* 2008 ; 24 : 833-7.
4. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 2007 ; 131 : 861-9.
5. Nissan X, Lemaitre G, Peschanski M, et al. Les cellules souches pluripotentes font peau neuve. *Med Sci (Paris)* 2010 ; 26 : 5-8.
6. Nissan X, Lemaitre G, Peschanski M, et al. Les cellules souches redonnent de la couleur à la peau : une nouvelle source de mélanocytes pour la recherche clinique des pathologies pigmentaires. *Med Sci (Paris)* 2011 ; 27 : 935-8.
7. Ho JC, Zhou T, Lai WH, et al. Generation of induced pluripotent stem cell lines from 3 distinct laminopathies bearing heterogeneous mutations in lamin A/C. *Aging* 2011 ; 3 : 380-90.
8. Liu GH, Barkho BZ, Ruiz S, et al. Recapitulation of premature ageing with iPSCs from Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Nature* 2011 ; 472 : 221-5.
9. Zhang J, Lian Q, Zhu G, et al. A human iPSC model of Hutchinson-Gilford progeria reveals vascular smooth muscle and mesenchymal stem cell defects. *Cell Stem Cell* 2011 ; 8 : 31-45.
10. Nissan X, Blondel S, Navarro CL, et al. Unique preservation of neural cells in Hutchinson-Gilford progeria syndrome is due to the expression of the neural-specific miR-9 microRNA. *Cell Reports* 2012 (sous presse).
11. Hartmann H, Corre-menguy H, Boualem H, et al. Les microARN : une nouvelle classe de régulateurs de l'expression génique. *Med Sci (Paris)* 2004 ; 20 : 894-8.
12. Osorio FG, Navarro CL, Cadinanos J, et al. Splicing-directed therapy in a new mouse model of human accelerated aging. *Sci Transl Med* 2011 ; 3 : 106ra-107.
13. Jung HJ, Coffinier C, Choe Y, et al., Regulation of prelamin A but not lamin C by miR-9, a brain-specific microRNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012 ; 109 : 423-31.
14. Kasinski AL, Slack FJ. Epigenetics and genetics. MicroRNAs en route to the clinic: progress in validating and targeting microRNAs for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2011 ; 24 : 849-64.

TIRÉS À PART

X. Nissan

In vitro pathological modelling using patient-specific induced pluripotent stem cells: the case of progeria

Xavier Nissan^{*1,2}, Sophie Blondel^{††‡‡} and Marc Peschanski^{†‡}

^{*}CECS, I-Stem, AFM, Evry Cedex, France, [†]INSERM U861, I-Stem, AFM, Evry Cedex, France and [‡]UEVE U861, I-Stem, AFM, Evry Cedex, France

Abstract

Progeria, also known as HGPS (Hutchinson–Gilford progeria syndrome), is a rare fatal genetic disease characterized by an appearance of accelerated aging in children. This syndrome is typically caused by mutations in codon 608 (C1804T) of the gene encoding lamins A and C, *LMNA*, leading to the production of a truncated form of the protein called progerin. Owing to their unique potential to self renew and to differentiate into any cell types of the organism, pluripotent stem cells offer a unique tool to study molecular and cellular mechanisms related to this global and systemic disease. Recent studies have exploited this potential by generating human induced pluripotent stem cells from HGPS patients' fibroblasts displaying several phenotypic defects characteristic of HGPS such as nuclear abnormalities, progerin expression, altered DNA-repair mechanisms and premature senescence. Altogether, these findings provide new insights on the use of pluripotent stem cells for pathological modelling and may open original therapeutic perspectives for diseases that lack pre-clinical *in vitro* human models, such as HGPS.

HGPS (Hutchinson–Gilford progeria syndrome): state of the art

HGPS is a rare congenital disease characterized by accelerated aging in children [1]. This syndrome is typically caused by a *de novo* mutation in codon 608 (C1804T) of the *LMNA* gene [2] that encodes the major components of the nuclear lamina, the lamins A and C [3]. In HGPS, the *LMNA* mutation leads to the production and accumulation of an abnormally farnesylated form of lamin A called progerin, associated with misshaped giant nuclei [4,5]. This morphological defect is accompanied by several functional abnormalities, including disruption of nuclear pore complexes [6], genomic instability, defective DNA double-strand break repair [7,8], chromosome segregation defects and mitotic delay that together induce binucleated cells [4] (Figure 1A). These defects also lead to increased telomere shortening [9] and premature cell senescence [10]. Clinically, HGPS-affected children show what appears to be early aging of their skin, bones, joints and cardiovascular system, and usually suffer from osteoporosis, arthritis and heart disease (Figure 1B). Interestingly, and in contrast with normal aging, there is no apparent alteration of the central nervous system [11]. Death inevitably occurs during childhood usually due to cardiovascular disease, heart failure

or stroke. To date, two new treatment strategies are in clinical trials after showing a restoration of several cellular defects observed in HGPS patient cells and model systems, FTIs (farnesyltransferase inhibitors) and the combination of zoledronate and pravastatin (named ZoPra). The first class of compounds were first described as anticancer agents [12] and recently transposed to progeria after the discovery of the molecular mechanisms leading to progerin accumulation. In 2004, Fong and colleagues assessed the therapeutic interest of FTIs for progeria by demonstrating their capacity to inhibit the prenylation of pre-lamin A and thus preventing progerin synthesis [13]. Over the last 5 years, several studies have investigated the *in vitro* and *in vivo* therapeutic potential of these drugs [14]. In 2005, it was found that FTIs could inhibit pre-lamin A prenylation in a dose-dependent manner in progerin-overexpressing fibroblasts [13], decrease cytoplasmic aggregates and restore the mobility of the protein in progerin-transfected HeLa cells [4], restore normal nuclear morphology [15] and improve DNA repair in HGPS fibroblasts [16]. *In vivo* studies were performed on several progeria-like mouse models, suggesting that FTIs could reduce the cardiovascular [17] and osteoarticular [18] phenotypes of HGPS. In 2008, a second therapeutic strategy was proposed based on the combination of a statin (pravastatin) and a bisphosphonate (zoledronate), both of which act on the same cholesterol pathway as FTIs [19]. *In vitro* and *in vivo* functional improvement with this combined treatment was demonstrated as well as an effect on nuclear abnormalities of primary fibroblasts from patients and on extending lifespan in progeroid *Zmpste24*^{-/-} (zinc metalloprotease Ste24 homologue) mice. In addition to acting on the inhibition of the progerin farnesylation,

Key words: aging, Hutchinson–Gilford progeria syndrome (HGPS), induced pluripotent stem cell (iPSC), lamin A/C, progeria.

Abbreviations used: FD, familial dysautonomia; FTI, farnesyltransferase inhibitor; hESC, human embryonic stem cell; HGPS, Hutchinson–Gilford progeria syndrome; HTS, high-throughput screening; iPSC, induced pluripotent stem cell; hiPSC, human iPSC; LQTS, long QT syndrome; MSC, mesenchymal stem cell; PGD, pre-implantation genetic diagnosis; VSMC, vascular smooth muscle cell; ZoPra, zoledronate and pravastatin.

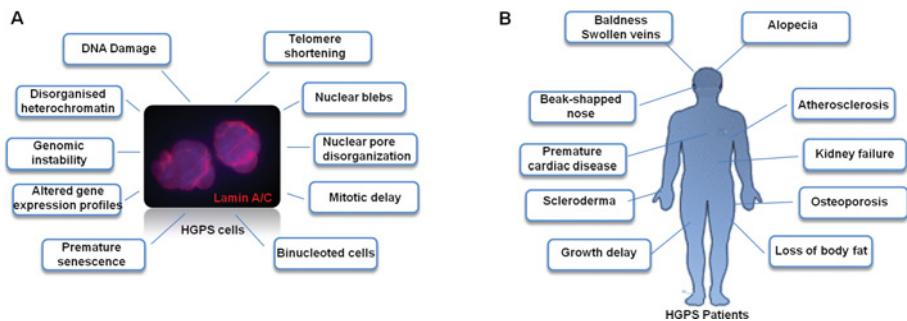
[†]These authors contributed equally to this study.

[‡]To whom correspondence should be addressed (email xnissan@istem.fr).

Figure 1 | Cellular and clinical features of HGPS

(A) HGPS cells present several molecular and cellular defects linked to premature aging. Morphologically, HGPS cells present nuclear blebs, nuclear pore disorganization and telomere shortening. Owing to mitotic delay, these cells are often binucleated. Together, these defects lead to DNA damage, disorganized heterochromatin, genomic instability, altered gene-expression profiles and premature senescence. (B) HGPS children display symptoms related to a global premature aging phenotype such as loss of body fat, scleroderma, alopecia and kidney failure. Moreover, they present baldness, swollen veins and have a beak-shaped nose, two typical features of this syndrome. HGPS patients suffer from atherosclerosis, osteoporosis, premature cardiovascular disease and growth delay.

COLOUR



ZoPra has the advantage of inducing pleiotropic effects which might contribute to improvement of the cardiovascular and osteoporotic phenotypes in HGPS patients [20]. These compounds are currently being explored in clinical trials. More recently, the use of rapamycin, an immunosuppressive and anti-neoplastic drug targeting mTOR (mammalian target of rapamycin) has been investigated to treat HGPS patients. Previously, rapamycin has been described to extend median and maximal lifespan of mice [21]. On the basis of *in vitro* functional experiments, mainly performed on HGPS patient fibroblasts, it has been described that rapamycin could abolish nuclear blebbing, delay the onset of cellular senescence and enhance the degradation of progerin in HGPS cells [22]. Even though all of these compounds bring new hopes for a potential treatment for HGPS patients, the establishment of *in vitro* alternative models compatible with high-throughput studies are required to find new classes of compounds.

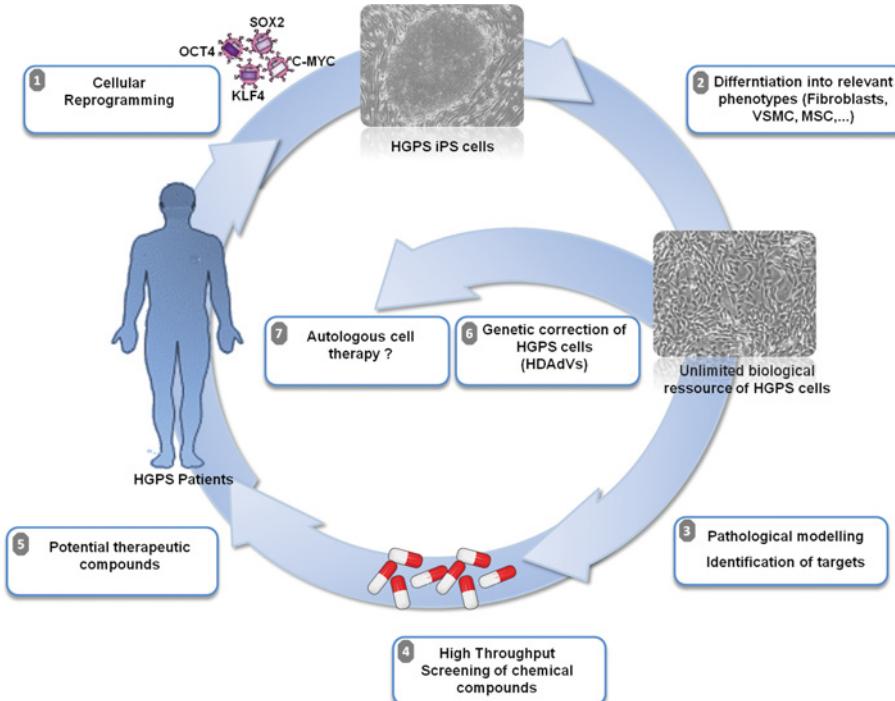
***In vitro* HGPS pathological modelling using iPSCs (induced pluripotent stem cells)**

Over the last 10 years, most of the information concerning the physiopathology of the disease has been obtained through establishment of HGPS primary skin cell cultures [23], lamin A-overexpression models [24] or the generation of various mouse models recapitulating part of the disease [25]. Little was known about cellular and molecular mechanisms of this disease because of the absence of suitable human *in vitro* models of HGPS. Indeed, access to relevant biological material was very difficult because patients are fragile and young, and because of the rarity of the disease which affects less than 200 patients worldwide. Recently, two groups have addressed this challenge by taking advantage of new technology enabling the generation of iPSCs [26–28].

Pluripotent stem cell research has significantly changed our perspectives by providing the scientific community with a unique tool for the derivation of disease-specific stem cells. Thanks to their properties of pluripotency and self-renewal, human pluripotent stem cells can differentiate into any cell type, making them a potential unlimited biological resource. In 1998, Thomson et al. [29] derived the first hESC (human embryonic stem cell) lines providing immediately an attractive model for pathological modelling of human diseases [29]. PGD (pre-implantation genetic diagnosis) gave researchers the possibility of prospectively identifying embryos with specific genetic disorders and then deriving 'disease-specific' hESCs for cystic fibrosis [30], Huntington's disease [31], fragile X mental retardation syndrome [32] or, more recently, myotonic dystrophy [33]. In 2007, the generation of hiPSCs (human iPSCs) by Shinya Yamanaka and colleagues broadened this potential to other diseases in which PGD was not available [34]. This pioneering study described the establishment of pluripotent stem cells from somatic cells through the overexpression of four factors: *Oct4*, *Sox2*, *Klf4* and *c-Myc*. Subsequently, hundreds of studies have demonstrated that hiPSCs present capacities close to hESCs in terms of self-renewal and pluripotency, offering an alternative unlimited source of cells suitable for pathological modelling, cell therapy or drug discovery (Figure 2). Such models have already permitted the elucidation of molecular mechanisms of several diseases [35] such as sickle cell anaemia [36], Parkinson's disease [37], amyotrophic lateral sclerosis [38] or spinal muscular atrophy [39]. In 2011, hiPSC lines have been derived from HGPS patient fibroblasts, opening new perspectives for progeria research. A first interesting observation has been the absence of either lamin A/C or progerin expression in the undifferentiated hiPSC colonies following the reprogramming process [26–28]. These data have confirmed the absence of synthesis of

Figure 2 | *In vitro* pathological modelling of HGPS using iPSCs

iPSCs can be generated by reprogramming of HGPS-affected children's skin fibroblasts with transcription factors (OCT4, SOX2, c-Myc, KLF4) (1). Their two distinctive properties (unlimited self-renewal capacity at the undifferentiated state and differentiation potential) allowed differentiation into several cell types, providing an unlimited biological resource of HGPS cells (2). These cells constitute a unique tool to study the physiopathology of the disease (3) and to assess the therapeutic potential of new compounds (5) identified via HTS of chemical drugs (4). Moreover, HGPS-differentiated cell defects can be genetically corrected (6) with the perspective of autologous cell therapy (7).



those proteins during embryonic development, accounting for the absence of a phenotype during the early developmental period in HGPS patients [11]. Upon the differentiation of HGPS-derived hiPSC progenies, the premature senescence phenotypes and nuclear bubbling appeared, according to the tissue specificity of the syndrome [26–28,40]. Six kinds of differentiation have been studied, showing different degrees of abnormalities in fibroblasts, MSCs (mesenchymal stem cells), endothelial cells, SMCs (smooth muscle cells) and VSMCs (vascular smooth muscle cells) but no abnormalities in neural progenitors [28]. Colman and colleagues showed that neural progenitors did not express lamin A/C and did not display any pathological phenotype [28], suggesting a correlation between the lack of a cognitive defect in HGPS and the tissue-specific expression of lamins in neural cells [41]. Studies were mainly focused on MSCs and VSMCs showing various cell defects: nuclear dysmorphism, cell growth retardation, susceptibility to apoptosis, proliferation reduction, DNA-repair defects, mislocalization of the protein LAP2 (lamin-associated polypeptide 2) and reduced telomere length. Moreover, this model opened the door to the identification of a novel senescence marker by Liu et al. [26] who demonstrated a deficiency of DNA-PKcs (DNA-dependent protein kinase catalytic subunit)/Ku70/Ku80.

Beyond the understanding of the physiopathological features of the disease, this pathological model is also a tool of choice for the identification of new therapeutics.

New therapeutic challenges of progeria syndrome

Thanks to their pluripotency capacities, hiPSCs can self-renew indefinitely *in vitro* while maintaining the ability to differentiate into advanced derivatives of all three germ layers. This feature could be harnessed for pharmacological and toxicological testing and as a gene therapy target. Development of targeted gene editing technologies in hiPSCs and hESCs offers new potentials for the efficient treatment of many human diseases. In 2007, Hanna et al. [36] addressed this issue by validating the use of a targeted gene-correction approach in a mouse model of sickle cell anaemia. Once generated, hiPSCs were differentiated into haemopoietic progenitors and subsequently transplanted into irradiated animals, thus rescuing partially the disease phenotype. The same strategy has been recently transposed to humans by generating hiPSCs from genetically corrected fibroblasts derived from patients with Fanconi's anaemia. In

this model, genetic correction also resulted in an alleviated phenotype in haemopoietic cells. This year, a breakthrough study by Liu et al. [27] combined the generation of hiPSCs from HGPS patients with a genetic correction by homologous recombination of lamin A mutations. Using HDAdVs (helper-dependent adenoviral vectors), the authors demonstrated a highly efficient method for correcting the causal mutation in hiPSCs and demonstrated the abrogation of progerin expression in fibroblasts derived from hiPSCs and in MSCs in association with their rescue in terms of nuclear architecture and cell senescence. The methodology used in this pioneering study addressed some major issues related to off-target effects of the genetic manipulation by showing the absence of additional mutations or chromosomal aberrations in modified cells. The hiPSC technology thus potentially provides experimental therapists with an unlimited source of genetically corrected cells. Some issues have, however, emerged recently. Over the last few months, a slew of papers have described numerous epigenetic errors and genomic instabilities consequent to the cellular reprogramming itself (reviewed in [42]). Several alternative strategies are currently under investigation to avoid the random integration of transgenes by using non-integrating viral approaches [43], small molecules [44], synthetic modified mRNA [45], episomes [46] or recombinant proteins [47]. Beyond their cell therapy applications, one major advantage of hiPSCs is to allow the generation of a potentially unlimited library of human cells suitable for HTS (high-throughput screening) and toxicology experiments. Regarding the technical requirements of HTS, in terms of automation, robustness, reproducibility and sensibility, hiPSCs appear to be a real prospect for the pharmaceutical industry. A first proof of concept was obtained in 2009 by Lorenz Studer's group on FD (familial dysautonomia), a fatal peripheral neuropathy caused by a point mutation in the *IKBKAP* gene [48]. By combining the generation of hiPSCs from patients' fibroblasts and accurate protocols of differentiation, these authors demonstrated a defect in *IKBKAP* splicing, a decreased rate of neurogenesis, and reduced migration in FD-hiPSC derivatives. Taking advantage of this model, they evaluated the potency of candidate drugs in reversing these phenotypes. This year, another study reported such a strategy for cardiovascular disorders. iPSCs were generated from patients presenting congenital LQTSs (long QT syndromes) to investigate phenotypes of hiPSC-derived cardiomyocytes [49]. The authors demonstrated a pathological prolonged ventricular repolarization of cardiomyocytes derived from LQTS-hiPSCs and a significant improvement of this phenotype in response to β -blockers, as clinically observed in patients. Because of the absence of any human model of HGPS suitable for HTS, all the compounds investigated in clinical trials (FTIs and ZoPra combination) have up to now been identified through hypothesis-driven strategies, on the basis of the identification of the molecular mechanisms responsible for the defective lamin A precursor maturation, the farnesylation. The recent studies of the groups of Alan Colman [28] and Juan Carlos Izpisúa Belmonte [26,27] demonstrating that hiPSC

derivatives exhibit the phenotypic defects of HGPS have now opened perspectives for screening and identifying new classes of therapeutic compounds, with the possibility of identifying new, effective and safe therapeutics for the children who suffer from this dramatic disease.

Conclusions

Since 2006, considerable progress has been made in understanding the connection between HGPS and normal physiological aging, supporting the idea that the premature aging disease HGPS and normal aging may share a common cellular and molecular basis [50]. The recent discovery of iPSCs offers a glimpse of a hope in the development of therapeutic strategies for this syndrome and consequently, because of its similarities, offers the scientific community a tool to decipher the molecular basis of several degenerative disorders related to physiological aging.

Acknowledgements

We thank Dr Susan Cure for revising the paper before submission and Dr Cécile Martinat for providing helpful discussions.

References

- 1 Hennekam, R.C. (2006) Hutchinson–Gilford progeria syndrome: review of the phenotype. *Am. J. Med. Genet. A* **140**, 2603–2624
- 2 De Sandre-Giovannoli, A., Bernard, R., Cau, P., Navarro, C., Amiel, J., Boccaccio, I., Lyonnet, S., Stewart, C.L., Munnich, A., Le Merrer, M. and Lévy, N. (2003) Lamin A truncation in Hutchinson–Gilford progeria. *Science* **300**, 2055
- 3 Burke, B. and Stewart, C.L. (2006) The laminopathies: the functional architecture of the nucleus and its contribution to disease. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* **7**, 369–405
- 4 Cao, K., Capell, B.C., Erdos, M.R., Djabali, K. and Collins, F.S. (2007) A lamin A protein isoform overexpressed in Hutchinson–Gilford progeria syndrome interferes with mitosis in progeria and normal cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **104**, 4949–4954
- 5 Goldman, R.D., Shumaker, D.K., Erdos, M.R., Eriksson, M., Goldman, A.E., Gordon, L.B., Grunbaum, Y., Khuon, S., Mendez, M., Varga, R. and Collins, F.S. (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
- 6 Musich, P.R. and Zou, Y. (2009) Genomic instability and DNA damage responses in progeria arising from defective maturation of prelamin A. *Ageing* **1**, 28–37
- 7 Liu, B., Wang, J., Chan, K.M., Tjia, W.M., Deng, W., Guan, X., Huang, J.D., Li, K.M., Chau, P.Y., Chen, D.J. et al. (2005) Genomic instability in laminopathy-based premature ageing. *Nat. Med.* **11**, 780–785
- 8 Manju, K., Muralikrishna, B. and Parnaik, V.K. (2006) Expression of disease-causing lamin A mutants impairs the formation of DNA repair foci. *J. Cell Sci.* **119**, 2704–2714
- 9 Decker, M.L., Chavez, E., Vulto, I. and Lansdorp, P.M. (2009) Telomere length in Hutchinson–Gilford progeria syndrome. *Mech. Ageing Dev.* **130**, 377–383
- 10 Navarro, C.L., Cau, P. and Lévy, N. (2006) Molecular bases of progeroid syndromes. *Hum. Mol. Genet.* **15** (Suppl. 2), R151–R161
- 11 Pereira, S., Bourgeois, P., Navarro, C., Esteves-Vieira, V., Cau, P., De Sandre-Giovannoli, A. and Lévy, N. (2008) HGPS and related premature ageing disorders: from genomic identification to the first therapeutic approaches. *Mech. Ageing Dev.* **129**, 449–459
- 12 Agrawal, A.G. and Soman, R.R. (2009) Farnesyltransferase inhibitor as anticancer agent. *Mini Rev. Med. Chem.* **9**, 638–652

- 13 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. and Collins, F.S. (2005) Inhibiting farnesylation of progerin prevents the characteristic nuclear blebbing of Hutchinson–Gilford progeria syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**, 12879–84
- 14 Young, S.G., Meta, M., Yang, S.H. and Fong, L.G. (2006) Prelamin A farnesylation and progeroid syndromes. *J. Biol. Chem.* **281**, 39741–39745
- 15 Yang, S.H., Bergo, M.O., Toth, J.I., Qiao, X., Hu, Y., Sandoval, S., Meta, M., Bendale, P., Gelb, M.H., Young, S.G. and Fong, L.G. (2005) Blocking protein farnesyltransferase improves nuclear blebbing in mouse fibroblasts with a targeted Hutchinson–Gilford progeria syndrome mutation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**, 10291–10296
- 16 Constantinescu, D., Csoka, A.B., Navara, C.S. and Schatten, G.P. (2010) Defective DSB repair correlates with abnormal nuclear morphology and is improved with FTI treatment in Hutchinson–Gilford progeria syndrome fibroblasts. *Exp. Cell Res.* **316**, 2747–2759
- 17 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. et al. (2008) A farnesyltransferase inhibitor prevents both the onset and late progression of cardiovascular disease in a progeria mouse model. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105**, 15902–15907
- 18 Yang, S.H., Meta, M., Qiao, X., Frost, D., Bauch, J., Coffinier, C., Majumdar, S., Bergo, M.O., Young, S.G. and Fong, L.G. (2006) A farnesyltransferase inhibitor improves disease phenotypes in mice with a Hutchinson–Gilford progeria syndrome mutation. *J. Clin. Invest.* **116**, 2115–2121
- 19 Varela, I., Pereira, S., Ugalde, A.P., Navarro, C.L., Suárez, M.F., Cau, P., Cadiñanos, J., Osorio, F.G., Foray, N., Cobo, J. et al. (2008) Combined treatment with statins and aminobisphosphonates extends longevity in a mouse model of human premature ageing. *Nat. Med.* **14**, 767–772
- 20 Russell, R.G., Watts, N.B., Ebetino, F.H. and Rogers, M.J. (2008) Mechanisms of action of bisphosphonates: similarities and differences and their potential influence on clinical efficacy. *Osteoporosis Int.* **19**, 733–759
- 21 Harrison, D.E., Strong, R., Sharp, Z.D., Nelson, J.F., Astle, C.M., Flurkey, K., Nadon, N.L., Wilkinson, J.E., Frenkel, K., Carter, C.S. et al. (2009) Rapamycin fed late in life extends lifespan in genetically heterogeneous mice. *Nature* **460**, 392–395
- 22 Cao, K., Graziotto, J.J., Blair, C.D., Mazzulli, J.R., Erdos, M.R., Krainc, D. and Collins, F.S. (2011) Rapamycin reverses cellular phenotypes and enhances mutant protein clearance in Hutchinson–Gilford progeria syndrome cells. *Sci. Transl. Med.* **3**, 89ra58
- 23 Paradisi, M., McClintock, D., Boguslavsky, R.L., Pedicelli, C., Worman, H.J. and Djabali, K. (2005) Dermal fibroblasts in Hutchinson–Gilford progeria syndrome with the lamin A G608G mutation have dysmorphic nuclei and are hypersensitive to heat stress. *BMC Cell Biol.* **6**, 27
- 24 Scaffidi, P. and Misteli, T. (2008) Lamin A-dependent misregulation of adult stem cells associated with accelerated ageing. *Nat. Cell Biol.* **10**, 452–459
- 25 Osorio, F.G., Obaya, A.J., López-Otin, C. and Freije, J.M. (2009) Accelerated ageing: from mechanism to therapy through animal models. *Transgenic Res.* **18**, 7–15
- 26 Liu, G.H., Barkho, B.Z., Ruiz, S., Diep, D., Qu, J., Yang, S.L., Panopoulos, A.D., Suzuki, K., Kurian, L., Walsh, C. et al. (2011) Recapitulation of premature ageing with iPSCs from Hutchinson–Gilford progeria syndrome. *Nature* **472**, 221–225
- 27 Liu, G.H., Suzuki, K., Qu, J., Sancho-Martinez, I., Yi, F., Li, M., Kumar, S., Nivet, E., Kim, J., Soligalla, R.D. et al. (2011) Targeted gene correction of laminopathy-associated LMNA mutations in patient-specific iPSCs. *Cell Stem Cell* **8**, 688–694
- 28 Zhang, J., Lian, Q., Zhu, G., Zhou, F., Sui, L., Tan, C., Mutualif, R.A., 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
- 29 Thomson, J.A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S.S., Waknitz, M.A., Swiergiel, J.J., Marshall, V.S. and Jones, J.M. (1998) Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* **282**, 1145–1147
- 30 Mateizel, I., De Temmerman, N., Ullmann, U., Cauffman, G., Sermon, K., Van de Velde, H., De Rycke, M., Degreef, E., Devroey, P., Liebaers, I. and Van Steirteghem, A. (2006) Derivation of human embryonic stem cell lines from embryos obtained after IVF and after PGD for monogenic disorders. *Hum. Reprod.* **21**, 503–511
- 31 Mateizel, I., Spits, C., De Rycke, M., Liebaers, I. and Sermon, K. (2010) Derivation, culture, and characterization of VUB hESC lines. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* **46**, 300–308
- 32 Eiges, R., Urbach, A., Malcov, M., Frumkin, T., Schwartz, T., Amit, A., Yaron, Y., Eden, A., Yanuka, O., Benvenisty, N. and Ben-Yosef, D. (2007) Developmental study of fragile X syndrome using human embryonic stem cells derived from preimplantation genetically diagnosed embryos. *Cell Stem Cell* **1**, 568–577
- 33 Marteyn, A., Maury, Y., Gauthier, M.M., Lecuyer, C., Vernet, R., Denis, J.A., Pietu, G., Peschanski, M. and Martinat, C. (2011) Mutant human embryonic stem cells reveal neurite and synapse formation defects in type 1 myotonic dystrophy. *Cell Stem Cell* **8**, 434–444
- 34 Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K. and Yamanaka, S. (2007) Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* **131**, 861–872
- 35 Colman, A. and Dreesen, O. (2009) Pluripotent stem cells and disease modelling. *Cell Stem Cell* **5**, 244–247
- 36 Hanna, J., Wernig, M., Markoulaki, S., Sun, C.W., Meissner, A., Cassady, J.P., Beard, C., Brambrink, T., Wu, L.C., Townes, T.M. and Jaenisch, R. (2007) Treatment of sickle cell anemia mouse model with iPS cells generated from autologous skin. *Science* **318**, 1920–1923
- 37 Wernig, M., Zhao, J.P., Pruszak, J., Hedlund, E., Fu, D., Soldner, F., Broccoli, V., Constantine-Paton, M., Isacson, O. and Jaenisch, R. (2008) Neurons derived from reprogrammed fibroblasts functionally integrate into the fetal brain and improve symptoms of rats with Parkinson's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105**, 5856–5861
- 38 Dimos, J.T., Rodolfa, K.T., Niakan, K.K., Weisenthal, L.M., Mitsumoto, H., Chung, W., Croft, G.F., Saphier, G., Leibl, R., Goland, R. et al. (2008) Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons. *Science* **321**, 1218–1221
- 39 Ebert, A.D., Yu, J., Rose, Jr, F.F., Mattis, V.B., Lorson, C.L., Thomson, J.A. and Svendsen, C.N. (2009) Induced pluripotent stem cells from a spinal muscular atrophy patient. *Nature* **457**, 277–280
- 40 Ho, J.C., Zhou, T., Lai, W.H., Huang, Y., Chan, Y.C., Li, X., Wong, N.L., Li, Y., Au, K.W., Guo, D. et al. (2011) Generation of induced pluripotent stem cell lines from 3 distinct laminopathies bearing heterogeneous mutations in lamin A/C. *Ageing* **3**, 380–390
- 41 Broers, J.L., Machiels, B.M., Kuijpers, H.J., Smedts, F., van den Kieboom, R., Raymond, Y. and Ramaekers, F.C. (1997) A- and B-type lamins are differentially expressed in normal human tissues. *Histochem. Cell Biol.* **107**, 505–517
- 42 Panopoulos, A.D., Ruiz, S. and Izpisúa Belmonte, J.C. (2011) iPSCs: induced back to controversy. *Cell Stem Cell* **8**, 347–348
- 43 Stadtfeld, M., Nagaya, M., Utikal, J., Weir, G. and Hochedlinger, K. (2008) Induced pluripotent stem cells generated without viral integration. *Science* **322**, 945–949
- 44 Lyssiotis, C.A., Foreman, R.K., Staerk, J., Garcia, M., Mathur, D., Markoulaki, S., Hanna, J., Lairson, L.L., Charette, B.D., Bouchez, L.C. et al. (2009) Reprogramming of murine fibroblasts to induced pluripotent stem cells with chemical complementation of Klf4. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106**, 8912–8917
- 45 Warren, L., Manos, P.D., Ahfeldt, T., Loh, Y.H., Li, H., Lau, F., Ebina, W., Mandal, P.K., Smith, Z.D., Meissner, A. et al. (2010) Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA. *Cell Stem Cell* **7**, 618–630
- 46 Yu, J., Hu, K., Smuga-Otto, K., Tian, S., Stewart, R., Slukvin, II and Thomson, J.A. (2009) Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences. *Science* **324**, 797–801
- 47 Zhou, H., Wu, S., Joo, J.Y., Zhu, S., Han, D.W., Lin, T., Trauger, S., Bien, G., Yao, S., Zhu, Y. et al. (2009) Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins. *Cell Stem Cell* **4**, 381–384
- 48 Lee, G., Papapetrou, E.P., Kim, H., Chambers, S.M., Tomishima, M.J., Fasano, C.A., Ganat, Y.M., Menon, J., Shimizu, F., Viale, A. et al. (2009) Modelling pathogenesis and treatment of familial dysautonomia using patient-specific iPSCs. *Nature* **461**, 402–406
- 49 Itzhaki, I., Maizels, L., Huber, I., Zwi-Dantsis, L., Caspi, O., Winterstern, A., Feldman, O., Gepstein, A., Arbel, G., Hammerman, H. et al. (2011) Modelling the long QT syndrome with induced pluripotent stem cells. *Nature* **471**, 225–229
- 50 Scaffidi, P. and Misteli, T. (2006) Lamin A-dependent nuclear defects in human ageing. *Science* **312**, 1059–1063

Metformin control of multiple alternative RNA splicing opens new therapeutic potentials

Delphine Laustriat¹, Jacqueline Gide¹, Laetitia Barrault¹, Alban Vignaud³, Aline Huguet⁴, Geneviève Gourdon⁴, Nicolas Guerchet³, Guillaume Tanniou³, Sophie Blondel², Marie-Hélène Petit⁵, Odile Juy⁵, Guillaume Charpentier⁵, Guillaume Bassez⁶, Geneviève Piétu², Denis Furling⁷, Xavier Nissan¹, Marc Peschanski^{2*}, Sandrine Baghdoyan^{2*}

1. CECS/AFM, Génopôle Campus 1, 5 rue Henry Desbruères 91030 Evry Cedex, France.
2. INSERM/UEVE 861, Génopôle Campus 1, 5 rue Henry Desbruères 91030 Evry Cedex, France.
3. Généthon, 1bis rue de l'Internationale, BP 60, 91002 EVRY Cedex France
4. Inserm U781, Hôpital Broussais, Batiment Leriche, 96 rue Didot 75014 Paris, France
5. CERITD - BIOPARC GENOPOLE Campus 3 bâtiment 5 - 1 rue Pierre Fontaine 91058 EVRY Cedex, France.
6. GH Henri Mondor, 51 Avenue du Maréchal de Lattre de Tassigny 94010 Créteil Cedex, France.
7. UPMC Univ Paris 06, UM 76, Institut de Myologie and Inserm, U974 and CNRS, UMR7215, Paris, France.

Correspondence, INSERM/UEVE 861

mpeschanski@istem.fr

sbaghdoyan@istem.fr

Major physiological changes are governed by RNA alternative splicing, and its misregulation may lead to specific diseases¹. Large families of splice regulators have been identified that are each responsible for finely-tuned effects on discrete sets of target proteins². The activity of these splice regulators is highly controlled by a variety of signaling pathways that are dependent on homeostatic conditions and cellular environment^{3,4}. Here we show that this system is druggable and has therapeutic potential, by demonstrating the effects of the biguanide, metformin, on embryonic stem cell derivatives affected by myotonic dystrophy type I⁵. The mechanism of action depends on changes induced by the drug in the expression of a specific subset of splice regulators, downstream of the inhibition of the mitochondrial complex I. Biological effects of metformin were shown to be compatible with typical therapeutic dosages in a clinical investigation involving diabetic patients. As underscored by the latter results, as well as with cells derived from healthy embryos, the metformin effect was independent of the myotonic dystrophy pathology. The drug appears altogether to be a modifier of alternative splicing of a subset of genes, opening novel therapeutic potentials that may relate to many more diseases besides those directly linked to defective alternative splicing. Metformin was only one among many drugs that, by affecting cell oxidation and possibly other homeostatic equilibriums, also impacts RNA alternative splicing in ways that deserve to be explored further as potential new pharmacological approaches.

Myotonic dystrophy type I (DM1) is a monogenic disease characterized by changes in the RNA alternative splicing of a number of genes, leading to abnormal protein isoform ratios and clinical consequences⁶⁻⁸. Within the framework of a research program exploring pathological mechanisms in derivatives of stem cell lines derived from embryos carrying a

DM1 defective gene⁵, we explored the therapeutic potential of the anti-diabetic biguanide, metformin, because insulin resistance is a hallmark of the disease.

Mesodermal precursor cells (MPCs) derived from the affected embryonic stem cell line VUB03_DM1 and the control cell line VUB01 were exposed for 48 hours to various doses of metformin. This treatment revealed a significant post-transcriptional effect since the inclusion by alternative splicing of exon 11 of *INSR* increased in DM1 cells (Figure 1A). A similar shift towards exon 11 inclusion was also observed in control MPCs (Supplementary Figure 2A). In order to determine the overall biological effect of the drug in DM1 cells, the alternative splicing of a series of genes affected by the disease was explored. Reduction of the abnormally high exclusion of exon 22 was observed in MPCs for *SERCA1* (*ATP2A1*)⁹ (Figure 1B). Since some genes were not naturally expressed in MPCs, relevant minigenes were used for hcTNT⁶ and *Clcn1* exon 7a. Correction of the splicing defects was also observed upon treatment, with decreased inclusion of exon 5 for *TNNT2* and exon 7a for *Clcn1* (Figure 1C and 1D). Control experiments with the hcTNT minigene mutated in the CUGBP1 response element showed that the normalizing effect of metformin did not depend on the DM1-associated splice factor, CUGBP1 (Figure 1C). This was consistent with the fact that metformin affected exon 7a of *Clcn1*, which is not controlled by CUGBP1¹⁰. Similar responses to metformin were observed for the endogenous expression of *INSR1*, *SERCA1* and *TNNT2* in human wild type and DM1 myoblasts (Figure 1E).

The pathway by which metformin modulates RNA alternative splicing was explored. A quantitative PCR assay was developed to quantify the relative expression of the *INSR* variants +/- exon11 (Supplementary Figure 2B). A vast body of literature points to activation of AMPK¹¹, inhibition of the mTOR signaling pathway¹², and decreased mitochondrial complex I activity^{13, 14} as major molecular targets of the drug. The first two working hypotheses were excluded because neither the specific AMPK agonist, AICAR, nor the specific mTOR

inhibitor, rapamycin, elicited changes in the alternative splicing of *INSR* exon11 (Figure 2A) in spite of activation of the AMPK/mTOR pathway leading to protein synthesis inhibition as measured by eEF2 phosphorylation (Supplementary Figure 2C). The role of AMPK was also excluded because the metformin effect was not altered when the drug was applied to VUB03_DM1 MPCs while the activity of AMPK was blocked with dorsomorphin (Figure 2B and Supplementary Figure 2D). Metformin inhibits mitochondrial complex I, as monitored by the accumulation of reactive oxygen species (ROS) in MPC VUB03_DM1 treated with 25mM Metformin. A similar result was obtained when applying 2 μ M of the specific mitochondrial complex I inhibitor rotenone (Supplementary Figure 3A)¹⁵ and this treatment also revealed itself to be instrumental in inducing the inclusion of exon 11 of *INSR* in a dose-dependent manner (Figure 2B). Rotenone is a potent blocker of mitochondrial respiratory chain complex I in contrast to metformin, known to only provoke partial inhibition¹⁶. Therefore, troglitazone was assayed, as it shares this limited effect with metformin while otherwise influencing very different signaling pathways^{16, 17}. Treatment of VUB03_DM1 MPCs with troglitazone confirmed the impact of this more limited mitochondrial complex I effect on *INSR* alternative splicing (Supplementary Figures 3B and 2C). The same effect was observed in response to resveratrol used for its ability to inhibit complex I and III of the mitochondrial respiratory chain¹⁸ (Supplementary Figures 3B and 2D). Altogether, this series of pharmacological experiments pointed to a metformin mechanism of action on alternative splicing that requires a partial inhibition of mitochondrial complex I, which is known to lead to enhanced levels of reactive oxygen and nitrogen species in the cell.

Molecular mechanisms of action of the drug on alternative splicing was explored on the basis of a recent whole genome transcriptome analysis that revealed down-regulation by metformin, but not rapamycin, of seven potential splice regulators¹⁹. Among them, RT-qPCR analysis revealed that expressions of *RBM4B*, *RBM5*, *RBM45* and *SRSF6* transcripts were not strongly

regulated while that of *RBM3*, *SRSF1* and *SFPQ* decreased with increasing concentrations of metformin (Figure 2C). Down-regulation of these three latter genes was also obtained with rotenone, troglitazone and resveratrol (Supplementary Figure 3E). A parallel, decrease in concentration of *RBM3*, *SRSF1* and *SFPQ* proteins was observed by Western blot analysis in response to metformin (Figure 2D). Independent knock-down by RNA interference of the genes encoding these three RNA-binding proteins in VUB03_DM1 MPCs differentially impacted *SERCA1* exon 22 alternative splicing. Knocking down *SRSF1* induced *SERCA1* exon 22 inclusion while *SFPQ* promoted its skipping. *RBM3* had no effect (Figure 2F and Supplementary Figure 3F). This altered equilibrium in a set of splice regulators governing the same alternative splice with opposite effects likely plays a role in the final protein isoform ratio recorded with the metformin treatment, rather than a specific effect of the drug on a single regulator. Changes observed in *INSR1* splicing of exon 11 were not statistically significant (Figure 2E), suggesting additional, yet unrevealed mechanisms.

To determine the biological effects of metformin *in vivo*, a DM1 mouse model having motor performance defects associated with the introduction of a mutant *DMPK* construct was used²⁰. DM1 mice were treated for a month with a daily dose of 60 or 180 mg/kg. Metformin induced no changes in either mutant *DMPK* expression or nuclear aggregates (Supplementary Figures 4A and 4B). In contrast, the treatment did impact alternative splicing, as shown by exon 5 inclusion being restored in the muscle-associated gene *m-titin* in the diaphragm (Figure 3A), a gene that exhibits the greatest splicing alterations in this mouse model (Supplementary Figure 4C). In parallel, a statistically significant recovery in motor skills was observed in the grip test after treatment (Figures 3B and 3C). This improvement was observed while the drug had no general metabolic effect on skeletal muscle, as verified by muscle weight and maximal tetanic force normalized to weight of the *tibialis anterior* (Supplementary Figures 4D and 4E).

We took the opportunity of patients currently being treated with metformin for type 2 diabetes mellitus, to check whether the drug affected alternative splicing at therapeutic doses in humans. In order to perform a clinical trial in which metformin would be temporarily replaced by another anti-diabetic drug, preliminary experiments were carried out in vitro on peripheral blood lymphocytes (PBLs) and sitagliptin was selected as it did not show any effect on alternative splicing of *INSR1* (Figures 4A and 4B). Fifteen diabetic patients who had been on a stable dose of metformin between 2.1 and 3g/day for more than a year were then involved in a study where metformin was replaced by sitagliptin for one month (NCT 01349387). It was checked that this change in treatment induced no difference in blood glucose levels. Despite wide physiological variability in *INSR* expression, a statistically significant shift in the transcript ratio towards inclusion of exon 11 was observed with metformin intake (Figure 4C). A statistically significant correlation was observed between the decreased *INSR* + exon 11 / - exon 11 ratio with sitagliptin intake and its increase after restarting metformin treatment (Figure 4D).

The primary result of this study is that metformin, at doses that are compatible with clinical use, impacts the alternative splicing of many genes having abnormal isoform ratios in cells from DM1 patients. These biological data, along with the motor improvement in a mouse disease model, pave the way for a clinical trial assessing the effects of metformin in patients with DM1 not only on defects in glucose consumption but more broadly on all symptoms associated to the disease.

Potentially as important, the action of metformin on alternative splicing has been shown to not depend on a pre-existing pathology and several other drugs that discretely affect cellular oxidative equilibrium had similar impacts. Central to these biological effects is a subset of members of the vast group of splice regulators¹. The demonstration that their transcriptional levels can be modulated by drugs opens a path that may have far-reaching clinical

applications. Affecting the expression of subsets of splice regulators may reveal itself to be instrumental for therapeutics applied to diseases that would benefit from exon skipping²¹. Even more broadly, altering the isoform ratio of certain proteins may be clinically relevant because the various protein isoforms have clearly differential roles. Along that line, it was interesting to note that alternative splicing of FAS exon 6, which gives rise to either a pro- or an anti-apoptotic protein^{22, 23}, was strongly affected by metformin in diabetic patients (Figure 4E).

Methods Summary

The wild type and mutated human embryonic stem cell lines VUB01 and VUB03_DM1 were differentiated in MPCs, transfected with Lipofectamine LTX or not with minigenes allowing the splicing of *TNNT2* and *CLCN1*, and then exposed during 48 hours with various chemical compounds. Total RNA from treated cells was extracted and submitted after reverse transcription to PCR and QPCR analysis to study the expressions of the splicing variant of the *INSR* exon11, *SERCA1* exon22, *TNNT2* exon5, and *CLCN1* exon 7A and the expression of *SRSF1*, *SRSF6*, *SFPQ*, *RBM3*, *RBM5*, *RBM4B*, *RBM45*. Splicing of *INSR* exon11, *SERCA1* exon22, *TNNT2* exon5 after treatment with metformin was also analyzed in human primary myoblasts coming from DM1 patients. Implication of *SRSF1*, *SFPQ* and *RBM3* in *INSR* exon 11 and *SERCA1* exon 22 splicings was investigated through their transient extinction after transfection of siRNA from Qiagen with Lipofectamine RNAiMax in MPCs VUB03_DM1 followed by RT-QPCR and RT-PCR analysis. Quantification of ROS production in treated VUB03_DM1 was performed using the ROS Detection kit from Molecular probes in 96 well plates on an Analyst GT after normalization by the cell number in wells determined on an Arrayscan after nuclei staining with dapi. Wild type and DMSXL mice²⁰ were treated

intraperitoneally for one month with saline or 60 and 180 mg/kg/day of metformin. After one month motor performance was assessed by a grip test and specific force quantified²⁰. Mice were sacrificed and TA dissected for foci detection by fish and analysis of transgenic DMPK expression and splicing defects analysis by RT-PCR. *INSR* exon11 splicing was analyzed by RT-QPCR in PBLs from patients affected or not with different monogenic diseases after 48 hours of treatment with 25mM metformin and 100µM troglitazone or in PBLs directly collected from diabetic non DM1 patients treated with metformin or with sitagliptin.

References

1. Singh, R. K. & Cooper, T. A. Pre-mRNA splicing in disease and therapeutics. *Trends Mol Med* 18, 472-82.
2. Mukherjee, N. et al. Integrative regulatory mapping indicates that the RNA-binding protein HuR couples pre-mRNA processing and mRNA stability. *Mol Cell* 43, 327-39.
3. Ip, J. Y. et al. Global analysis of alternative splicing during T-cell activation. *Rna* 13, 563-72 (2007).
4. Zacharias, D. A. & Strehler, E. E. Change in plasma membrane Ca²⁺-ATPase splice-variant expression in response to a rise in intracellular Ca²⁺. *Curr Biol* 6, 1642-52 (1996).
5. Marteyn, A. et al. Mutant human embryonic stem cells reveal neurite and synapse formation defects in type 1 myotonic dystrophy. *Cell Stem Cell* 8, 434-44.
6. Philips, A. V., Timchenko, L. T. & Cooper, T. A. Disruption of splicing regulated by a CUG-binding protein in myotonic dystrophy. *Science* 280, 737-41 (1998).
7. Charlet, B. N. et al. Loss of the muscle-specific chloride channel in type 1 myotonic dystrophy due to misregulated alternative splicing. *Mol Cell* 10, 45-53 (2002).
8. Savkur, R. S. et al. Insulin receptor splicing alteration in myotonic dystrophy type 2. *Am J Hum Genet* 74, 1309-13 (2004).
9. Kimura, T. et al. Altered mRNA splicing of the skeletal muscle ryanodine receptor and sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase in myotonic dystrophy type 1. *Hum Mol Genet* 14, 2189-200 (2005).
10. Kino, Y. et al. MBNL and CELF proteins regulate alternative splicing of the skeletal muscle chloride channel CLCN1. *Nucleic Acids Res* 37, 6477-90 (2009).
11. Zhou, G. et al. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J Clin Invest* 108, 1167-74 (2001).
12. Kalender, A. et al. Metformin, independent of AMPK, inhibits mTORC1 in a rag GTPase-dependent manner. *Cell Metab* 11, 390-401.
13. El-Mir, M. Y. et al. Dimethylbiguanide inhibits cell respiration via an indirect effect targeted on the respiratory chain complex I. *J Biol Chem* 275, 223-8 (2000).

14. Owen, M. R., Doran, E. & Halestrap, A. P. Evidence that metformin exerts its anti-diabetic effects through inhibition of complex I of the mitochondrial respiratory chain. *Biochem J* 348 Pt 3, 607-14 (2000).
15. Zou, M. H. et al. Activation of the AMP-activated protein kinase by the anti-diabetic drug metformin in vivo. Role of mitochondrial reactive nitrogen species. *J Biol Chem* 279, 43940-51 (2004).
16. Brunmair, B. et al. Thiazolidinediones, like metformin, inhibit respiratory complex I: a common mechanism contributing to their antidiabetic actions? *Diabetes* 53, 1052-9 (2004).
17. Nadanaciva, S., Dykens, J. A., Bernal, A., Capaldi, R. A. & Will, Y. Mitochondrial impairment by PPAR agonists and statins identified via immunocaptured OXPHOS complex activities and respiration. *Toxicol Appl Pharmacol* 223, 277-87 (2007).
18. Zini, R., Morin, C., Bertelli, A., Bertelli, A. A. & Tillement, J. P. Effects of resveratrol on the rat brain respiratory chain. *Drugs Exp Clin Res* 25, 87-97 (1999).
19. Larsson, O. et al. Distinct perturbation of the translatome by the antidiabetic drug metformin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 8977-82.
20. Huguet, A. et al. Molecular, physiological, and motor performance defects in DMSXL mice carrying >1,000 CTG repeats from the human DM1 locus. *PLoS Genet* 8, e1003043.
21. Stoilov, P., Lin, C. H., Damoiseaux, R., Nikolic, J. & Black, D. L. A high-throughput screening strategy identifies cardiotonic steroids as alternative splicing modulators. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 11218-23 (2008).
22. Cheng, J. et al. Protection from Fas-mediated apoptosis by a soluble form of the Fas molecule. *Science* 263, 1759-62 (1994).
23. Moore, M. J., Wang, Q., Kennedy, C. J. & Silver, P. A. An alternative splicing network links cell-cycle control to apoptosis. *Cell* 142, 625-36.

Acknowledgements We thank Dr C Martinat and L Aubry for help and discussions all along the project. The authors are indebted to Dr K Sermon for providing embryonic stem cell lines, Dr. NJ Webster and TA Cooper for *INSR* and *cTNT* minigenes, Dr M Gauthier for the purification of primary human myoblasts, L Suel for providing the RNA extraction protocol from mice muscle, Dr S Saker and the Genethon DNA and Cell Bank for processing patients' blood samples. This work was supported by INSERM, AFM-Telethon and an additional grant from the European Commission (STEM-HD, FP6),

Author Contributions D.L., J.G., and L.B., performed the experiments and analyzed the data in DM1_MPCs. J.G. performed the experiments in human PBL samples and analyzed the data. L.B. performed the molecular experiments of mice samples and analyzed the data. A.V.,

A.H., N.G. and G.T. performed the treatments of mice and the measure of the force. A.H. performed the grip tests in mice and the RNA-Fish analysis of muscle samples. G.G. provided the DMSXL mice. O.J. organized the collection of PBLs from diabetic patients and M.H.P performed blood sampling. G.C. conducted the clinical trial NCT 01349387 in diabetic patients. X.N. developed the quantitative PCR assay for *INSR* splicing analysis. S.BI. provided primers and antibody for SRSF1 expression analysis. G.B. provided the human PBL from patients affected or not by a monogenic disease for *in vitro* study. D.F. provided the human primary myoblasts. G.P. developed the MPC cellular model. D.L., S.Ba. and M.P. designed the project. S.Ba. and M.P. supervised and wrote the manuscript. All authors discussed and contributed to the manuscript.

Author Information Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints. The authors declare no competing financial interests. Readers are welcome to comment on the online version of the paper. Correspondence and requests for materials should be addressed to S.Ba. (sbaghdoyan@istem.fr).

Figure Legends

Figure 1 Metformin alleviates splicing defects of DM1 biomarkers. **a, b)** Daily metformin treatment for 48 hours promotes inclusion of *INSR* exon 11 in DM1 affected MPCs and decreases exclusion of *SERCA1* exon 22. CTL: wild type MPCs. **c,d)** Daily metformin treatment also reduces inclusion of exogenous *TNNT2* exon 5 and *clcn1* exon 7a in DM1 MPCs transfected with corresponding minigenes as assessed by RT-PCR analysis. NT: not transfected. hcTNT and hcTNTmCAG correspond to the *TNNT2* exon 5 minigene wild type or mutated in the cUGBP1 response element. **e)** Metformin effect at 25 mM on splicing of

INSR exon 11, *SERCA1* exon 22 and *TNNT2* exon 5 is confirmed by RT-PCR analysis in wild type and DM1 myoblasts treated for two days. CTL: wild type MPCs. (n=3) Error bars denote SEM. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001.

Figure 2 Metformin controls splicing of *INSR* exon 11 and *SERCA1* exon 22 by inhibiting the mitochondrial respiratory chain, independently of the AMPK and mTOR pathways.

a) DM1 MPCs were treated for two days with rapamycin or AICAR and there was no effect on the percentage of *INSR* exon 11 inclusion, which is in contrast to metformin, as analyzed by RT-QPCR. **b)** Pretreatment of DM1 MPCs with the AMPK inhibitor, dorsomorphin, at 1 μ M does not prevent metformin from promoting *INSR* exon 11 inclusion as also observed after a daily treatment with rotenone **c)** RT-PCR analysis of DM1 MPCs treated daily for 48 hours with metformin reveals a selective downregulation of *RBM3*, *SRSF1* and *SFPQ* expression. **d)** Confirmation by western blot analysis of *RBM3*, *SRSF1* and *SFPQ* expression after metformin treatment. **e, f)** siRNA mediated downregulation of *RBM3*, *SRSF1* and *SFPQ* RNA-binding proteins in DM1 MPCs shows that only *SRSF1* and *SFPQ* affect both *INSR* exon 11 and *SERCA1* exon 22 splicing. (n>3) Error bars denote SEM. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001.

Figure 3 Metformin administration in DMSXL mice alleviates the splicing defect in *m-titin* exon5 and improves muscle performance. a) *m-titin* splicing defect quantified by RT-PCR in the diaphragm of DMSXL mice compared to wild type is restored by injecting 180 mg/kg/day of metformin for one month. b) Comparison of the strength of DMSXL and wild type mice, quantified by a grip test, before and at the end of one month of metformin treatment shows improved strength in the mutant mice. c) Individual mouse response in the grip test with n=8 mice in each group. *P<0.05, **P<0.01, *P<0.001.**

Figure 4 Regulation of alternative splicing by therapeutic doses of metformin can be followed *in vivo* in patients on *INSR* exon 11 and *FAS* exon 6. **a)** *In vitro* treatment of peripheral blood lymphocytes (PBL) from patients, non mutated or affected of various monogenic diseases, for 48 hours with 25mM metformin alone or in combination with 100 μ M troglitazone or with 100 μ M sitagliptin shows that the *INSR* + exon11 / - exon11 ratio is impacted by metformin or metformin plus troglitazone but not sitagliptin, based on RT-QPCR analysis. **b)** Sitagliptin activity was verified through its ability to inhibit DPPIV enzyme activity. **c)** The *INSR* + exon11 / - exon11 ratio was monitored by RT-qPCR in PBL from diabetic patients treated with metformin (V0), with sitagliptin instead of metformin for one month (V1) and one month after restarting metformin treatment. **d)** Analysis of patient response to the various treatments monitored by the V2/V1 and V0/V1 ratios with linear regression ($P=0.0078$), indicating that *INSR* exon 11 exclusion tends to increase in the presence of sitagliptin and decrease in the presence of metformin. **e)** The same samples were also analyzed by RT-PCR to quantify the alternative splicing of *FAS* exon 6, which is also regulated by metformin (n=15 patients in each group). * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

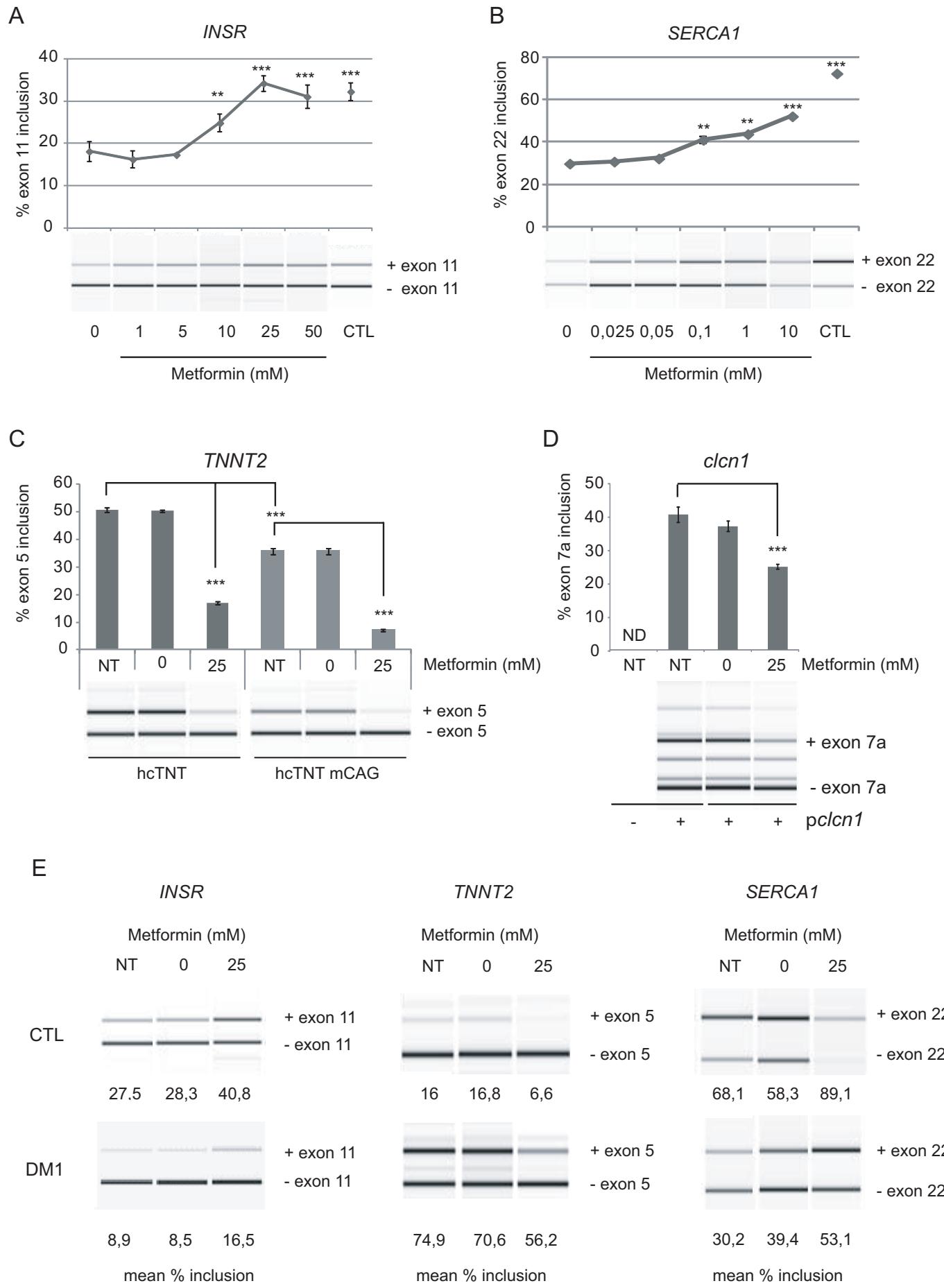


Figure 1

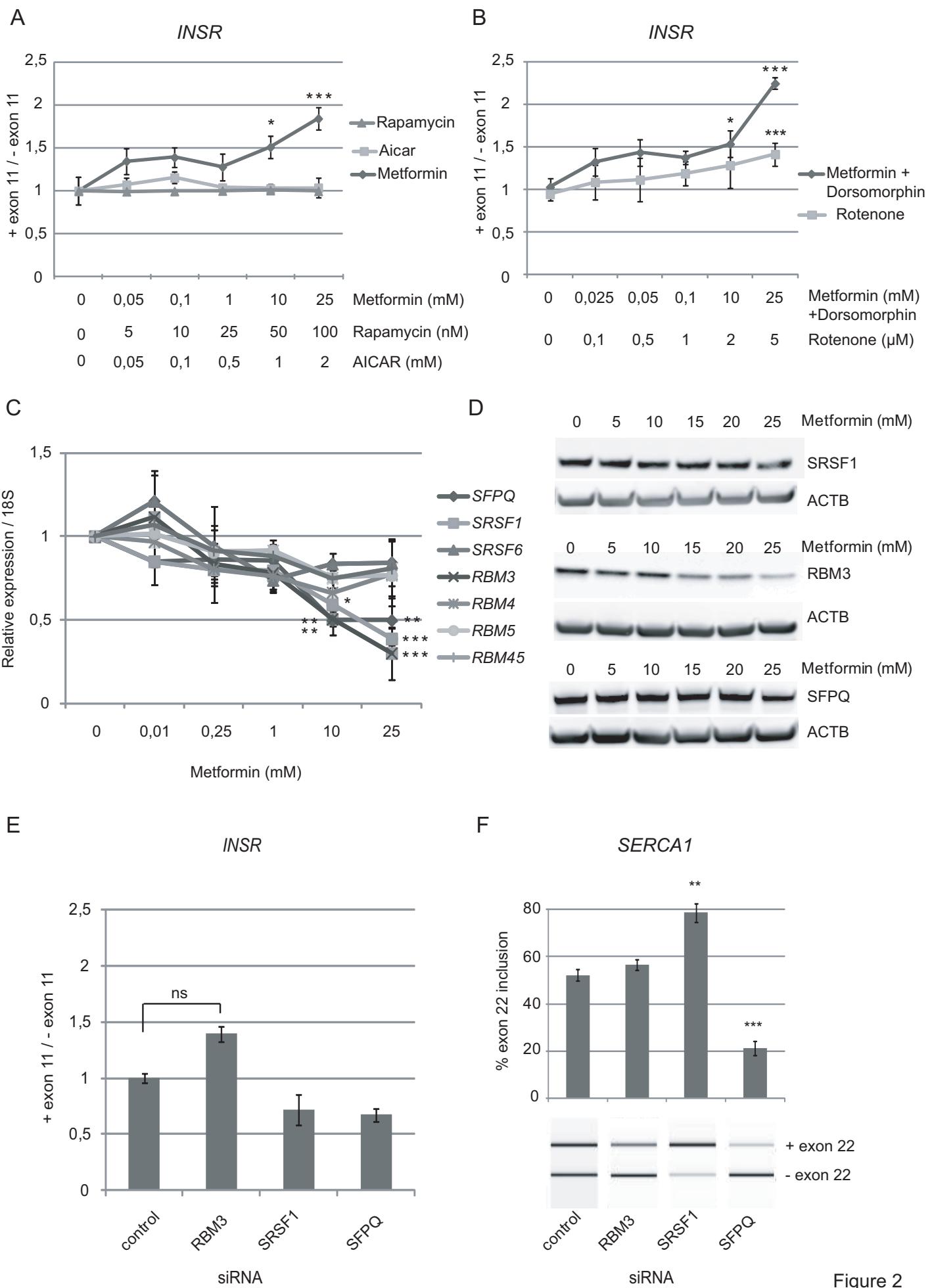
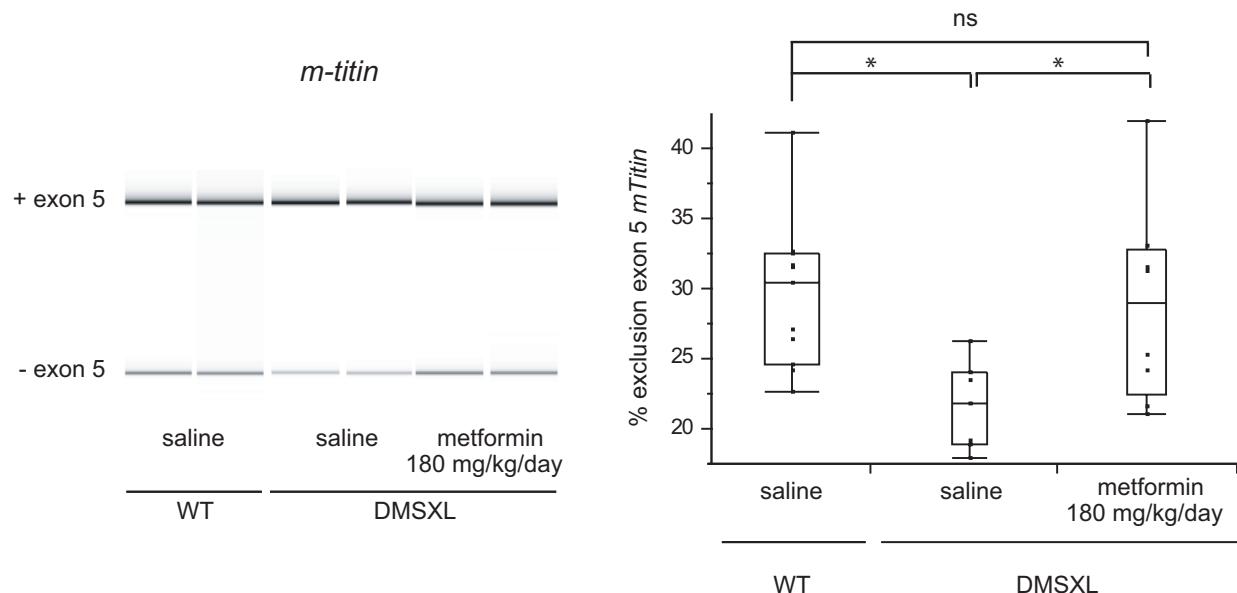
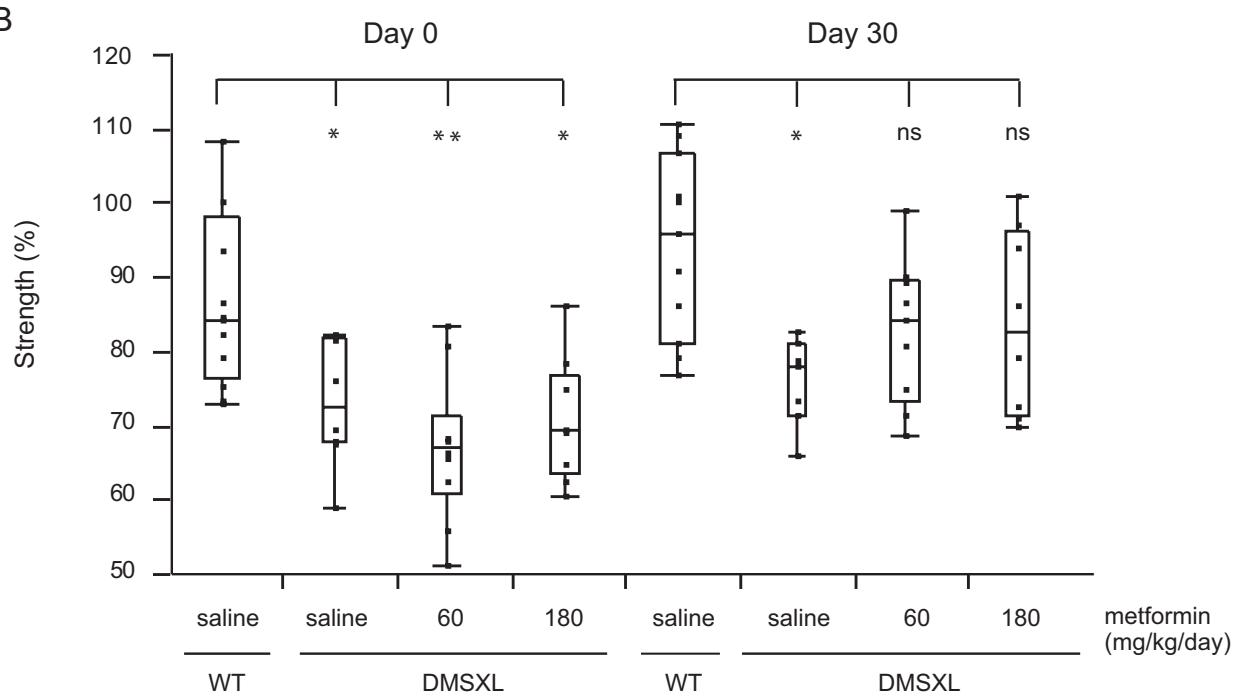


Figure 2

A



B



C

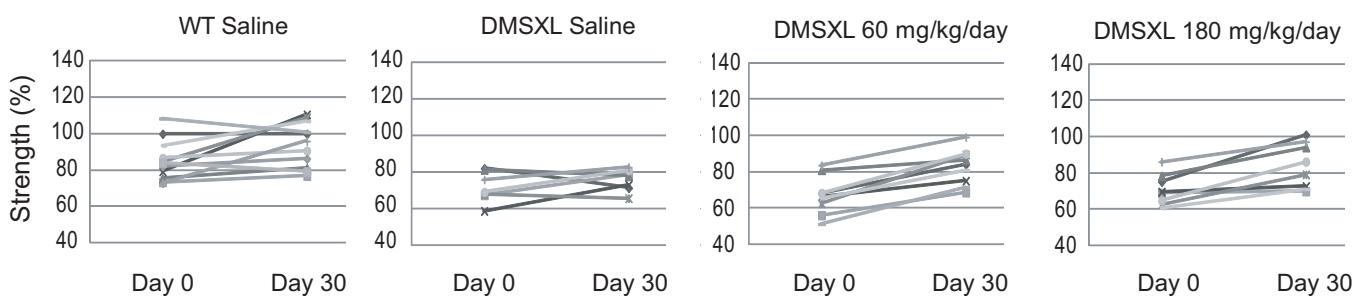


Figure 3

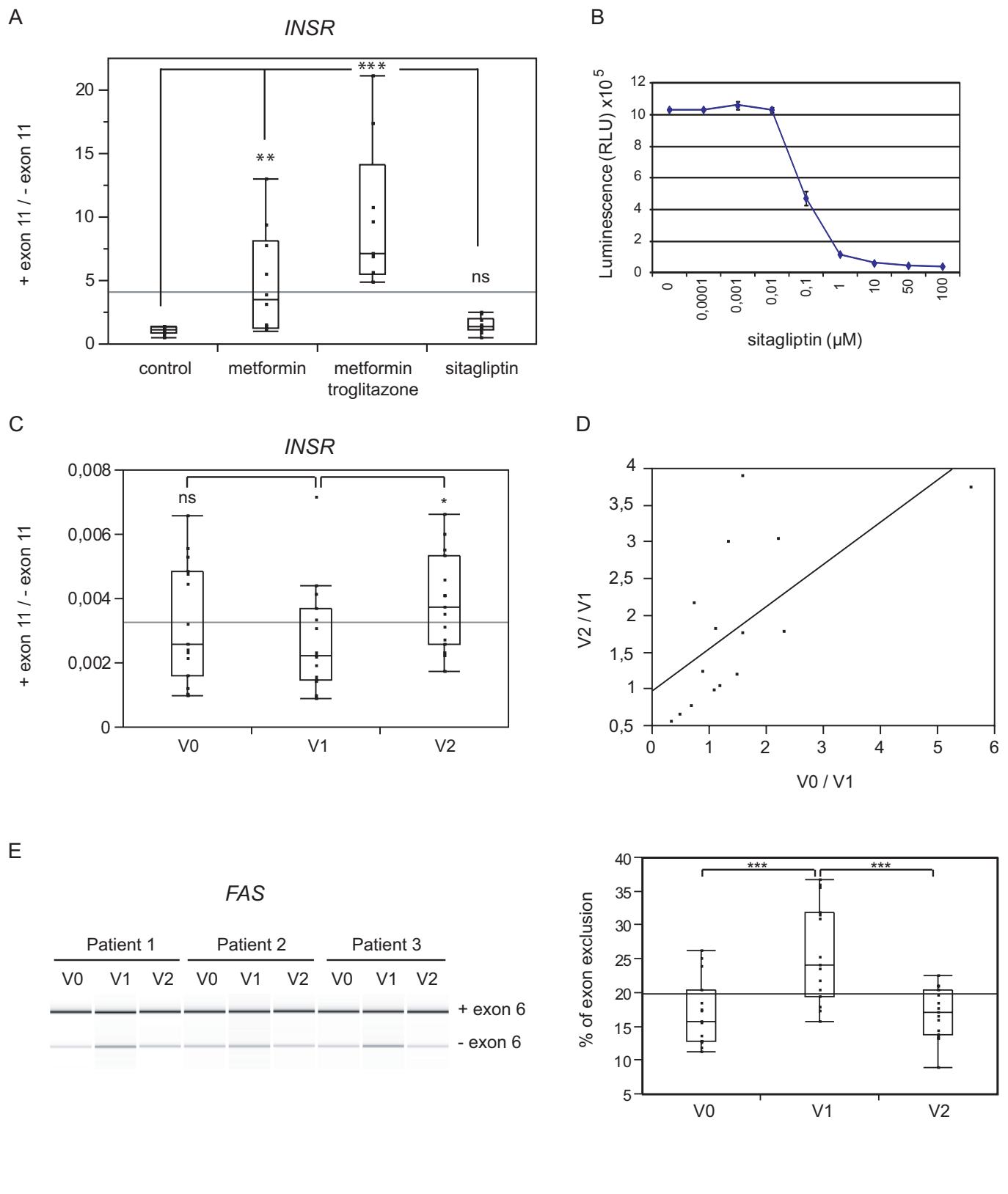
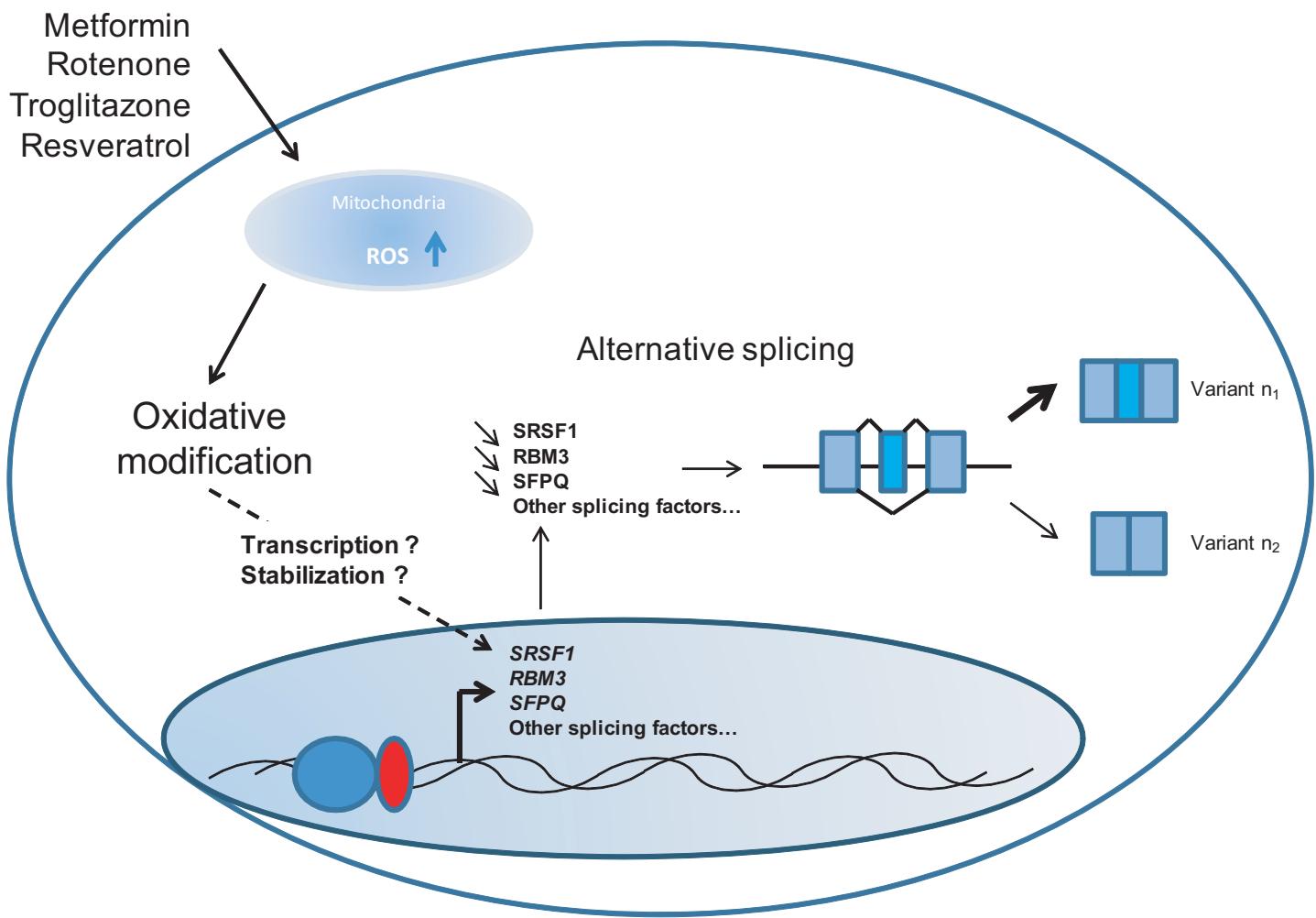
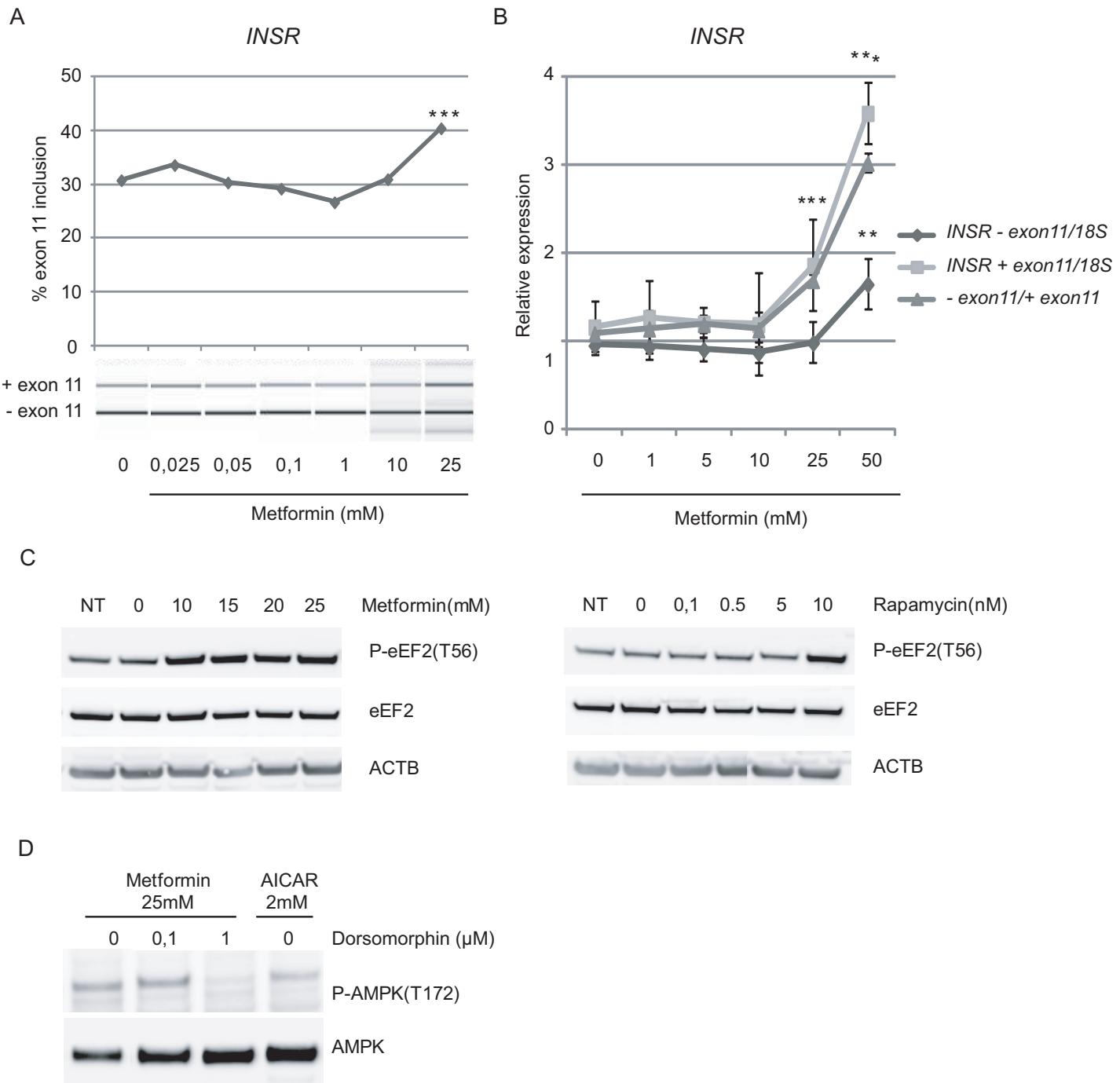


Figure 4

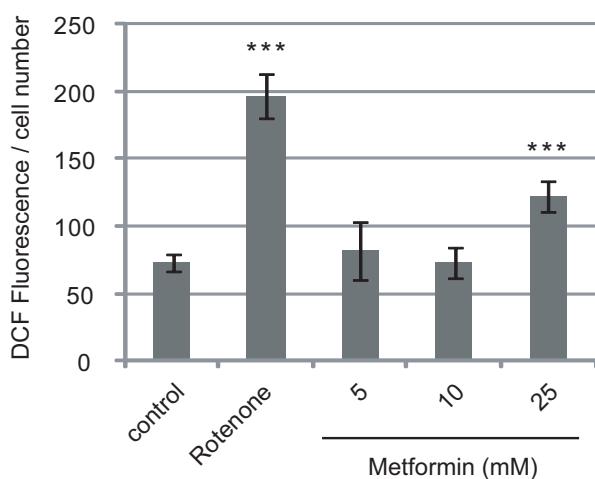


Supplementary Figure 1. Schematic model describing the impact of Metformin, Troglitazone, Rotenone and Resveratrol on alternative splicing through the induction of changes in oxygen and nitrogen species levels within the cell.

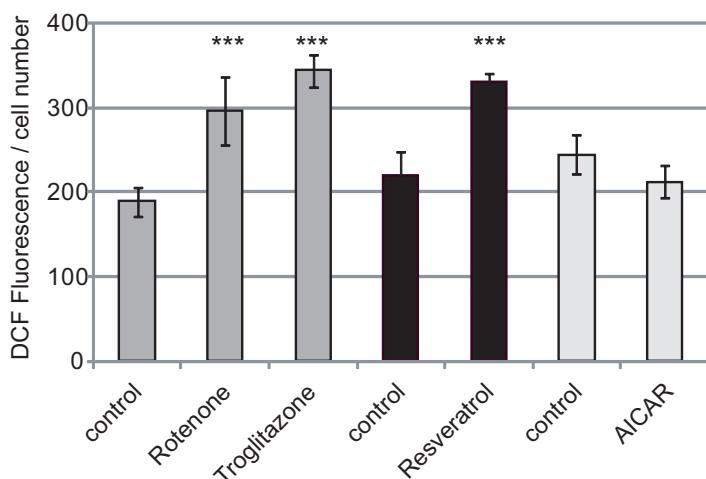


Supplementary Figure 2. Characterization of metformin, rapamycin and dorsomorphin effects. **a)** Daily metformin treatment for 48 hours promotes inclusion of *INSR* exon 11 in control MPCs. **b)** RT-qPCR analysis of *INSR* + exon 11, *INSR* - exon 11 and ratio *INSR* + exon 11 / - exon 11 expressions in response to a daily metformin treatment for 48 hours of DM1 MPCs. **c)** Metformin and rapamycin treatments induced phosphorylation of eEF2, which is known for their inhibitory effect on translation elongation, as assessed by western blot. **d)** Treatment with 25 mM metformin or 2 mM AICAR activates the phosphorylation of AMPK on T172 and can be abolished in the presence of 1 μ M dorsomorphin, as analyzed by western blot. (n=3) Error bars denote SEM. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001.

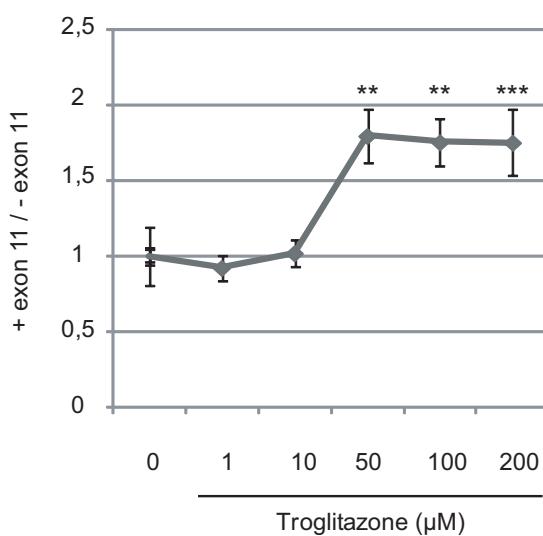
A



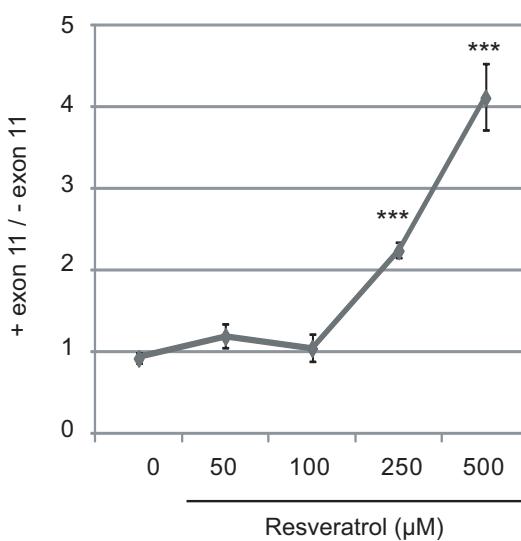
B



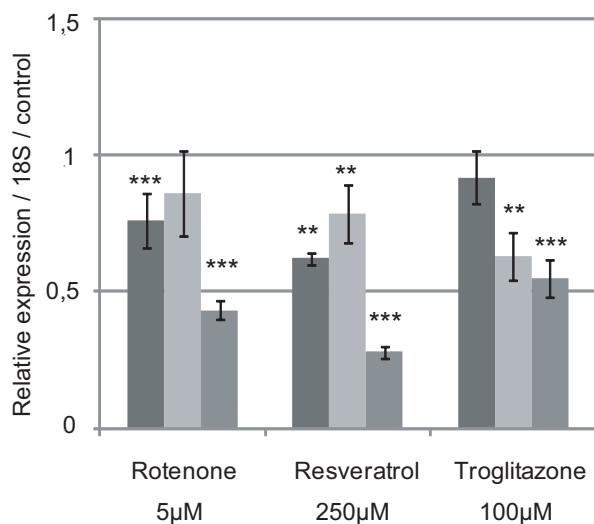
C

INSR

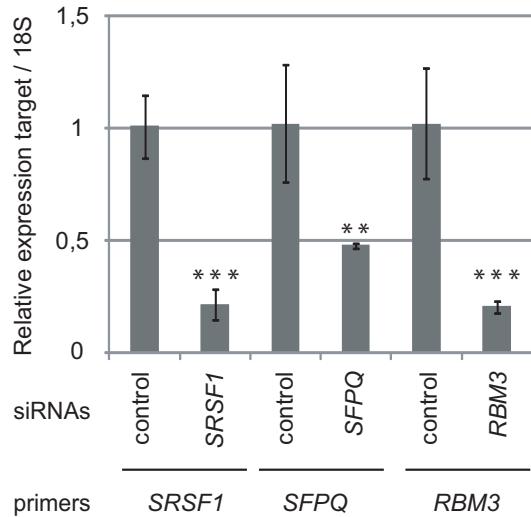
D

INSR

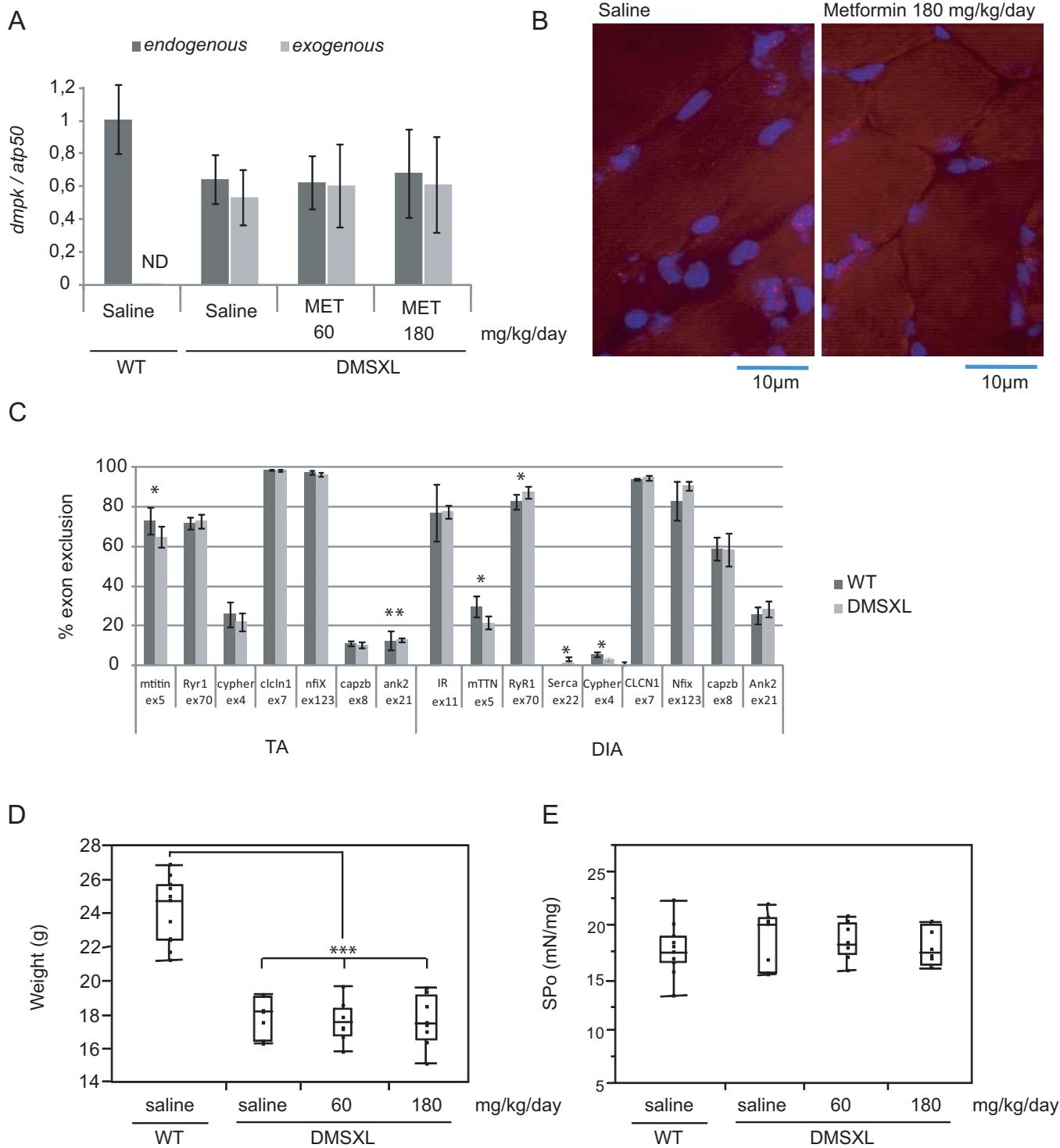
E



F



Supplementary Figure 3. Functional analysis of metformin effects on mitochondrial respiratory chain and RNA-bindig protein expressions. a,b) DM1 MPCs were treated with 2μM rotenone, dose range of metformin, 100μM troglitazone and 500μM resveratrol that are all inducing production of reactive oxygen species, in contrast to 2mM AICAR, 24 hours (a) and 6 hours (b) later as quantified by DCF fluorescence after normalization on cell number. c, d) Impact on *INSR* exon 11 inclusion of DM1 MPCs treated for one day with dose range of troglitazone and resveratrol analyzed by RT-qPCR. e) RT-qPCR analysis of *SRSF1*, *RBM3* and *SFPQ* expressions in DM1 MPCs treated one day with 2μM rotenone, 500μM resveratrol and 100μM troglitazone for 24 hours. f) RT-qPCR analysis of *SRSF1*, *RBM3* and *SFPQ* residual expressions in DM1 MPCs two days after their knock-down by siRNA transfection. (n=3) Error bars denote SEM. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001.



Supplementary Figure 4. Characterization of wild type and DMSXL mice phenotypes. **a)** RT-qPCR analysis of endogenous *dmpk* and exogenous transgenic *DMPK* expression in *tibialis anterior* from wild type and DMSXL mice. **b)** Staining of intranuclear aggregates by RNA-FISH in DMSXL mice treated with saline or 180 mg/kg/day of metformin for one month shows that metformin treatment does not impact foci biogenesis in *tibialis anterior*. **c)** Comparative profiling of DM1 associated splicing defects between wild type and DMSXL mice at four months in *tibialis anterior* and *diaphragm* muscles. **d)** DMSXL mice showed a weight loss that was not reversed by one month of metformin treatment. **e)** No significant decrease in specific maximum force (sPo) was observed after muscle mass normalization between wild type and DMSXL mice or in mutant mice after treatment with metformin (n=8 mice in each group). Error bars denote SEM. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001.

Supplementary Methods

Primers and siRNA sequences from human and mouse genes are listed in Table 1 and Table 2.

Materials: Sitagliptin was obtained from Januvia 100mg tablets (MSD Merck Sharp & Dohme Ltd). Metformin, AICAR, rotenone, resveratrol and rapamycin were obtained from Sigma. Troglitazone was obtained from Tocris. Dorsomorphin dihydrochloride was purchased from R&D systems. Primary antibodies used for western blot were raised against phospho-AMPK α ^{T172} (2535; 1:1000; Cell Signaling Technology); AMPK α (AHO1332; 1:500; Invitrogen); phospho-eEF2^{T56} (2331S; 1:1000; Ozyme); eEF2 (23332S; 1:1000; Ozyme); RBM3 (ab134946; 1:1000; Abcam); SRSF1 (LSB2340, clinisciences), SFPQ (ab117617, Abcam). β -actin-peroxidase (A3854; 1:50000; Sigma-Aldrich). Horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies used for western blot were goat anti-mouse IgG-HRP or goat anti-rabbit IgG-HRP (1:10000; Amersham Bioscience, GE Healthcare, Saclay, France).

Cells culture: MPCs were generated by differentiation of hES cells according to the protocol described previously by Mateizel *et al*²⁴ using the cell lines VUB03_DM1 (XX, passages 66-67) carrying the DM1 mutation (1330 CTG repeats) and the VUB01_CTL (XY, passage 83)²⁵ from the Department of Embryology and Genetics of the Vrije Universiteit, AZ-VUB laboratory, Brussels, Belgium. MPCs were cultured on 0.1% gelatin-coated flasks (Sigma-Aldrich) using Knockout DMEM medium (Invitrogen) supplemented with 20% fetal bovine serum (Eurobio), 1 mM Glutamax (Invitrogen), 1% non-essential amino-acids (Invitrogen) and 0.1% β -mercaptoethanol (Invitrogen). Wild type and DM1 (800 CTG repeats) human myoblasts provided by Dr. Denis Furling were cultured on 0.1% gelatin-coated flasks and plates using DMEM-F12 + glutamax medium (Invitrogen) supplemented with 20% fetal bovine serum (Eurobio). Freshly isolated wild type or and mutated peripheral blood

lymphocytes (PBL), provided by Dr. Guillaume Bassez, were obtained from the Généthon DNA and Cells Bank (Evry, France). Cells were thawed and cultured in RPMI medium supplemented with 20% of fetal bovine serum (Eurobio) and 1% penicillin-streptomycin (Invitrogen) according to cell bank instructions. Chemical treatments were performed once a day for two days.

Transfection of siRNAs and DNA constructs: MPCs were transfected in 24 well plates with 5 pmol of predesigned siRNAs (Qiagen) and 2.5 μ L of Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen). Analyses were performed 48 hours after transfection. The pSG minigene used to analyze the splicing of exogenous *INSR* was kindly provided by Dr. NJ Webster (Medical Research Service, San Diego, CA, USA) whereas the RTB300 (hcTNT) and R300TA (hcTNTmCAG) minigenes used to analyze the splicing of exogenous chicken and human *cTNT* transcripts were kindly provided by Professor TA Cooper. The minigene used to study *Clcn1* exon 7 splicing was constructed as described by Zhou *et al*¹⁰. For plasmid transfection, cells were transfected in 24-well plates with 600 ng of plasmid, 0.6 μ L of PLUS (Invitrogen) and 1.5 μ L Lipofectamine LTX (Invitrogen).

Gene expression analysis by RT-PCR and RT-quantitative PCR: Total RNA from cultured cells was isolated using the RNeasy Micro/Mini kit (Qiagen) and reverse transcribed using random hexamers and Superscript III Reverse Transcriptase kit (Invitrogen). PCR amplification of endogenous or exogenous genes was carried out with recombinant Taq DNA polymerase (Invitrogen). The amplification was performed using a first step at 94°C for 3 min followed by 30 cycles of 45 s at 94 °C, 30 s at 55 °C, 30 s at 72 °C, and finished with a final 10 min extension at 72 °C. The PCR products were quantified using the Bioanalyzer 2100 and DNA 1000 LabChip kit (Agilent). Quantitative PCR reactions were carried out in 384-well

plates using 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) with Power SybrGreen 2x Master Mix (Applied Biosystems) or with TaqMan gene expression assays using the TaqMan Gene Expression Master Mix (Applied Biosystem) for the *INSR* transcripts +/- exon 11.

Protein extraction and western blot analysis: Cells were homogenized in RIPA buffer (Sigma-Aldrich) containing 1% protease inhibitors (Sigma-Aldrich) and 10% phosphatase inhibitors (Roche). After electrophoresis on 4-12% Nu-PAGE® Bis-Tris gels (Invitrogen) under reducing conditions, protein extracts were transferred to nitrocellulose membranes (Invitrogen), blocked with PBS containing 0.1% Tween-20 and 5% BSA or 5% nonfat dry milk and incubated overnight with the appropriate antibody in PBS containing 0.1% Tween-20 and 5% BSA or 5% nonfat dry milk. Membranes were then incubated with the corresponding secondary antibody and immunoreactive protein bands were detected by ECL Plus detection reagents (Amersham Bioscience) on an ImageQuant CDD camera (GE Healthcare, Saclay, France).

Determination of reactive oxygen species: Generation of reactive oxygen species (ROS) was assessed using the ROS Detection kit from Molecular probes (C6827). Cell monolayers in 96 well plates were incubated with 10 μ M chloromethyl-H₂DCFDA for one hour, rinsed with culture medium and then treated with various chemical treatments for 24 hours. Fluorescence was monitored one day after on an Analyst GT (Molecular Device). Cells number after treatment was determined on an Arrayscan (Cellomics, ThermoFischer) after fixation with 4% paraformaldehyde and nuclei staining with Hoechst. Fluorescence emission was finally normalized on the cell number for each condition.

Measurement of sitagliptin activity and cell viability: Sitagliptin activity was measured using the luminescent DPPIV-Glo™ Protease Assay (Promega) and viability of lymphocytes after treatment was monitored with the CellTiter-Glo® assay (Promega).

DMSXL mice treatment and analysis: DMSXL mice were generated as described previously²⁰. Mouse handling and experimental procedures were conducted at a test facility (Genethon, Evy, France) that was certified by the French National Authorities as being Good Laboratory Practice compliant. Three-month old female DMSXL mice were injected with metformin or vehicle (PBS) once a day for one month. Metformin was administered intraperitoneally at doses of 60 and 180 mg/kg/day. Mice were assessed for grip strength performance before and at the end of the treatment using a commercial grip strength dynamometer (Bioseb, Chaville, France) as previously described²⁶. At day 30, neuromuscular function was evaluated by measuring *in situ* muscle contraction, as previously described²⁷. The absolute maximal force (P0) was normalized to the muscle mass (m) to estimate the specific maximal force (sP0). Finally, the mice were killed and the *diaphragm* and *tibialis anterior* muscles dissected for splicing analysis as described. Fish analysis of foci content was performed as described previously²⁰.

Statistical analysis: Values are reported as mean and SEM. The data were processed using JMP9 software (SAS, Cary, NC, USA). Statistical differences were determined with an analysis of variance followed by post-hoc comparison with Tukey-Kramer's test for experiments with mice and patients and Dunnett's tests for chemical treatments. Differences between groups were considered significant when $P < 0.05$.

24. Mateizel, I. et al. Derivation of human embryonic stem cell lines from embryos obtained after IVF and after PGD for monogenic disorders. *Hum Reprod* 21, 503-11 (2006).
25. Mateizel, I. et al. Efficient differentiation of human embryonic stem cells into a homogeneous population of osteoprogenitor-like cells. *Reprod Biomed Online* 16, 741-53 (2008).
26. Vignaud, A. et al. Progressive skeletal muscle weakness in transgenic mice expressing CTG expansions is associated with the activation of the ubiquitin-proteasome pathway. *Neuromuscul Disord* 20, 319-25.
27. Vignaud, A. et al. Diabetes provides an unfavorable environment for muscle mass and function after muscle injury in mice. *Pathobiology* 74, 291-300 (2007).

Supplemental Table 1. Human primers and siRNA sequences

Gene Name	Purpose	Primers, probes	Sequences (5'-3') or reference
18S	qPCR	Forward	CGATGCGGCGGCGTTATT
		Reverse	CCTGGTGGTGCCCTCCGT
ACTB	qPCR	Forward	GGACTTCGAGCAAGAGATGG
		Reverse	AGCACTGTGTTGGCGTACAG
RBM3	qPCR	Forward	CCACTTCAGCAGTTTCGGAC
		Reverse	TCATGGCTCTCATGGCACT
	RNAi	siRNA	ACCGACGAGCAGGCACTGGAA
RBM4B	qPCR	Forward	ACGTGGAAGCCAGCAAGAAT
		Reverse	TTGGCTCGAAGCTTGGTT
RBM5	qPCR	Forward	ACGAGCAACCCACCAAAGAT
		Reverse	GCCTCAATGGGAGCCGTAAT
RBM45	qPCR	Forward	AGCAAGTACACACCTGAGTCG
		Reverse	TCCTGGATGTCGCCAAAGG
SRSF1	qPCR	Forward	CTCATCATTCCCCAGAAACC
		Reverse	CCCTCTCCAATCCAAACCTT
	RNAi	siRNA	CTGGACTGCCTCCAAGTGGAA
SFPQ	qPCR	Forward	AGACAGCTTCGAGTCGCTT
		Reverse	TACGAACAGAAAGGGCAGCA
	RNAi	siRNA	AATATGGAGAACCAAGGAGAAG

Gene Name	Purpose	Primers, probes	Sequences (5'-3') or reference
<i>INSR</i> (endogenous)	RT-PCR	Forward	CCAAAGACAGACTCTCAGAT
		Reverse	AACATGCCAAGGGACCT
	qPCR (Taqman assay for alternative splicing)	Forward	GGATTACCTGCACAACGTGGTT
		Reverse	ACGGCCACCGTCACATTC
		INSR-A probe	CGTCCCCAGGCCAT (FAM)
		INSR-B probe	CGAGGACCCCTAGGCC (VIC)
	RT-PCR	Forward	TAATACGACTCACTATAGGGC
<i>INSR</i> (exogenous)		Reverse	GCTGCAATAAACAAAGTTCTGC
<i>TNNT2</i>	RT-PCR	Forward	CAAAGTGGAGGACCCAGTACC
		Reverse	GCGCATGAACTCCTTGATGAC
<i>SERCA1</i>	RT-PCR	Forward	GATGATCTTCAAGCTCCGGGC
		Reverse	CAGCTCTGCCTGAAGATGTG
<i>Clcn1</i> (exogenous)	Cloning	Forward	GGATCCGGTCCCTTGTTCACATGCCAGC
		Reverse	GTCGACCTCCAAGTGGTGTCCAAAACAGC
	RT-PCR	Forward	GGTCCCTTGTTCACATGCCAGC
		Reverse	CTCCAAGTGGTGTCCAAAACAGC
<i>DMPK</i>	qPCR	Forward	GGAGAGGGACGTGTTG
		Reverse	CTTGCTCAGCAGTGTCA
<i>FAS</i>	RT-PCR	Forward	TGGAATCATCAAGGAATGCAC
		Reverse	GGAGATTGAGAACCTTGG

Supplemental Table 2. Mouse primers sequences

Gene Name	Purpose	Splicing	Sequences (5'-3') or reference
<i>atp50</i>	qPCR	<i>no</i>	CTATGCAACCGCCCTGTACT
			GATGATACCCCTGGGTGTTGC
<i>dmpk</i>	qPCR	<i>no</i>	GGAAGAAAGGGATGTATTAA
			CTCAGCAGCGTTAGCA
<i>m-titin</i>	RT-PCR	exon 5	GTGTGAGTCGCTCCAGAAACG
			CCACCACAGGACCATGTTATTTC
<i>ryr1</i>	RT-PCR	exon 70	GACAATAAGAGCAAAATGGC
			CTTGGTGCGTTCCTGATCTG
<i>cypher</i>	RT-PCR	exon 4	AGTCCCCGCTGCCAGTG
			AGAGGCGCTGTCCACCG
<i>clcn1</i>	RT-PCR	exon 70	GCTGCTGTCCTCAGCAAGTT
			CTGAATGTGGCTGCAAAGAA
<i>nfix</i>	RT-PCR	exon 123	TCGACGACAGTGAGATGGAG
			CAAACTCCTTCAGCGAGTCC
<i>capzb</i>	RT-PCR	exon 8	TCCGAAGCACGCTGAATGAGA
			GATGCAAACGTGTTATGTGACC
<i>ank2</i>	RT-PCR	exon 21	GAACGTGGTTCTCCGATTGT
			CGTCTCTGGGGGTATGTCAG
<i>insR</i>	RT-PCR	exon 11	GAGGATTACCTGCACAACG
			CACAATGGTAGAGGGAGACG
<i>serca1</i>	RT-PCR	exon 22	GCTCATGGCCTCAAGATCTCAC
			GGGTCAGTGCCTCAGCTTG

Références bibliographiques

- **Aaronson RP, and Blobel G** (1975). Isolation of nuclear pore complexes in association with a lamina. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72, 1007-1011.
- **Aasen T, Raya A, Barrero MJ, Garreta E, Consiglio A, Gonzalez F, Vassena R, Bilic J, Pekarik V, Tiscornia G, Edel M, Boue S, and Izpisua Belmonte JC** (2008). Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes. *Nat Biotechnol* 26, 1276-1284.
- **Aebi U, Cohn J, Buhle L, and Gerace L** (1986). The nuclear lamina is a meshwork of intermediate-type filaments. *Nature* 323, 560-564.
- **Agarwal AK, and Garg A** (2006). Genetic basis of lipodystrophies and management of metabolic complications. *Annu Rev Med* 57, 297-311.
- **Agarwal S, Loh YH, McLoughlin EM, Huang J, Park IH, Miller JD, Huo H, Okuka M, Dos Reis RM, Loewer S, Ng HH, Keefe DL, Goldman FD, Klingelhutz AJ, Liu L, and Daley GQ** (2010a). Telomere elongation in induced pluripotent stem cells from dyskeratosis congenita patients. *Nature* 464, 292-296.
- **Agarwal US, Sitaraman S, Mehta S, and Panse G** (2010b). Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Indian J Dermatol Venereol Leprol* 76, 591.
- **Al-Haggar M, Madej-Pilarczyk A, Kozlowski L, Bujnicki JM, Yahia S, Abdel-Hadi D, Shams A, Ahmad N, Hamed S, and Puzianowska-Kuznicka M** (2012). A novel homozygous p.Arg527Leu LMNA mutation in two unrelated Egyptian families causes overlapping mandibuloacral dysplasia and progeria syndrome. *Eur J Hum Genet* 20, 1134-1140.
- **Al-Shareef MA, Sanneh AF, and Aljoudi AS** (2012). Clinical effect of Metformin in children and adolescents with type 2 diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis. *J Family Community Med* 19, 68-73.
- **Allsopp R** (2012). Telomere length and iPSC re-programming: survival of the longest. *Cell Res* 22, 614-615.
- **Allsopp RC, Vaziri H, Patterson C, Goldstein S, Younglai EV, Futcher AB, Greider CW, and Harley CB** (1992). Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 10114-10118.
- **Ambasudhan R, Talantova M, Coleman R, Yuan X, Zhu S, Lipton SA, and Ding S** (2011). Direct reprogramming of adult human fibroblasts to functional neurons under defined conditions. *Cell Stem Cell* 9, 113-118.
- **Andres V, and Gonzalez JM** (2009). Role of A-type lamins in signaling, transcription, and chromatin organization. *J Cell Biol* 187, 945-957.
- **Anson BD, Kolaja KL, and Kamp TJ** (2011). Opportunities for use of human iPS cells in predictive toxicology. *Clin Pharmacol Ther* 89, 754-758.
- **Anstee DJ, Gampel A, and Toye AM** (2012). Ex-vivo generation of human red cells for transfusion. *Curr Opin Hematol* 19, 163-169.
- **Arai T, and Yamashita M** (2002). An abnormal dentition in progeria. *Paediatr Anaesth* 12, 287.
- **Aubry L, Bugi A, Lefort N, Rousseau F, Peschanski M, and Perrier AL** (2008). Striatal progenitors derived from human ES cells mature into DARPP32 neurons in vitro and in quinolinic acid-lesioned rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 16707-16712.
- **Bae D, Mondragon-Teran P, Hernandez D, Ruban L, Mason C, Bhattacharya SS, and Veraitch FS** (2012). Hypoxia enhances the generation of retinal progenitor cells from human induced pluripotent and embryonic stem cells. *Stem Cells Dev* 21, 1344-1355.
- **Balajee AS, May A, and Bohr VA** (1998). Fine structural analysis of DNA repair in mammalian cells. *Mutat Res* 404, 3-11.
- **Baur JA** (2010). Biochemical effects of SIRT1 activators. *Biochim Biophys Acta* 1804, 1626-1634.

- **Baur JA, Pearson KJ, Price NL, Jamieson HA, Lerin C, Kalra A, Prabhu VV, Allard JS, Lopez-Lluch G, Lewis K, Pistell PJ, Poosala S, Becker KG, Boss O, Gwinn D, Wang M, Ramaswamy S, Fishbein KW, Spencer RG, Lakatta EG, Le Couteur D, Shaw RJ, Navas P, Puigserver P, Ingram DK, de Cabo R, and Sinclair DA** (2006). Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature* 444, 337-342.
- **Beaudouin J, Gerlich D, Daigle N, Eils R, and Ellenberg J** (2002). Nuclear envelope breakdown proceeds by microtubule-induced tearing of the lamina. *Cell* 108, 83-96.
- **Beck LA, Hosick TJ, and Sinensky M** (1990). Isoprenylation is required for the processing of the lamin A precursor. *J Cell Biol* 110, 1489-1499.
- **Bello M, Martinez-Aranchuria M, and Correa-Basurto J** (2013). Automated docking for novel drug discovery. *Expert Opin Drug Discov* 8, 821-834.
- **Ben-Harush K, Wiesel N, Frenkiel-Krispin D, Moeller D, Soreq E, Aebi U, Herrmann H, Gruenbaum Y, and Medalia O** (2009). The supramolecular organization of the *C. elegans* nuclear lamin filament. *J Mol Biol* 386, 1392-1402.
- **Benavente R, Krohne G, and Franke WW** (1985). Cell type-specific expression of nuclear lamina proteins during development of *Xenopus laevis*. *Cell* 41, 177-190.
- **Benedetti S, Bertini E, Iannaccone S, Angelini C, Trisciani M, Toniolo D, Sferrazza B, Carrera P, Comi G, Ferrari M, Quattrini A, and Previtali SC** (2005). Dominant LMNA mutations can cause combined muscular dystrophy and peripheral neuropathy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 76, 1019-1021.
- **Benedetti S, Menditto I, Degano M, Rodolico C, Merlini L, D'Amico A, Palmucci L, Berardinelli A, Pegoraro E, Trevisan CP, Morandi L, Moroni I, Galluzzi G, Bertini E, Toscano A, Olive M, Bonne G, Mari F, Caldara R, Fazio R, Mammi I, Carrera P, Toniolo D, Comi G, Quattrini A, Ferrari M, and Previtali SC** (2007). Phenotypic clustering of lamin A/C mutations in neuromuscular patients. *Neurology* 69, 1285-1292.
- **Beninati F, Pruneti R, and Ficarra G** (2013). Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws (BRONJ). *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*.
- **Berezney R, and Coffey DS** (1974). Identification of a nuclear protein matrix. *Biochem Biophys Res Commun* 60, 1410-1417.
- **Bergo MO, Gavino B, Ross J, Schmidt WK, Hong C, Kendall LV, Mohr A, Meta M, Genant H, Jiang Y, Wisner ER, Van Bruggen N, Carano RA, Michaelis S, Griffey SM, and Young SG** (2002). Zmpste24 deficiency in mice causes spontaneous bone fractures, muscle weakness, and a prelamin A processing defect. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 13049-13054.
- **Bertrand AT, Chikhaoui K, Ben Yaou R, and Bonne G** (2011). [Laminopathies: one gene, several diseases]. *Biol Aujourd'hui* 205, 147-162.
- **Bidault G, Vatier C, Capeau J, Vigouroux C, and Bereziat V** (2011). LMNA-linked lipodystrophies: from altered fat distribution to cellular alterations. *Biochem Soc Trans* 39, 1752-1757.
- **Bione S, Maestrini E, Rivella S, Mancini M, Regis S, Romeo G, and Toniolo D** (1994). Identification of a novel X-linked gene responsible for Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Nat Genet* 8, 323-327.
- **Bjerknes M, and Cheng H** (2002). Multipotential stem cells in adult mouse gastric epithelium. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 283, G767-777.
- **Boisclair MD ED, Huberman K, Infantino, R** (2002). High-throughput screening in industry. In, SC Springer, ed.
- **Bonawitz ND, Chatenay-Lapointe M, Pan Y, and Shadel GS** (2007). Reduced TOR signaling extends chronological life span via increased respiration and upregulation of mitochondrial gene expression. *Cell Metab* 5, 265-277.

- **Bonne G, Di Barletta MR, Varnous S, Becane HM, Hammouda EH, Merlini L, Muntoni F, Greenberg CR, Gary F, Urtizberea JA, Duboc D, Fardeau M, Toniolo D, and Schwartz K** (1999). Mutations in the gene encoding lamin A/C cause autosomal dominant Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Nat Genet* 21, 285-288.
- **Bourgeois CF, Lejeune F, and Stevenin J** (2004). Broad specificity of SR (serine/arginine) proteins in the regulation of alternative splicing of pre-messenger RNA. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 78, 37-88.
- **Braam SR, Zeinstra L, Litjens S, Ward-van Oostwaard D, van den Brink S, van Laake L, Lebrin F, Kats P, Hochstenbach R, Passier R, Sonnenberg A, and Mummery CL** (2008). Recombinant vitronectin is a functionally defined substrate that supports human embryonic stem cell self-renewal via alphavbeta5 integrin. *Stem Cells* 26, 2257-2265.
- **Brennand KJ, Simone A, Jou J, Gelboin-Burkhart C, Tran N, Sangar S, Li Y, Mu Y, Chen G, Yu D, McCarthy S, Sebat J, and Gage FH** (2011). Modelling schizophrenia using human induced pluripotent stem cells. *Nature* 473, 221-225.
- **Bridger JM, and Kill IR** (2004). Aging of Hutchinson-Gilford progeria syndrome fibroblasts is characterised by hyperproliferation and increased apoptosis. *Exp Gerontol* 39, 717-724.
- **Brodsky GL, Muntoni F, Miocic S, Sinagra G, Sewry C, and Mestroni L** (2000). Lamin A/C gene mutation associated with dilated cardiomyopathy with variable skeletal muscle involvement. *Circulation* 101, 473-476.
- **Broers JL, Ramaekers FC, Bonne G, Yaou RB, and Hutchison CJ** (2006). Nuclear lamins: laminopathies and their role in premature ageing. *Physiol Rev* 86, 967-1008.
- **Brown WT, Kieras FJ, Houck GE, Jr., Dutkowski R, and Jenkins EC** (1985). A comparison of adult and childhood progerias: Werner syndrome and Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Adv Exp Med Biol* 190, 229-244.
- **Brunet A, Sweeney LB, Sturgill JF, Chua KF, Greer PL, Lin Y, Tran H, Ross SE, Mostoslavsky R, Cohen HY, Hu LS, Cheng HL, Jedrychowski MP, Gygi SP, Sinclair DA, Alt FW, and Greenberg ME** (2004). Stress-dependent regulation of FOXO transcription factors by the SIRT1 deacetylase. *Science* 303, 2011-2015.
- **Burke B, and Stewart CL** (2006). The laminopathies: the functional architecture of the nucleus and its contribution to disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 7, 369-405.
- **Burn J, and Baraitser M** (1986). Partial lipodystrophy with insulin resistant diabetes and hyperlipidaemia (Dunnigan syndrome). *J Med Genet* 23, 128-130.
- **Butin-Israeli V, Adam SA, Goldman AE, and Goldman RD** (2012). Nuclear lamin functions and disease. *Trends Genet* 28, 464-471.
- **Cadnapaphornchai MA, George DM, Masoumi A, McFann K, Strain JD, and Schrier RW** (2011). Effect of statin therapy on disease progression in pediatric ADPKD: design and baseline characteristics of participants. *Contemp Clin Trials* 32, 437-445.
- **Cai H, Xia X, Wang L, Liu Y, He Z, Guo Q, and Xu C** (2013). In vitro and in vivo differentiation of induced pluripotent stem cells into male germ cells. *Biochem Biophys Res Commun* 433, 286-291.
- **Cao K, Capell BC, Erdos MR, Djabali K, and Collins FS** (2007). A lamin A protein isoform overexpressed in Hutchinson-Gilford progeria syndrome interferes with mitosis in progeria and normal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 4949-4954.
- **Cao K, Graziotto JJ, Blair CD, Mazzulli JR, Erdos MR, Krainc D, and Collins FS** (2011). Rapamycin reverses cellular phenotypes and enhances mutant protein clearance in Hutchinson-Gilford progeria syndrome cells. *Sci Transl Med* 3, 89ra58.
- **Capanni C, Mattioli E, Columbaro M, Lucarelli E, Parnaik VK, Novelli G, Wehnert M, Cenni V, Maraldi NM, Squarzoni S, and Lattanzi G** (2005). Altered pre-

lamin A processing is a common mechanism leading to lipodystrophy. *Hum Mol Genet* 14, 1489-1502.

- **Capell BC, and Collins FS** (2006). Human laminopathies: nuclei gone genetically awry. *Nat Rev Genet* 7, 940-952.
- **Capell BC, Erdos MR, Madigan JP, Fiordalisi JJ, Varga R, Conneely KN, Gordon LB, Der CJ, Cox AD, and Collins FS** (2005). Inhibiting farnesylation of progerin prevents the characteristic nuclear blebbing of Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 12879-12884.
- **Capell BC, Olive M, Erdos MR, Cao K, Faddah DA, Tavarez UL, Conneely KN, Qu X, San H, Ganesh SK, Chen X, Avallone H, Kolodgie FD, Virmani R, Nabel EG, and Collins FS** (2008). A farnesyltransferase inhibitor prevents both the onset and late progression of cardiovascular disease in a progeria mouse model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 15902-15907.
- **Cattin ME, Muchir A, and Bonne G** (2013). 'State-of-the-heart' of cardiac laminopathies. *Curr Opin Cardiol* 28, 297-304.
- **Caux F, Dubosclard E, Lascols O, Buendia B, Chazouilleres O, Cohen A, Courvalin JC, Laroche L, Capeau J, Vigouroux C, and Christin-Maitre S** (2003). A new clinical condition linked to a novel mutation in lamins A and C with generalized lipoatrophy, insulin-resistant diabetes, disseminated leukomelanodermic papules, liver steatosis, and cardiomyopathy. *J Clin Endocrinol Metab* 88, 1006-1013.
- **Cekaitė L, Rantala JK, Bruun J, Guriby M, Agesen TH, Danielsen SA, Lind GE, Nesbakken A, Kallioniemi O, Lothe RA, and Skotheim RI** (2012). MiR-9, -31, and -182 deregulation promote proliferation and tumor cell survival in colon cancer. *Neoplasia* 14, 868-879.
- **Cha S, Kim GB, Kwon BS, Bae EJ, Noh CI, and Kim WH** (2013). A case of isolated bilateral pulmonary arterial calcification diagnosed in utero. *J Perinatol* 33, 397-400.
- **Chandravanshi SL, Rawat AK, Dwivedi PC, and Choudhary P** (2011). Ocular manifestations in the Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Indian J Ophthalmol* 59, 509-512.
- **Chaouch M, Allal Y, De Sandre-Giovannoli A, Vallat JM, Amer-el-Khedoud A, Kassouri N, Chaouch A, Sindou P, Hammoudouche T, Tazir M, Levy N, and Grid D** (2003). The phenotypic manifestations of autosomal recessive axonal Charcot-Marie-Tooth due to a mutation in Lamin A/C gene. *Neuromuscul Disord* 13, 60-67.
- **Charbord J, Poydenot P, Bonnefond C, Feyeux M, Casagrande F, Brinon B, Francelle L, Auregan G, Guillermier M, Cailleret M, Viegas P, Nicoleau C, Martinat C, Brouillet E, Cattaneo E, Peschanski M, Lechuga M, and Perrier AL** (2013). High Throughput Screening for Inhibitors of Rest in Neural Derivatives of Human Embryonic Stem Cells Reveals a Chemical Compound that Promotes Expression of Neuronal Genes. *Stem Cells*.
- **Chen L, Lee L, Kudlow BA, Dos Santos HG, Sletvold O, Shafeeghati Y, Botha EG, Garg A, Hanson NB, Martin GM, Mian IS, Kennedy BK, and Oshima J** (2003). LMNA mutations in atypical Werner's syndrome. *Lancet* 362, 440-445.
- **Chen P, Price C, Li Z, Li Y, Cao D, Wiley A, He C, Gurbuxani S, Kunjamma RB, Huang H, Jiang X, Arnovitz S, Xu M, Hong GM, Elkahloun AG, Neilly MB, Wunderlich M, Larson RA, Le Beau MM, Mulloy JC, Liu PP, Rowley JD, and Chen J** (2013). miR-9 is an essential oncogenic microRNA specifically overexpressed in mixed lineage leukemia-rearranged leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 11511-11516.
- **Choi SM, Kim Y, Shim JS, Park JT, Wang RH, Leach SD, Liu JO, Deng C, Ye Z, and Jang YY** (2013). Efficient drug screening and gene correction for treating liver disease using patient-specific stem cells. *Hepatology* 57, 2458-2468.

- **Chou BK, Mali P, Huang X, Ye Z, Dowey SN, Resar LM, Zou C, Zhang YA, Tong J, and Cheng L** (2011). Efficient human iPS cell derivation by a non-integrating plasmid from blood cells with unique epigenetic and gene expression signatures. *Cell Res* 21, 518-529.
- **Chute JP, Ross JR, and McDonnell DP** (2010). Minireview: Nuclear receptors, hematopoiesis, and stem cells. *Mol Endocrinol* 24, 1-10.
- **Clements L, Manilal S, Love DR, and Morris GE** (2000). Direct interaction between emerin and lamin A. *Biochem Biophys Res Commun* 267, 709-714.
- **Coffinier C, Jung HJ, Li Z, Nobumori C, Yun UJ, Farber EA, Davies BS, Weinstein MM, Yang SH, Lammerding J, Farahani JN, Bentolila LA, Fong LG, and Young SG** (2010). Direct synthesis of lamin A, bypassing prelamin A processing, causes misshapen nuclei in fibroblasts but no detectable pathology in mice. *J Biol Chem* 285, 20818-20826.
- **Collins JM, and Chu AK** (1987). Binding of the DNA polymerase alpha-DNA primase complex to the nuclear matrix in HeLa cells. *Biochemistry* 26, 5600-5607.
- **Columbaro M, Capanni C, Mattioli E, Novelli G, Parnaik VK, Squarzoni S, Maraldi NM, and Lattanzi G** (2005). Rescue of heterochromatin organization in Hutchinson-Gilford progeria by drug treatment. *Cell Mol Life Sci* 62, 2669-2678.
- **Constantinescu D, Csoka AB, Navara CS, and Schatten GP** (2010). Defective DSB repair correlates with abnormal nuclear morphology and is improved with FTI treatment in Hutchinson-Gilford progeria syndrome fibroblasts. *Exp Cell Res* 316, 2747-2759.
- **Constantinescu D, Gray HL, Sammak PJ, Schatten GP, and Csoka AB** (2006). Lamin A/C expression is a marker of mouse and human embryonic stem cell differentiation. *Stem Cells* 24, 177-185.
- **Coolen M, Thieffry D, Drivenes O, Becker TS, and Bally-Cuif L** (2012). miR-9 controls the timing of neurogenesis through the direct inhibition of antagonistic factors. *Dev Cell* 22, 1052-1064.
- **Copeland KC, Silverstein J, Moore KR, Prazar GE, Raymer T, Shiffman RN, Springer SC, Thaker VV, Anderson M, Spann SJ, and Flinn SK** (2013). Management of newly diagnosed type 2 Diabetes Mellitus (T2DM) in children and adolescents. *Pediatrics* 131, 364-382.
- **Corrigan DP, Kuszczak D, Rusinol AE, Thewke DP, Hrycyna CA, Michaelis S, and Sinensky MS** (2005). Prelamin A endoproteolytic processing in vitro by recombinant Zmpste24. *Biochem J* 387, 129-138.
- **D'Amico A, Haliloglu G, Richard P, Talim B, Maugrenre S, Ferreiro A, Guicheney P, Menditto I, Benedetti S, Bertini E, Bonne G, and Topaloglu H** (2005). Two patients with 'Dropped head syndrome' due to mutations in LMNA or SEPN1 genes. *Neuromuscul Disord* 15, 521-524.
- **d'Erme AM, Gola MF, Paradisi M, Passarelli F, Milanesi N, and Gola M** (2012). Skin signs as early manifestations of Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Arch Dis Child* 97, 806-807.
- **Dahl KN, Kahn SM, Wilson KL, and Discher DE** (2004). The nuclear envelope lamina network has elasticity and a compressibility limit suggestive of a molecular shock absorber. *J Cell Sci* 117, 4779-4786.
- **Davies BS, Barnes RH, 2nd, Tu Y, Ren S, Andres DA, Spielmann HP, Lammerding J, Wang Y, Young SG, and Fong LG** (2010). An accumulation of non-farnesylated prelamin A causes cardiomyopathy but not progeria. *Hum Mol Genet* 19, 2682-2694.

- **de Paula Rodrigues GH, das Eiras Tamega I, Duque G, and Spinola Dias Neto V** (2002). Severe bone changes in a case of Hutchinson-Gilford syndrome. *Ann Genet* 45, 151-155.
- **De Pietri Tonelli D, Pulvers JN, Haffner C, Murchison EP, Hannon GJ, and Huttner WB** (2008). miRNAs are essential for survival and differentiation of newborn neurons but not for expansion of neural progenitors during early neurogenesis in the mouse embryonic neocortex. *Development* 135, 3911-3921.
- **De Sandre-Giovannoli A, Bernard R, Cau P, Navarro C, Amiel J, Boccaccio I, Lyonnet S, Stewart CL, Munnich A, Le Merrer M, and Levy N** (2003). Lamin a truncation in Hutchinson-Gilford progeria. *Science* 300, 2055.
- **De Sandre-Giovannoli A, Chaouch M, Kozlov S, Vallat JM, Tazir M, Kassouri N, Szepetowski P, Hammadouche T, Vandenberghe A, Stewart CL, Grid D, and Levy N** (2002). Homozygous defects in LMNA, encoding lamin A/C nuclear-envelope proteins, cause autosomal recessive axonal neuropathy in human (Charcot-Marie-Tooth disorder type 2) and mouse. *Am J Hum Genet* 70, 726-736.
- **DeBusk FL** (1972). The Hutchinson-Gilford progeria syndrome. Report of 4 cases and review of the literature. *J Pediatr* 80, 697-724.
- **Decker ML, Chavez E, Vulto I, and Lansdorp PM** (2009). Telomere length in Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Mech Ageing Dev* 130, 377-383.
- **Delaloy C, Liu L, Lee JA, Su H, Shen F, Yang GY, Young WL, Ivey KN, and Gao FB** (2010). MicroRNA-9 coordinates proliferation and migration of human embryonic stem cell-derived neural progenitors. *Cell Stem Cell* 6, 323-335.
- **Delbarre E, Tramier M, Coppey-Moisan M, Gaillard C, Courvalin JC, and Buendia B** (2006). The truncated prelamin A in Hutchinson-Gilford progeria syndrome alters segregation of A-type and B-type lamin homopolymers. *Hum Mol Genet* 15, 1113-1122.
- **Dell'Amore A, Botta L, Martin Suarez S, Lo Forte A, Mikus E, Camurri N, Ortelli L, and Arpesella G** (2007). Heart transplantation in patients with Emery-Dreifuss muscular dystrophy: case reports. *Transplant Proc* 39, 3538-3540.
- **Dello Russo A, Mangiola F, Della Bella P, Nigro G, Melacini P, Bongiorni MG, Tondo C, Calo L, Messano L, Pace M, Pelargonio G, Casella M, Sanna T, Silvestri G, Modoni A, Zachara E, Moltrasio M, Morandi L, Politano L, Palladino A, and Bellocchi F** (2009). Risk of arrhythmias in myotonic dystrophy: trial design of the RAMYD study. *J Cardiovasc Med (Hagerstown)* 10, 51-58.
- **Delorme B, Ringe J, Gallay N, Le Vern Y, Kerboeuf D, Jorgensen C, Rosset P, Sensebe L, Layrolle P, Haupl T, and Charbord P** (2008). Specific plasma membrane protein phenotype of culture-amplified and native human bone marrow mesenchymal stem cells. *Blood* 111, 2631-2635.
- **Delorme B, Ringe J, Pontikoglou C, Gaillard J, Langonne A, Sensebe L, Noel D, Jorgensen C, Haupl T, and Charbord P** (2009). Specific lineage-priming of bone marrow mesenchymal stem cells provides the molecular framework for their plasticity. *Stem Cells* 27, 1142-1151.
- **Denecke J, Brune T, Feldhaus T, Robenek H, Kranz C, Auchus RJ, Agarwal AK, and Marquardt T** (2006). A homozygous ZMPSTE24 null mutation in combination with a heterozygous mutation in the LMNA gene causes Hutchinson-Gilford progeria syndrome (HGPS): insights into the pathophysiology of HGPS. *Hum Mutat* 27, 524-531.
- **Dhe-Paganon S, Werner ED, Chi YI, and Shoelson SE** (2002). Structure of the globular tail of nuclear lamin. *J Biol Chem* 277, 17381-17384.
- **Dimitrova N, Chen YC, Spector DL, and de Lange T** (2008). 53BP1 promotes non-homologous end joining of telomeres by increasing chromatin mobility. *Nature* 456, 524-528.

- **Dimos JT, Rodolfa KT, Niakan KK, Weisenthal LM, Mitsumoto H, Chung W, Croft GF, Saphier G, Leibel R, Goland R, Wichterle H, Henderson CE, and Eggan K** (2008). Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons. *Science* 321, 1218-1221.
- **Ding L, Paszkowski-Rogacz M, Nitzsche A, Slabicki MM, Heninger AK, de Vries I, Kittler R, Junqueira M, Shevchenko A, Schulz H, Hubner N, Doss MX, Sachinidis A, Hescheler J, Iacone R, Anastassiadis K, Stewart AF, Pisabarro MT, Caldarelli A, Poser I, Theis M, and Buchholz F** (2009). A genome-scale RNAi screen for Oct4 modulators defines a role of the Paf1 complex for embryonic stem cell identity. *Cell Stem Cell* 4, 403-415.
- **Dirin M, and Winkler J** (2013). Influence of diverse chemical modifications on the ADME characteristics and toxicology of antisense oligonucleotides. *Expert Opin Biol Ther* 13, 875-888.
- **Dittmer TA, and Misteli T** (2011). The lamin protein family. *Genome Biol* 12, 222.
- **Doubaj Y, Lamzouri A, Elalaoui SC, Laarabi FZ, and Sefiani A** (2011). [Three cases of Hutchinson-Gilford progeria syndrome]. *Arch Pediatr* 18, 156-159.
- **Duffy BC, Zhu L, Decornez H, and Kitchen DB** (2012). Early phase drug discovery: cheminformatics and computational techniques in identifying lead series. *Bioorg Med Chem* 20, 5324-5342.
- **Eastman RT, Buckner FS, Yokoyama K, Gelb MH, and Van Voorhis WC** (2006). Thematic review series: lipid posttranslational modifications. Fighting parasitic disease by blocking protein farnesylation. *J Lipid Res* 47, 233-240.
- **Echevarria W, Leite MF, Guerra MT, Zipfel WR, and Nathanson MH** (2003). Regulation of calcium signals in the nucleus by a nucleoplasmic reticulum. *Nat Cell Biol* 5, 440-446.
- **Efuet ET, and Keyomarsi K** (2006). Farnesyl and geranylgeranyl transferase inhibitors induce G1 arrest by targeting the proteasome. *Cancer Res* 66, 1040-1051.
- **Eggert US** (2013). The why and how of phenotypic small-molecule screens. *Nat Chem Biol* 9, 206-209.
- **Ekins S, Williams AJ, Krasowski MD, and Freundlich JS** (2011). In silico repositioning of approved drugs for rare and neglected diseases. *Drug Discov Today* 16, 298-310.
- **Eminli S, Foudi A, Stadtfeld M, Maherli N, Ahfeldt T, Mostoslavsky G, Hock H, and Hochedlinger K** (2009). Differentiation stage determines potential of hematopoietic cells for reprogramming into induced pluripotent stem cells. *Nat Genet* 41, 968-976.
- **Erdem N, Gunes AT, Avci O, and Osma E** (1994). A case of Hutchinson-Gilford progeria syndrome mimicking scleredema in early infancy. *Dermatology* 188, 318-321.
- **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, and Collins FS** (2003). Recurrent de novo point mutations in lamin A cause Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Nature* 423, 293-298.
- **Espandar R, Eragli AS, and Marookhpour S** (2012). Simultaneous shoulder and hip dislocation in a 12-year-old girl with Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Acta Med Iran* 50, 439-443.
- **Esteban MA, Wang T, Qin B, Yang J, Qin D, Cai J, Li W, Weng Z, Chen J, Ni S, Chen K, Li Y, Liu X, Xu J, Zhang S, Li F, He W, Labuda K, Song Y, Peterbauer A, Wolbank S, Redl H, Zhong M, Cai D, Zeng L, and Pei D** (2010). Vitamin C enhances the generation of mouse and human induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 6, 71-79.
- **Evans MJ, and Kaufman MH** (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292, 154-156.

- **Fatkin D, MacRae C, Sasaki T, Wolff MR, Porcu M, Frenneaux M, Atherton J, Vidaillet HJ, Jr., Spudich S, De Girolami U, Seidman JG, Seidman C, Muntoni F, Muehle G, Johnson W, and McDonough B** (1999). Missense mutations in the rod domain of the lamin A/C gene as causes of dilated cardiomyopathy and conduction-system disease. *N Engl J Med* 341, 1715-1724.
- **Fawcett DW** (1966). On the occurrence of a fibrous lamina on the inner aspect of the nuclear envelope in certain cells of vertebrates. *Am J Anat* 119, 129-145.
- **Ferguson D, Rodriguez LE, Palma JP, Refici M, Jarvis K, O'Connor J, Sullivan GM, Frost D, Marsh K, Bauch J, Zhang H, Lin NH, Rosenberg S, Sham HL, and Joseph IB** (2005). Antitumor activity of orally bioavailable farnesyltransferase inhibitor, ABT-100, is mediated by antiproliferative, proapoptotic, and antiangiogenic effects in xenograft models. *Clin Cancer Res* 11, 3045-3054.
- **Fisher DZ, Chaudhary N, and Blobel G** (1986). cDNA sequencing of nuclear lamins A and C reveals primary and secondary structural homology to intermediate filament proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 6450-6454.
- **Foja S, Jung M, Harwardt B, Riemann D, Pelz-Ackermann O, and Schroeder IS** (2013). Hypoxia supports reprogramming of mesenchymal stromal cells via induction of embryonic stem cell-specific microRNA-302 cluster and pluripotency-associated genes. *Cell Reprogram* 15, 68-79.
- **Fong LG, Ng JK, Lammerding J, Vickers TA, Meta M, Cote N, Gavino B, Qiao X, Chang SY, Young SR, Yang SH, Stewart CL, Lee RT, Bennett CF, Bergo MO, and Young SG** (2006). Prelamin A and lamin A appear to be dispensable in the nuclear lamina. *J Clin Invest* 116, 743-752.
- **Fong LG, Ng JK, Meta M, Cote N, Yang SH, Stewart CL, Sullivan T, Burghardt A, Majumdar S, Reue K, Bergo MO, and Young SG** (2004). Heterozygosity for Lmna deficiency eliminates the progeria-like phenotypes in Zmpste24-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 18111-18116.
- **Fong LG, Vickers TA, Farber EA, Choi C, Yun UJ, Hu Y, Yang SH, Coffinier C, Lee R, Yin L, Davies BS, Andres DA, Spielmann HP, Bennett CF, and Young SG** (2009). Activating the synthesis of progerin, the mutant prelamin A in Hutchinson-Gilford progeria syndrome, with antisense oligonucleotides. *Hum Mol Genet* 18, 2462-2471.
- **Forristal CE, Wright KL, Hanley NA, Oreffo RO, and Houghton FD** (2010). Hypoxia inducible factors regulate pluripotency and proliferation in human embryonic stem cells cultured at reduced oxygen tensions. *Reproduction* 139, 85-97.
- **Frank NY, Schatton T, and Frank MH** (2010). The therapeutic promise of the cancer stem cell concept. *J Clin Invest* 120, 41-50.
- **Freije JM, Blay P, Pendas AM, Cadinanos J, Crespo P, and Lopez-Otin C** (1999). Identification and chromosomal location of two human genes encoding enzymes potentially involved in proteolytic maturation of farnesylated proteins. *Genomics* 58, 270-280.
- **Fricker M, Hollinshead M, White N, and Vaux D** (1997). Interphase nuclei of many mammalian cell types contain deep, dynamic, tubular membrane-bound invaginations of the nuclear envelope. *J Cell Biol* 136, 531-544.
- **Fukuchi K, Katsuya T, Sugimoto K, Kuremura M, Kim HD, Li L, and Ogihara T** (2004). LMNA mutation in a 45 year old Japanese subject with Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *J Med Genet* 41, e67.
- **Furukawa K, and Hotta Y** (1993). cDNA cloning of a germ cell specific lamin B3 from mouse spermatocytes and analysis of its function by ectopic expression in somatic cells. *EMBO J* 12, 97-106.
- **Fusaki N, Ban H, Nishiyama A, Saeki K, and Hasegawa M** (2009). Efficient induction of transgene-free human pluripotent stem cells using a vector based on Sendai virus,

an RNA virus that does not integrate into the host genome. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 85, 348-362.

- **Gage FH, Coates PW, Palmer TD, Kuhn HG, Fisher LJ, Suhonen JO, Peterson DA, Suhr ST, and Ray J** (1995). Survival and differentiation of adult neuronal progenitor cells transplanted to the adult brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 11879-11883.
- **Galletti S, Nitschke Y, Malavolti AM, Aquilano G, Faldella G, Corvaglia L, and Rutsch F** (2011). Generalized Arterial Calcification of Infancy: Fatal Clinical Course Associated with a Novel Mutation in ENPP1. *JIMD Rep* 1, 23-27.
- **Garg A** (2011). Clinical review#: Lipodystrophies: genetic and acquired body fat disorders. *J Clin Endocrinol Metab* 96, 3313-3325.
- **Garg A, Cogulu O, Ozkinay F, Onay H, and Agarwal AK** (2005). A novel homozygous Ala529Val LMNA mutation in Turkish patients with mandibuloacral dysplasia. *J Clin Endocrinol Metab* 90, 5259-5264.
- **Garg A, Peshock RM, and Fleckenstein JL** (1999). Adipose tissue distribution pattern in patients with familial partial lipodystrophy (Dunnigan variety). *J Clin Endocrinol Metab* 84, 170-174.
- **Garg A, Subramanyam L, Agarwal AK, Simha V, Levine B, D'Apice MR, Novelli G, and Crow Y** (2009). Atypical progeroid syndrome due to heterozygous missense LMNA mutations. *J Clin Endocrinol Metab* 94, 4971-4983.
- **Georgatos SD, Pyrpasopoulou A, and Theodoropoulos PA** (1997). Nuclear envelope breakdown in mammalian cells involves stepwise lamina disassembly and microtubule-drive deformation of the nuclear membrane. *J Cell Sci* 110 (Pt 17), 2129-2140.
- **Gerace L, Blum A, and Blobel G** (1978). Immunocytochemical localization of the major polypeptides of the nuclear pore complex-lamina fraction. Interphase and mitotic distribution. *J Cell Biol* 79, 546-566.
- **Giampatzis V, and Tziomalos K** (2012). Management of type 2 diabetes mellitus in youth. *World J Diabetes* 3, 182-185.
- Gianotti-Sommer A, Rozelle SS, Sullivan S, Mills JA, Park SM, Smith BW, Iyer AM, French DL, Kotton DN, Gadue P, Murphy GJ, and Mostoslavsky G (2008). Generation of human induced pluripotent stem cells from peripheral blood using the STEMCCA lentiviral vector. In StemBook (Cambridge (MA)).
- **Giraud-Triboult K, Rochon-Beaucourt C, Nissan X, Champon B, Aubert S, and Pietu G** (2010). Combined mRNA and microRNA profiling reveals that miR-148a and miR-20b control human mesenchymal stem cell phenotype via EPAS1. *Physiol Genomics* 43, 77-86.
- **Giraud-Triboult K, Rochon-Beaucourt C, Nissan X, Champon B, Aubert S, and Pietu G** (2011). Combined mRNA and microRNA profiling reveals that miR-148a and miR-20b control human mesenchymal stem cell phenotype via EPAS1. *Physiol Genomics* 43, 77-86.
- **Glynn MW, and Glover TW** (2005). Incomplete processing of mutant lamin A in Hutchinson-Gilford progeria leads to nuclear abnormalities, which are reversed by farnesyltransferase inhibition. *Hum Mol Genet* 14, 2959-2969.
- **Goizet C, Yaou RB, Demay L, Richard P, Bouillot S, Rouanet M, Hermosilla E, Le Masson G, Lagueny A, Bonne G, and Ferrer X** (2004). A new mutation of the lamin A/C gene leading to autosomal dominant axonal neuropathy, muscular dystrophy, cardiac disease, and leuconychia. *J Med Genet* 41, e29.
- **Goldman RD, Shumaker DK, Erdos MR, Eriksson M, Goldman AE, Gordon LB, Gruenbaum Y, Khuon S, Mendez M, Varga R, and Collins FS** (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.

- **Goldstein S, Ballantyne SR, Robson AL, and Moerman EJ** (1982). Energy metabolism in cultured human fibroblasts during aging in vitro. *J Cell Physiol* 112, 419-424.
- **Gonzalez-Quereda L, Delgadillo V, Juan-Mateu J, Verdura E, Rodriguez MJ, Baiget M, Pineda M, and Gallano P** (2011). LMNA mutation in progeroid syndrome in association with strokes. *Eur J Med Genet* 54, e576-579.
- **Gonzalez-Suarez I, Redwood AB, Perkins SM, Vermolen B, Lichtensztejn D, Grotsky DA, Morgado-Palacin L, Gapud EJ, Sleckman BP, Sullivan T, Sage J, Stewart CL, Mai S, and Gonzalo S** (2009). Novel roles for A-type lamins in telomere biology and the DNA damage response pathway. *EMBO J* 28, 2414-2427.
- **Gonzalez JM, Navarro-Puche A, Casar B, Crespo P, and Andres V** (2008). Fast regulation of AP-1 activity through interaction of lamin A/C, ERK1/2, and c-Fos at the nuclear envelope. *J Cell Biol* 183, 653-666.
- **Gordon LB, Kleinman ME, Miller DT, Neuberg DS, Giobbie-Hurder A, Gerhard-Herman M, Smoot LB, Gordon CM, Cleveland R, Snyder BD, Fligor B, Bishop WR, Statkevich P, Regen A, Sonis A, Riley S, Ploski C, Correia A, Quinn N, Ullrich NJ, Nazarian A, Liang MG, Huh SY, Schwartzman A, and Kieran MW** Clinical trial of a farnesyltransferase inhibitor in children with Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 16666-16671.
- **Gordon LB, Kleinman ME, Miller DT, Neuberg DS, Giobbie-Hurder A, Gerhard-Herman M, Smoot LB, Gordon CM, Cleveland R, Snyder BD, Fligor B, Bishop WR, Statkevich P, Regen A, Sonis A, Riley S, Ploski C, Correia A, Quinn N, Ullrich NJ, Nazarian A, Liang MG, Huh SY, Schwartzman A, and Kieran MW** (2012). Clinical trial of a farnesyltransferase inhibitor in children with Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 16666-16671.
- **Goto M** (1997). Hierarchical deterioration of body systems in Werner's syndrome: implications for normal ageing. *Mech Ageing Dev* 98, 239-254.
- **Gottschalk M, Danne T, Vlajnic A, and Cara JF** (2007). Glimepiride versus metformin as monotherapy in pediatric patients with type 2 diabetes: a randomized, single-blind comparative study. *Diabetes Care* 30, 790-794.
- **Graber HL, Unverferth DV, Baker PB, Ryan JM, Baba N, and Wooley CF** (1986). Evolution of a hereditary cardiac conduction and muscle disorder: a study involving a family with six generations affected. *Circulation* 74, 21-35.
- **Graziotto JJ, Cao K, Collins FS, and Krainc D** (2012). Rapamycin activates autophagy in Hutchinson-Gilford progeria syndrome: implications for normal aging and age-dependent neurodegenerative disorders. *Autophagy* 8, 147-151.
- **Guenou H, Nissan X, Larcher F, Feteira J, Lemaitre G, Saidani M, Del Rio M, Barrault CC, Bernard FX, Peschanski M, Baldeschi C, and Waksman G** (2009). Human embryonic stem-cell derivatives for full reconstruction of the pluristratified epidermis: a preclinical study. *Lancet* 374, 1745-1753.
- **Gupta MK, and Prabhakar YS** (2008). QSAR study on tetrahydroquinoline analogues as plasmodium protein farnesyltransferase inhibitors: a comparison of rationales of malarial and mammalian enzyme inhibitory activities for selectivity. *Eur J Med Chem* 43, 2751-2767.
- **Gurdon JB** (1962). The developmental capacity of nuclei taken from intestinal epithelium cells of feeding tadpoles. *J Embryol Exp Morphol* 10, 622-640.
- **Habeler W, Pouillot S, Plancheron A, Puceat M, Peschanski M, and Monville C** (2009). An in vitro beating heart model for long-term assessment of experimental therapeutics. *Cardiovasc Res* 81, 253-259.
- **Haigis MC, and Sinclair DA** (2010). Mammalian sirtuins: biological insights and disease relevance. *Annu Rev Pathol* 5, 253-295.

- **Haithcock E, Dayani Y, Neufeld E, Zahand AJ, Feinstein N, Mattout A, Gruenbaum Y, and Liu J** (2005). Age-related changes of nuclear architecture in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 16690-16695.
- **Hall PA, and Watt FM** (1989). Stem cells: the generation and maintenance of cellular diversity. *Development* 106, 619-633.
- **Hannan NR, Segeritz CP, Touboul T, and Vallier L** (2013). Production of hepatocyte-like cells from human pluripotent stem cells. *Nat Protoc* 8, 430-437.
- **Hansen M, Taubert S, Crawford D, Libina N, Lee SJ, and Kenyon C** (2007). Lifespan extension by conditions that inhibit translation in *Caenorhabditis elegans*. *Aging Cell* 6, 95-110.
- **Hanumanthappa NB, Madhusudan G, Mahimarangaiah J, and Manjunath CN** (2011). Hutchinson-Gilford progeria syndrome with severe calcific aortic valve stenosis. *Ann Pediatr Cardiol* 4, 204-206.
- **Harley CB, Futcher AB, and Greider CW** (1990). Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* 345, 458-460.
- **Harrison DE, Strong R, Sharp ZD, Nelson JF, Astle CM, Flurkey K, Nadon NL, Wilkinson JE, Frenkel K, Carter CS, Pahor M, Javors MA, Fernandez E, and Miller RA** (2009). Rapamycin fed late in life extends lifespan in genetically heterogeneous mice. *Nature* 460, 392-395.
- **Hegele R** (2005). LMNA mutation position predicts organ system involvement in laminopathies. *Clin Genet* 68, 31-34.
- **Heiskanen A, Satomaa T, Tiitinen S, Laitinen A, Mannelin S, Impola U, Mikkola M, Olsson C, Miller-Podraza H, Blomqvist M, Olonen A, Salo H, Lehenkari P, Tuuri T, Otonkoski T, Natunen J, Saarinen J, and Laine J** (2007). N-glycolylneuraminic acid xenoantigen contamination of human embryonic and mesenchymal stem cells is substantially reversible. *Stem Cells* 25, 197-202.
- **Hennekam RC** (2006). Hutchinson-Gilford progeria syndrome: review of the phenotype. *Am J Med Genet A* 140, 2603-2624.
- **Hennekes H, and Nigg EA** (1994). The role of isoprenylation in membrane attachment of nuclear lamins. A single point mutation prevents proteolytic cleavage of the lamin A precursor and confers membrane binding properties. *J Cell Sci* 107 (Pt 4), 1019-1029.
- **Hisama FM, Lessel D, Leistritz D, Friedrich K, McBride KL, Pastore MT, Gottesman GS, Saha B, Martin GM, Kubisch C, and 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. *Am J Med Genet A* 155A, 3002-3006.
- **Ho CY, and Lammerding J** (2012). Lamins at a glance. *J Cell Sci* 125, 2087-2093.
- **Ho JC, Zhou T, Lai WH, Huang Y, Chan YC, Li X, Wong NL, Li Y, Au KW, Guo D, Xu J, Siu CW, Pei D, Tse HF, and Esteban MA** (2011). Generation of induced pluripotent stem cell lines from 3 distinct laminopathies bearing heterogeneous mutations in lamin A/C. *Aging (Albany NY)* 3, 380-390.
- **Howitz KT, Bitterman KJ, Cohen HY, Lamming DW, Lavu S, Wood JG, Zipkin RE, Chung P, Kisielewski A, Zhang LL, Scherer B, and Sinclair DA** (2003). Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature* 425, 191-196.
- **Hsu SH, Yu B, Wang X, Lu Y, Schmidt CR, Lee RJ, Lee LJ, Jacob ST, and Ghoshal K** (2013). Cationic lipid nanoparticles for therapeutic delivery of siRNA and miRNA to murine liver tumor. *Nanomedicine*.
- **Hu K, Yu J, Suknuntha K, Tian S, Montgomery K, Choi KD, Stewart R, Thomson JA, and Slukvin, II** (2011). Efficient generation of transgene-free induced

pluripotent stem cells from normal and neoplastic bone marrow and cord blood mononuclear cells. *Blood* 117, e109-119.

- **Hu S, Wilson KD, Ghosh Z, Han L, Wang Y, Lan F, Ransohoff KJ, Burridge P, and Wu JC** (2013). MicroRNA-302 increases reprogramming efficiency via repression of NR2F2. *Stem Cells* 31, 259-268.
- **Huang S, Risques RA, Martin GM, Rabinovitch PS, and Oshima J** (2008). Accelerated telomere shortening and replicative senescence in human fibroblasts overexpressing mutant and wild-type lamin A. *Exp Cell Res* 314, 82-91.
- **Huangfu D, Osafune K, Maehr R, Guo W, Eijkelenboom A, Chen S, Muhlestein W, and Melton DA** (2008). Induction of pluripotent stem cells from primary human fibroblasts with only Oct4 and Sox2. *Nat Biotechnol* 26, 1269-1275.
- Hüser J (2006). High throughput screening in drug discovery. In, Wiley-VCH, ed.
- **Hutchinson J** (1886). Congenital Absence of Hair and Mammary Glands with Atrophic Condition of the Skin and its Appendages, in a Boy whose Mother had been almost wholly Bald from Alopecia Areata from the age of Six. *Med Chir Trans* 69, 473-477.
- **Hutchison CJ** (2011). The role of DNA damage in laminopathy progeroid syndromes. *Biochem Soc Trans* 39, 1715-1718.
- **Ibrahim MX, Sayin VI, Akula MK, Liu M, Fong LG, Young SG, and Bergo MO** (2013). Targeting isoprenylcysteine methylation ameliorates disease in a mouse model of progeria. *Science* 340, 1330-1333.
- **Iordanescu C, Denislam D, Avram E, Chiru A, Busuioc M, and Cioabla D** (1995). [Ocular manifestations in progeria]. *Oftalmologia* 39, 56-57.
- **Issat T, Nowis D, Legat M, Makowski M, Klejman MP, Urbanski J, Skierski J, Koronkiewicz M, Stoklosa T, Brzezinska A, Bil J, Gietka J, Jakobisiak M, and Golab J** (2007). Potentiated antitumor effects of the combination treatment with statins and pamidronate in vitro and in vivo. *Int J Oncol* 30, 1413-1425.
- **Itoh M, Kiuru M, Cairo MS, and Christiano AM** (2011). Generation of keratinocytes from normal and recessive dystrophic epidermolysis bullosa-induced pluripotent stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 8797-8802.
- **Jackson DA, and Cook PR** (1988). Visualization of a filamentous nucleoskeleton with a 23 nm axial repeat. *EMBO J* 7, 3667-3677.
- **Jaenisch R, and Young R** (2008). Stem cells, the molecular circuitry of pluripotency and nuclear reprogramming. *Cell* 132, 567-582.
- **Jagatheesan G, Thanumalayan S, Muralikrishna B, Rangaraj N, Karande AA, and Parnaik VK** (1999). Colocalization of intranuclear lamin foci with RNA splicing factors. *J Cell Sci* 112 (Pt 24), 4651-4661.
- **Jaks V, Barker N, Kasper M, van Es JH, Snippert HJ, Clevers H, and Toftgard R** (2008). Lgr5 marks cycling, yet long-lived, hair follicle stem cells. *Nat Genet* 40, 1291-1299.
- **Jang J, Yoo JE, Lee JA, Lee DR, Kim JY, Huh YJ, Kim DS, Park CY, Hwang DY, Kim HS, Kang HC, and Kim DW** (2012). Disease-specific induced pluripotent stem cells: a platform for human disease modeling and drug discovery. *Exp Mol Med* 44, 202-213.
- **Jansen T, and Romiti R** (2000). Progeria infantum (Hutchinson-Gilford syndrome) associated with scleroderma-like lesions and acro-osteolysis: a case report and brief review of the literature. *Pediatr Dermatol* 17, 282-285.
- **Janssen HL, Reesink HW, Lawitz EJ, Zeuzem S, Rodriguez-Torres M, Patel K, van der Meer AJ, Patick AK, Chen A, Zhou Y, Persson R, King BD, Kauppinen S, Levin AA, and Hodges MR** (2013). Treatment of HCV infection by targeting microRNA. *N Engl J Med* 368, 1685-1694.

- **Jia F, Wilson KD, Sun N, Gupta DM, Huang M, Li Z, Panetta NJ, Chen ZY, Robbins RC, Kay MA, Longaker MT, and Wu JC** (2010). A nonviral minicircle vector for deriving human iPS cells. *Nat Methods* 7, 197-199.
- **Jones KL, Arslanian S, Peterokova VA, Park JS, and Tomlinson MJ** (2002). Effect of metformin in pediatric patients with type 2 diabetes: a randomized controlled trial. *Diabetes Care* 25, 89-94.
- **Jung HJ, Coffinier C, Choe Y, Beigneux AP, Davies BS, Yang SH, Barnes RH, 2nd, Hong J, Sun T, Pleasure SJ, Young SG, and 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.
- **Kaji K, Norrby K, Paca A, Mileikovsky M, Mohseni P, and Woltjen K** (2009). Virus-free induction of pluripotency and subsequent excision of reprogramming factors. *Nature* 458, 771-775.
- **Kaltz N, Funari A, Hippauf S, Delorme B, Noel D, Riminucci M, Jacobs VR, Haupl T, Jorgensen C, Charbord P, Peschel C, Bianco P, and Oostendorp RA** (2008). In vivo osteoprogenitor potency of human stromal cells from different tissues does not correlate with expression of POU5F1 or its pseudogenes. *Stem Cells* 26, 2419-2424.
- **Kar BR, and Satapathy J** (2013). Vitiligo vulgaris in a patient of progeria. *Indian J Dermatol* 58, 164.
- **Kasinski AL, and Slack FJ** (2011). Epigenetics and genetics. MicroRNAs en route to the clinic: progress in validating and targeting microRNAs for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 11, 849-864.
- **Kennedy BK, Barbie DA, Classon M, Dyson N, and Harlow E** (2000). Nuclear organization of DNA replication in primary mammalian cells. *Genes Dev* 14, 2855-2868.
- **Kieran MW, Packer RJ, Onar A, Blaney SM, Phillips P, Pollack IF, Geyer JR, Gururangan S, Banerjee A, Goldman S, Turner CD, Belasco JB, Broniscer A, Zhu Y, Frank E, Kirschmeier P, Statkevich P, Yver A, Boyett JM, and Kun LE** (2007). Phase I and pharmacokinetic study of the oral farnesyltransferase inhibitor lonafarnib administered twice daily to pediatric patients with advanced central nervous system tumors using a modified continuous reassessment method: a Pediatric Brain Tumor Consortium Study. *J Clin Oncol* 25, 3137-3143.
- **Kim D, Kim CH, Moon JI, Chung YG, Chang MY, Han BS, Ko S, Yang E, Cha KY, Lanza R, and Kim KS** (2009). Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins. *Cell Stem Cell* 4, 472-476.
- **Kim HK, Lee JY, Bae EJ, Oh PS, Park WI, Lee DS, Kim JI, and Lee HJ** (2011). Hutchinson-Gilford progeria syndrome with G608G LMNA mutation. *J Korean Med Sci* 26, 1642-1645.
- **Kim HS, Oh SK, Park YB, Ahn HJ, Sung KC, Kang MJ, Lee LA, Suh CS, Kim SH, Kim DW, and Moon SY** (2005). Methods for derivation of human embryonic stem cells. *Stem Cells* 23, 1228-1233.
- **Kim K, Doi A, Wen B, Ng K, Zhao R, Cahan P, Kim J, Aryee MJ, Ji H, Ehrlich LI, Yabuuchi A, Takeuchi A, Cunniff KC, Hongguang H, McKinney-Freeman S, Naveiras O, Yoon TJ, Irizarry RA, Jung N, Seita J, Hanna J, Murakami P, Jaenisch R, Weissleder R, Orkin SH, Weissman IL, Feinberg AP, and Daley GQ** (2010). Epigenetic memory in induced pluripotent stem cells. *Nature* 467, 285-290.
- **Knecht AK, and Bronner-Fraser M** (2002). Induction of the neural crest: a multigene process. *Nat Rev Genet* 3, 453-461.
- **Kole R, Krainer AR, and Altman S** (2012). RNA therapeutics: beyond RNA interference and antisense oligonucleotides. *Nat Rev Drug Discov* 11, 125-140.

- **Konstantinopoulos PA, and Papavassiliou AG** (2007). Multilevel modulation of the mevalonate and protein-prenylation circuitries as a novel strategy for anticancer therapy. *Trends Pharmacol Sci* 28, 6-13.
- **Krimm I, Ostlund C, Gilquin B, Couprie J, Hossenlopp P, Mornon JP, Bonne G, Courvalin JC, Worman HJ, and Zinn-Justin S** (2002). The Ig-like structure of the C-terminal domain of lamin A/C, mutated in muscular dystrophies, cardiomyopathy, and partial lipodystrophy. *Structure* 10, 811-823.
- **Krohne G, and Benavente R** (1986). The nuclear lamins. A multigene family of proteins in evolution and differentiation. *Exp Cell Res* 162, 1-10.
- **Kudlow BA, Stanfel MN, Burtner CR, Johnston ED, and Kennedy BK** (2008). Suppression of proliferative defects associated with processing-defective lamin A mutants by hTERT or inactivation of p53. *Mol Biol Cell* 19, 5238-5248.
- **Lammerding J, Hsiao J, Schulze PC, Kozlov S, Stewart CL, and Lee RT** (2005). Abnormal nuclear shape and impaired mechanotransduction in emerin-deficient cells. *J Cell Biol* 170, 781-791.
- **Lammerding J, Schulze PC, Takahashi T, Kozlov S, Sullivan T, Kamm RD, Stewart CL, and Lee RT** (2004). Lamin A/C deficiency causes defective nuclear mechanics and mechanotransduction. *J Clin Invest* 113, 370-378.
- **Lanford RE, Hildebrandt-Eriksen ES, Petri A, Persson R, Lindow M, Munk ME, Kauppinen S, and Orum H** (2010). Therapeutic silencing of microRNA-122 in primates with chronic hepatitis C virus infection. *Science* 327, 198-201.
- **Lapasset L, Milhavet O, Prieur A, Besnard E, Babled A, Ait-Hamou N, Leschik J, Pellestor F, Ramirez JM, De Vos J, Lehmann S, and Lemaitre JM** (2011). Rejuvenating senescent and centenarian human cells by reprogramming through the pluripotent state. *Genes Dev* 25, 2248-2253.
- **Larsson J, and Karlsson S** (2005). The role of Smad signaling in hematopoiesis. *Oncogene* 24, 5676-5692.
- **Larsson O, Morita M, Topisirovic I, Alain T, Blouin MJ, Pollak M, and Sonenberg N** (2012). Distinct perturbation of the translatome by the antidiabetic drug metformin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 8977-8982.
- **Laustriat D, Gide J, and Peschanski M** (2010). Human pluripotent stem cells in drug discovery and predictive toxicology. *Biochem Soc Trans* 38, 1051-1057.
- **Lee G, Ramirez CN, Kim H, Zeltner N, Liu B, Radu C, Bhinder B, Kim YJ, Choi IY, Mukherjee-Clavin B, Djaballah H, and Studer L** (2012). Large-scale screening using familial dysautonomia induced pluripotent stem cells identifies compounds that rescue IKBKAP expression. *Nat Biotechnol* 30, 1244-1248.
- **Lee R, Chang SY, Trinh H, Tu Y, White AC, Davies BS, Bergo MO, Fong LG, Lowry WE, and Young SG** (2010). Genetic studies on the functional relevance of the protein prenyltransferases in skin keratinocytes. *Hum Mol Genet* 19, 1603-1617.
- **Lee SF, and Pervaiz S** (2011). Assessment of oxidative stress-induced DNA damage by immunofluorescent analysis of 8-oxodG. *Methods Cell Biol* 103, 99-113.
- **Lefort N, Feyeux M, Bas C, Feraud O, Bennaceur-Griscelli A, Tachdjian G, Peschanski M, and A LP** (2009). [A recurrent hotspot of genomic instability identified in human ES cells]. *Med Sci (Paris)* 25, 99-101.
- **Lehner CF, Stick R, Eppenberger HM, and Nigg EA** (1987). Differential expression of nuclear lamin proteins during chicken development. *J Cell Biol* 105, 577-587.
- **Leopold JA** (2013). Vascular calcification: an age-old problem of old age. *Circulation* 127, 2380-2382.

- **Leucht C, Stiglhofer C, Wizenmann A, Klafke R, Folchert A, and Bally-Cuif L** (2008). MicroRNA-9 directs late organizer activity of the midbrain-hindbrain boundary. *Nat Neurosci* 11, 641-648.
- **Levitas A, Muhammad E, Harel G, Saada A, Caspi VC, Manor E, Beck JC, Sheffield V, and Parvari R** (2010). Familial neonatal isolated cardiomyopathy caused by a mutation in the flavoprotein subunit of succinate dehydrogenase. *Eur J Hum Genet* 18, 1160-1165.
- **Li QY, Newbury-Ecob RA, Terrett JA, Wilson DI, Curtis AR, Yi CH, Gebuhr T, Bullen PJ, Robson SC, Strachan T, Bonnet D, Lyonnet S, Young ID, Raeburn JA, Buckler AJ, Law DJ, and Brook JD** (1997). Holt-Oram syndrome is caused by mutations in TBX5, a member of the Brachyury (T) gene family. *Nat Genet* 15, 21-29.
- **Li W, Zhou H, Abujarour R, Zhu S, Young Joo J, Lin T, Hao E, Scholer HR, Hayek A, and Ding S** (2009). Generation of human-induced pluripotent stem cells in the absence of exogenous Sox2. *Stem Cells* 27, 2992-3000.
- **Lieu DK, Fu JD, Chiamvimonvat N, Tung KC, McNerney GP, Huser T, Keller G, Kong CW, and Li RA** (2013). Mechanism-based facilitated maturation of human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 6, 191-201.
- **Lim S, Sakuma I, Quon MJ, and Koh KK** (2012). Potentially important considerations in choosing specific statin treatments to reduce overall morbidity and mortality. *Int J Cardiol*.
- **Lima LL, Ribas CB, Pereira PM, Schettini RA, and Eiras Jda C** (2011). Do you know this syndrome? Hutchinson-Gilford Syndrome (Progeria). *An Bras Dermatol* 86, 165-166.
- **Lin F, and Worman HJ** (1993). Structural organization of the human gene encoding nuclear lamin A and nuclear lamin C. *J Biol Chem* 268, 16321-16326.
- **Lin T, Ambasudhan R, Yuan X, Li W, Hilcove S, Abujarour R, Lin X, Hahm HS, Hao E, Hayek A, and Ding S** (2009). A chemical platform for improved induction of human iPSCs. *Nat Methods* 6, 805-808.
- **Lindner SE, and Sugden B** (2007). The plasmid replicon of Epstein-Barr virus: mechanistic insights into efficient, licensed, extrachromosomal replication in human cells. *Plasmid* 58, 1-12.
- **Lipinski CA** (2000). Drug-like properties and the causes of poor solubility and poor permeability. *J Pharmacol Toxicol Methods* 44, 235-249.
- **Liu B, Ghosh S, Yang X, Zheng H, Liu X, Wang Z, Jin G, Zheng B, Kennedy BK, Suh Y, Kaeberlein M, Tryggvason K, and Zhou Z** (2012a). Resveratrol rescues SIRT1-dependent adult stem cell decline and alleviates progeroid features in laminopathy-based progeria. *Cell Metab* 16, 738-750.
- **Liu B, Wang J, Chan KM, Tjia WM, Deng W, Guan X, Huang JD, Li KM, Chau PY, Chen DJ, Pei D, Pendas AM, Cadinanos J, Lopez-Otin C, Tse HF, Hutchison C, Chen J, Cao Y, Cheah KS, Tryggvason K, and Zhou Z** (2005). Genomic instability in laminopathy-based premature aging. *Nat Med* 11, 780-785.
- **Liu GH, Barkho BZ, Ruiz S, Diep D, Qu J, Yang SL, Panopoulos AD, Suzuki K, Kurian L, Walsh C, Thompson J, Boue S, Fung HL, Sancho-Martinez I, Zhang K, Yates J, 3rd, and Izpisua Belmonte JC** (2011a). Recapitulation of premature ageing with iPSCs from Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Nature* 472, 221-225.
- **Liu GH, Suzuki K, Qu J, Sancho-Martinez I, Yi F, Li M, Kumar S, Nivet E, Kim J, Soligalla RD, Dubova I, Goebel A, Plongthongkum N, Fung HL, Zhang K, Loring JF, Laurent LC, and Izpisua Belmonte JC** (2011b). Targeted gene correction of laminopathy-associated LMNA mutations in patient-specific iPSCs. *Cell Stem Cell* 8, 688-694.

- **Liu H, Ye Z, Kim Y, Sharkis S, and Jang YY** (2010). Generation of endoderm-derived human induced pluripotent stem cells from primary hepatocytes. *Hepatology* 51, 1810-1819.
- **Liu Q, Spusta SC, Mi R, Lassiter RN, Stark MR, Hoke A, Rao MS, and Zeng X** (2012b). Human neural crest stem cells derived from human ESCs and induced pluripotent stem cells: induction, maintenance, and differentiation into functional schwann cells. *Stem Cells Transl Med* 1, 266-278.
- **Liu Y, Rusinol A, Sinensky M, Wang Y, and Zou Y** (2006). DNA damage responses in progeroid syndromes arise from defective maturation of prelamin A. *J Cell Sci* 119, 4644-4649.
- **Liu Y, Wang Y, Rusinol AE, Sinensky MS, Liu J, Shell SM, and Zou Y** (2008). Involvement of xeroderma pigmentosum group A (XPA) in progeria arising from defective maturation of prelamin A. *FASEB J* 22, 603-611.
- **Lloyd DJ, Trembath RC, and Shackleton S** (2002). A novel interaction between lamin A and SREBP1: implications for partial lipodystrophy and other laminopathies. *Hum Mol Genet* 11, 769-777.
- **Loh YH, Hartung O, Li H, Guo C, Sahalie JM, Manos PD, Urbach A, Heffner GC, Grskovic M, Vigneault F, Lensch MW, Park IH, Agarwal S, Church GM, Collins JJ, Irion S, and Daley GQ** (2010). Reprogramming of T cells from human peripheral blood. *Cell Stem Cell* 7, 15-19.
- **Lomashvili KA, Monier-Faugere MC, Wang X, Malluche HH, and O'Neill WC** (2009). Effect of bisphosphonates on vascular calcification and bone metabolism in experimental renal failure. *Kidney Int* 75, 617-625.
- **Lopez-Mejia IC, Vautrot V, De Toledo M, Behm-Ansmant I, Bourgeois CF, Navarro CL, Osorio FG, Freije JM, Stevenin J, De Sandre-Giovannoli A, Lopez-Otin C, Levy N, Branst C, and Tazi J** (2011). A conserved splicing mechanism of the LMNA gene controls premature aging. *Hum Mol Genet* 20, 4540-4555.
- **Lustremant C, Habeler W, Plancheron A, Goureau O, Grenot L, de la Grange P, Audo I, Nandrot EF, and Monville C** (2013). Human induced pluripotent stem cells as a tool to model a form of leber congenital amaurosis. *Cell Reprogram* 15, 233-246.
- **Lutz RJ, Trujillo MA, Denham KS, Wenger L, and Sinensky M** (1992). Nucleoplasmic localization of prelamin A: implications for prenylation-dependent lamin A assembly into the nuclear lamina. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 3000-3004.
- **Ma J, Meng Y, Kwiatkowski DJ, Chen X, Peng H, Sun Q, Zha X, Wang F, Wang Y, Jing Y, Zhang S, Chen R, Wang L, Wu E, Cai G, Malinowska-Kolodziej I, Liao Q, Liu Y, Zhao Y, Xu K, Dai J, Han J, Wu L, Zhao RC, Shen H, and Zhang H** (2010). Mammalian target of rapamycin regulates murine and human cell differentiation through STAT3/p63/Jagged/Notch cascade. *J Clin Invest* 120, 103-114.
- **Macarron R, Banks MN, Bojanic D, Burns DJ, Cirovic DA, Garyantes T, Green DV, Hertzberg RP, Janzen WP, Paslay JW, Schopfer U, and Sittampalam GS** (2011). Impact of high-throughput screening in biomedical research. *Nat Rev Drug Discov* 10, 188-195.
- **Machiels BM, Zorenc AH, Endert JM, Kuijpers HJ, van Eys GJ, Ramaekers FC, and Broers JL** (1996). An alternative splicing product of the lamin A/C gene lacks exon 10. *J Biol Chem* 271, 9249-9253.
- **Madonna R, Gorbe A, Ferdinand P, and De Caterina R** (2013). Glucose Metabolism, Hyperosmotic Stress, and Reprogramming of Somatic Cells. *Mol Biotechnol*.
- **Mahen R, Hattori H, Lee M, Sharma P, Jeyasekharan AD, and Venkitaraman AR** (2013). A-type lamins maintain the positional stability of DNA damage repair foci in mammalian nuclei. *PLoS One* 8, e61893.

- **Maherali N, Ahfeldt T, Rigamonti A, Utikal J, Cowan C, and Hochedlinger K** (2008). A high-efficiency system for the generation and study of human induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 3, 340-345.
- **Maherali N, and Hochedlinger K** (2008). Guidelines and techniques for the generation of induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 3, 595-605.
- **Makley LN, and Gestwicki JE** (2013). Expanding the number of 'druggable' targets: non-enzymes and protein-protein interactions. *Chem Biol Drug Des* 81, 22-32.
- **Mali P, Chou BK, Yen J, Ye Z, Zou J, Dowey S, Brodsky RA, Ohm JE, Yu W, Baylin SB, Yusa K, Bradley A, Meyers DJ, Mukherjee C, Cole PA, and Cheng L** (2010). Butyrate greatly enhances derivation of human induced pluripotent stem cells by promoting epigenetic remodeling and the expression of pluripotency-associated genes. *Stem Cells* 28, 713-720.
- **Mallampalli MP, Huyer G, Bendale P, Gelb MH, and Michaelis S** (2005). Inhibiting farnesylation reverses the nuclear morphology defect in a HeLa cell model for Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 14416-14421.
- **Malo N, Hanley JA, Cerquozzi S, Pelletier J, and Nadon R** (2006). Statistical practice in high-throughput screening data analysis. *Nat Biotechnol* 24, 167-175.
- **Mancini MA, Shan B, Nickerson JA, Penman S, and Lee WH** (1994). The retinoblastoma gene product is a cell cycle-dependent, nuclear matrix-associated protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 418-422.
- **Manju K, Muralikrishna B, and Parnaik VK** (2006). Expression of disease-causing lamin A mutants impairs the formation of DNA repair foci. *J Cell Sci* 119, 2704-2714.
- **Marchetto MC, Carromeu C, Acab A, Yu D, Yeo GW, Mu Y, Chen G, Gage FH, and Muotri AR** (2010). A model for neural development and treatment of Rett syndrome using human induced pluripotent stem cells. *Cell* 143, 527-539.
- **Marino G, Ugalde AP, Fernandez AF, Osorio FG, Fueyo A, Freije JM, and Lopez-Otin C** (2010). Insulin-like growth factor 1 treatment extends longevity in a mouse model of human premature aging by restoring somatotroph axis function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 16268-16273.
- **Marion RM, Strati K, Li H, Tejera A, Schoeftner S, Ortega S, Serrano M, and Blasco MA** (2009). Telomeres acquire embryonic stem cell characteristics in induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 4, 141-154.
- **Marji J, O'Donoghue SI, McClintock D, Satagopam VP, Schneider R, Ratner D, Worman HJ, Gordon LB, and Djabali K** (2010). Defective lamin A-Rb signaling in Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome and reversal by farnesyltransferase inhibition. *PLoS One* 5, e11132.
- **Martelli AM, Bortul R, Tabellini G, Faenza I, Cappellini A, Bareggi R, Manzoli L, and Cocco L** (2002). Molecular characterization of protein kinase C-alpha binding to lamin A. *J Cell Biochem* 86, 320-330.
- **Martin GR** (1981). Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78, 7634-7638.
- **Martin MJ, Muotri A, Gage F, and Varki A** (2005). Human embryonic stem cells express an immunogenic nonhuman sialic acid. *Nat Med* 11, 228-232.
- **Martins-Taylor K, Nisler BS, Taapken SM, Compton T, Crandall L, Montgomery KD, Lalande M, and Xu RH** (2011). Recurrent copy number variations in human induced pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol* 29, 488-491.
- **Maury Y, Gauthier M, Peschanski M, and Martinat C** (2011). [Human pluripotent stem cells: opening key for pathological modeling]. *Med Sci (Paris)* 27, 443-446.

- **Maury Y, Gauthier M, Peschanski M, and Martinat C** (2012). Human pluripotent stem cells for disease modelling and drug screening. *Bioessays* 34, 61-71.
- **Mayshar Y, Ben-David U, Lavon N, Biancotti JC, Yakir B, Clark AT, Plath K, Lowry WE, and Benvenisty N** (2010). Identification and classification of chromosomal aberrations in human induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 7, 521-531.
- **Mazereeuw-Hautier J, Wilson LC, Mohammed S, Smallwood D, Shackleton S, Atherton DJ, and Harper JI** (2007). Hutchinson-Gilford progeria syndrome: clinical findings in three patients carrying the G608G mutation in LMNA and review of the literature. *Br J Dermatol* 156, 1308-1314.
- **McClintock D, Ratner D, Lokuge M, Owens DM, Gordon LB, Collins FS, and Djabali K** (2007). The mutant form of lamin A that causes Hutchinson-Gilford progeria is a biomarker of cellular aging in human skin. *PLoS One* 2, e1269.
- **McClung M, Harris ST, Miller PD, Bauer DC, Davison KS, Dian L, Hanley DA, Kendler DL, Yuen CK, and Lewiecki EM** (2013). Bisphosphonate therapy for osteoporosis: benefits, risks, and drug holiday. *Am J Med* 126, 13-20.
- **McKeon FD, Kirschner MW, and Caput D** (1986). Homologies in both primary and secondary structure between nuclear envelope and intermediate filament proteins. *Nature* 319, 463-468.
- **McLaren D, Gorba T, Marguerie de Rotrou A, Pillai G, Chappell C, Stacey A, Lingard S, Falk A, Smith A, Koch P, Brustle O, Vickers R, Tinsley J, Flanders D, Bello P, and Craig S** (2013). Automated large-scale culture and medium-throughput chemical screen for modulators of proliferation and viability of human induced pluripotent stem cell-derived neuroepithelial-like stem cells. *J Biomol Screen* 18, 258-268.
- **McNeish J, Roach M, Hambor J, Mather RJ, Weibley L, Lazzaro J, Gazard J, Schwarz J, Volkmann R, Machacek D, Stice S, Zawadzke L, O'Donnell C, and Hurst R** (2010). High-throughput screening in embryonic stem cell-derived neurons identifies potentiators of alpha-amino-3-hydroxyl-5-methyl-4-isoxazolepropionate-type glutamate receptors. *J Biol Chem* 285, 17209-17217.
- **Menezes MP, Waddell LB, Evesson FJ, Cooper S, Webster R, Jones K, Mowat D, Kiernan MC, Johnston HM, Corbett A, Harbord M, North KN, and Clarke NF** (2012). Importance and challenge of making an early diagnosis in LMNA-related muscular dystrophy. *Neurology* 78, 1258-1263.
- **Mercola M, Colas A, and Willems E** (2013). Induced pluripotent stem cells in cardiovascular drug discovery. *Circ Res* 112, 534-548.
- **Mercuri E, Poppe M, Quinlivan R, Messina S, Kinlali M, Demay L, Bourke J, Richard P, Sewry C, Pike M, Bonne G, Muntoni F, and Bushby K** (2004). Extreme variability of phenotype in patients with an identical missense mutation in the lamin A/C gene: from congenital onset with severe phenotype to milder classic Emery-Dreifuss variant. *Arch Neurol* 61, 690-694.
- **Meregalli M, Farini A, Parolini D, Maciotta S, and Torrente Y** (2010). Stem cell therapies to treat muscular dystrophy: progress to date. *BioDrugs* 24, 237-247.
- **Merideth MA, Gordon LB, Clauss S, Sachdev V, Smith AC, Perry MB, Brewer CC, Zalewski C, Kim HJ, Solomon B, Brooks BP, Gerber LH, Turner ML, Domingo DL, Hart TC, Graf J, Reynolds JC, Gropman A, Yanovski JA, Gerhard-Herman M, Collins FS, Nabel EG, Cannon RO, 3rd, Gahl WA, and Introne WJ** (2008). Phenotype and course of Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *N Engl J Med* 358, 592-604.
- **Meune C, Van Berlo JH, Anselme F, Bonne G, Pinto YM, and Duboc D** (2006). Primary prevention of sudden death in patients with lamin A/C gene mutations. *N Engl J Med* 354, 209-210.

- **Mika S, and Rost B** (2005). NMPdb: Database of Nuclear Matrix Proteins. *Nucleic Acids Res* 33, D160-163.
- **Miyazaki T, Futaki S, Hasegawa K, Kawasaki M, Sanzen N, Hayashi M, Kawase E, Sekiguchi K, Nakatsuji N, and Suemori H** (2008). Recombinant human laminin isoforms can support the undifferentiated growth of human embryonic stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 375, 27-32.
- **Miyoshi N, Ishii H, Nagano H, Haraguchi N, Dewi DL, Kano Y, Nishikawa S, Tanemura M, Mimori K, Tanaka F, Saito T, Nishimura J, Takemasa I, Mizushima T, Ikeda M, Yamamoto H, Sekimoto M, Doki Y, and Mori M** (2011). Reprogramming of mouse and human cells to pluripotency using mature microRNAs. *Cell Stem Cell* 8, 633-638.
- **Moen C** (1982). Orthopaedic aspects of progeria. *J Bone Joint Surg Am* 64, 542-546.
- **Mohyeldin A, Garzon-Muvdi T, and Quinones-Hinojosa A** (2010). Oxygen in stem cell biology: a critical component of the stem cell niche. *Cell Stem Cell* 7, 150-161.
- **Montecucco A, and Biamonti G** (2013). Pre-mRNA processing factors meet the DNA damage response. *Front Genet* 4, 102.
- **Monteiro LZ, Foss-Freitas MC, Junior Montenegro RM, and Foss MC** (2012). Body fat distribution in women with familial partial lipodystrophy caused by mutation in the lamin A/C gene. *Indian J Endocrinol Metab* 16, 136-138.
- **Moore KA, and Lemischka IR** (2006). Stem cells and their niches. *Science* 311, 1880-1885.
- **Moore MJ, Wang Q, Kennedy CJ, and Silver PA** (2010). An alternative splicing network links cell-cycle control to apoptosis. *Cell* 142, 625-636.
- **Mory PB, Crispim F, Freire MB, Salles JE, Valerio CM, Godoy-Matos AF, Dib SA, and Moises RS** (2012). Phenotypic diversity in patients with lipodystrophy associated with LMNA mutations. *Eur J Endocrinol* 167, 423-431.
- **Muchir A, Bonne G, van der Kooi AJ, van Meegen M, Baas F, Bolhuis PA, de Visser M, and Schwartz K** (2000). Identification of mutations in the gene encoding lamins A/C in autosomal dominant limb girdle muscular dystrophy with atrioventricular conduction disturbances (LGMD1B). *Hum Mol Genet* 9, 1453-1459.
- **Muchir A, Pavlidis P, Bonne G, Hayashi YK, and Worman HJ** (2007). Activation of MAPK in hearts of EMD null mice: similarities between mouse models of X-linked and autosomal dominant Emery Dreifuss muscular dystrophy. *Hum Mol Genet* 16, 1884-1895.
- **Musich PR, and Zou Y** (2009). Genomic instability and DNA damage responses in progeria arising from defective maturation of prelamin A. *Aging (Albany NY)* 1, 28-37.
- **Muthyalu S, Raj VR, Mohanty M, Mohanan PV, and Nair PD** (2011). The reversal of diabetes in rat model using mouse insulin producing cells - a combination approach of tissue engineering and macroencapsulation. *Acta Biomater* 7, 2153-2162.
- **Nagaoka M, Si-Tayeb K, Akaike T, and Duncan SA** (2010). Culture of human pluripotent stem cells using completely defined conditions on a recombinant E-cadherin substratum. *BMC Dev Biol* 10, 60.
- **Nakamura S, Makita Y, Takagi A, Hashimoto Y, Takahashi H, Ishida-Yamamoto A, and Iizuka H** (2007). Hutchinson-Gilford progeria syndrome with severe skin calcinosis. *Clin Exp Dermatol* 32, 525-528.
- **Nallan L, Bauer KD, Bendale P, Rivas K, Yokoyama K, Horney CP, Pendyala PR, Floyd D, Lombardo LJ, Williams DK, Hamilton A, Sebti S, Windsor WT, Weber PC, Buckner FS, Chakrabarti D, Gelb MH, and Van Voorhis WC** (2005). Protein farnesyltransferase inhibitors exhibit potent antimalarial activity. *J Med Chem* 48, 3704-3713.
- **Narsinh KH, Jia F, Robbins RC, Kay MA, Longaker MT, and Wu JC** (2011). Generation of adult human induced pluripotent stem cells using nonviral minicircle DNA vectors. *Nat Protoc* 6, 78-88.

- **Navarro CL, Cau P, and Levy N** (2006). Molecular bases of progeroid syndromes. *Hum Mol Genet* 15 Spec No 2, R151-161.
- **Navarro CL, De Sandre-Giovannoli A, Bernard R, Boccaccio I, Boyer A, Genevieve 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, and Levy 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.
- **Nelson TJ, Martinez-Fernandez A, and Terzic A** (2010). Induced pluripotent stem cells: developmental biology to regenerative medicine. *Nat Rev Cardiol* 7, 700-710.
- **Nguyen NH, and Mayhew JF** (2001). Anaesthesia for a child with progeria. *Paediatr Anaesth* 11, 370-371.
- **Nissan X, Blondel S, Navarro C, Maury Y, Denis C, Girard M, Martinat C, De Sandre-Giovannoli A, Levy N, and 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.
- **Nissan X, Larribere L, Saidani M, Hurbain I, Delevoye C, Feteira J, Lemaitre G, Peschanski M, and Baldeschi C** (2011). Functional melanocytes derived from human pluripotent stem cells engraft into pluristratified epidermis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 14861-14866.
- **North AC, Steinert PM, and Parry DA** (1994). Coiled-coil stutter and link segments in keratin and other intermediate filament molecules: a computer modeling study. *Proteins* 20, 174-184.
- **Novelli G, Muchir A, Sangiuolo F, Helbling-Leclerc A, D'Apice MR, Massart C, Capon F, Sbraccia P, Federici M, Lauro R, Tudisco C, Pallotta R, Scarano G, Dallapiccola B, Merlini L, and Bonne G** (2002). Mandibuloacral dysplasia is caused by a mutation in LMNA-encoding lamin A/C. *Am J Hum Genet* 71, 426-431.
- **Oh SK, Kim HS, Ahn HJ, Seol HW, Kim YY, Park YB, Yoon CJ, Kim DW, Kim SH, and Moon SY** (2005). Derivation and characterization of new human embryonic stem cell lines: SNUhES1, SNUhES2, and SNUhES3. *Stem Cells* 23, 211-219.
- **Ohta S, Imaizumi Y, Akamatsu W, Okano H, and Kawakami Y** (2013). Generation of human melanocytes from induced pluripotent stem cells. *Methods Mol Biol* 989, 193-215.
- **Ohyama M** (2007). Hair follicle bulge: a fascinating reservoir of epithelial stem cells. *J Dermatol Sci* 46, 81-89.
- **Okita K, Ichisaka T, and Yamanaka S** (2007). Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* 448, 313-317.
- **Okorokov AL, Rubbi CP, Metcalfe S, and Milner J** (2002). The interaction of p53 with the nuclear matrix is mediated by F-actin and modulated by DNA damage. *Oncogene* 21, 356-367.
- **Olmer R, Haase A, Merkert S, Cui W, Palecek J, Ran C, Kirschning A, Schepers T, Glage S, Miller K, Curnow EC, Hayes ES, and Martin U** (2010). Long term expansion of undifferentiated human iPS and ES cells in suspension culture using a defined medium. *Stem Cell Res* 5, 51-64.
- **Osorio FG, Navarro CL, Cadinanos J, Lopez-Mejia IC, Quiros PM, Bartoli C, Rivera J, Tazi J, Guzman G, Varela I, Depetris D, de Carlos F, Cobo J, Andres V, De Sandre-Giovannoli A, Freije JM, Levy N, and Lopez-Otin C** (2011). Splicing-directed therapy in a new mouse model of human accelerated aging. *Sci Transl Med* 3, 106ra107.
- **Ou-Yang SS, Lu JY, Kong XQ, Liang ZJ, Luo C, and Jiang H** (2012). Computational drug discovery. *Acta Pharmacol Sin* 33, 1131-1140.

- **Paradisi M, McClintock D, Boguslavsky RL, Pedicelli C, Worman HJ, and Djabali K** (2005). Dermal fibroblasts in Hutchinson-Gilford progeria syndrome with the lamin A G608G mutation have dysmorphic nuclei and are hypersensitive to heat stress. *BMC Cell Biol* 6, 27.
- **Park IH, Arora N, Huo H, Maherli N, Ahfeldt T, Shimamura A, Lensch MW, Cowan C, Hochedlinger K, and Daley GQ** (2008a). Disease-specific induced pluripotent stem cells. *Cell* 134, 877-886.
- **Park IH, Zhao R, West JA, Yabuuchi A, Huo H, Ince TA, Lerou PH, Lensch MW, and Daley GQ** (2008b). Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. *Nature* 451, 141-146.
- **Park WY, Hwang CI, Kang MJ, Seo JY, Chung JH, Kim YS, Lee JH, Kim H, Kim KA, Yoo HJ, and Seo JS** (2001). Gene profile of replicative senescence is different from progeria or elderly donor. *Biochem Biophys Res Commun* 282, 934-939.
- **Pendas AM, Zhou Z, Cadinanos J, Freije JM, Wang J, Hultenby K, Astudillo A, Wernerson A, Rodriguez F, Tryggvason K, and Lopez-Otin C** (2002). Defective prelamin A processing and muscular and adipocyte alterations in Zmpste24 metalloproteinase-deficient mice. *Nat Genet* 31, 94-99.
- **Pereira S, Bourgeois P, Navarro C, Esteves-Vieira V, Cau P, De Sandre-Giovannoli A, and Levy N** (2008). HGPS and related premature aging disorders: from genomic identification to the first therapeutic approaches. *Mech Ageing Dev* 129, 449-459.
- **Peter M, Heitlinger E, Haner M, Aebi U, and Nigg EA** (1991). Disassembly of in vitro formed lamin head-to-tail polymers by CDC2 kinase. *EMBO J* 10, 1535-1544.
- **Pierce T, Worman HJ, and Holy J** (1999). Neuronal differentiation of NT2/D1 teratocarcinoma cells is accompanied by a loss of lamin A/C expression and an increase in lamin B1 expression. *Exp Neurol* 157, 241-250.
- **Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, and Marshak DR** (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284, 143-147.
- **Plasilova M, Chattopadhyay C, Pal P, Schaub NA, Buechner SA, Mueller H, Miny P, Ghosh A, and Heinimann K** (2004). Homozygous missense mutation in the lamin A/C gene causes autosomal recessive Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *J Med Genet* 41, 609-614.
- **Plickert G, Frank U, and Muller WA** (2012). Hydractinia, a pioneering model for stem cell biology and reprogramming somatic cells to pluripotency. *Int J Dev Biol* 56, 519-534.
- **Powers RW, 3rd, Kaeberlein M, Caldwell SD, Kennedy BK, and Fields S** (2006). Extension of chronological life span in yeast by decreased TOR pathway signaling. *Genes Dev* 20, 174-184.
- **Price N, Lipton A, Jain VK, and Ruggiero S** (2004). Prevention and management of osteonecrosis of the jaw associated with bisphosphonate therapy. *Support Cancer Ther* 2, 14-17.
- **Price PA, Faus SA, and Williamson MK** (2001). Bisphosphonates alendronate and ibandronate inhibit artery calcification at doses comparable to those that inhibit bone resorption. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21, 817-824.
- **Prockop DJ** (1997). Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* 276, 71-74.
- **Prokocimer M, Barkan R, and Gruenbaum Y** (2013). Hutchinson-Gilford progeria syndrome through the lens of transcription. *Aging Cell*.
- **Puckelwartz MJ, Depreux FF, and McNally EM** (2011). Gene expression, chromosome position and lamin A/C mutations. *Nucleus* 2, 162-167.

- **Quijano-Roy S, Mbieleu B, Bonnemann CG, Jeannet PY, Colomer J, Clarke NF, Cuisset JM, Roper H, De Meirleir L, D'Amico A, Ben Yaou R, Nascimento A, Barois A, Demay L, Bertini E, Ferreiro A, Sewry CA, Romero NB, Ryan M, Muntoni F, Guicheney P, Richard P, Bonne G, and Estournet B** (2008). De novo LMNA mutations cause a new form of congenital muscular dystrophy. *Ann Neurol* 64, 177-186.
- **Raghaw R, Yellaturu C, Deng X, Park EA, and Elam MB** (2008). SREBPs: the crossroads of physiological and pathological lipid homeostasis. *Trends Endocrinol Metab* 19, 65-73.
- **Raices M, and D'Angelo MA** (2012). Nuclear pore complex composition: a new regulator of tissue-specific and developmental functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13, 687-699.
- **Ramjan KA, Roscioli T, Rutsch F, Sillence D, and Munns CF** (2009). Generalized arterial calcification of infancy: treatment with bisphosphonates. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 5, 167-172.
- **Ramos FJ, Chen SC, Garelick MG, Dai DF, Liao CY, Schreiber KH, MacKay VL, An EH, Strong R, Ladiges WC, Rabinovitch PS, Kaeberlein M, and Kennedy BK** (2012). Rapamycin reverses elevated mTORC1 signaling in lamin A/C-deficient mice, rescues cardiac and skeletal muscle function, and extends survival. *Sci Transl Med* 4, 144ra103.
- **Rauch F, Munns CF, Land C, Cheung M, and Glorieux FH** (2009). Risedronate in the treatment of mild pediatric osteogenesis imperfecta: a randomized placebo-controlled study. *J Bone Miner Res* 24, 1282-1289.
- **Ravikumar B, Duden R, and Rubinsztein DC** (2002). Aggregate-prone proteins with polyglutamine and polyalanine expansions are degraded by autophagy. *Hum Mol Genet* 11, 1107-1117.
- **Reboutier D, Troadec MB, Cremet JY, Chauvin L, Guen V, Salaun P, and Prigent C** (2013). Aurora A is involved in central spindle assembly through phosphorylation of Ser 19 in P150Glued. *J Cell Biol* 201, 65-79.
- **Renard D, Fourcade G, Milhaud D, Bessis D, Esteves-Vieira V, Boyer A, Roll P, Bourgeois P, Levy N, and De Sandre-Giovannoli A** (2009). Novel LMNA mutation in atypical Werner syndrome presenting with ischemic disease. *Stroke* 40, e11-14.
- **Renou L, Stora S, Yaou RB, Volk M, Sinkovec M, Demay L, Richard P, Peterlin B, and Bonne G** (2008). Heart-hand syndrome of Slovenian type: a new kind of laminopathy. *J Med Genet* 45, 666-671.
- **Resh MD** (2012). Targeting protein lipidation in disease. *Trends Mol Med* 18, 206-214.
- **Reunert J, Wentzell R, Walter M, Jakubiczka S, Zenker M, Brune T, Rust S, and Marquardt T** (2012). Neonatal progeria: increased ratio of progerin to lamin A leads to progeria of the newborn. *Eur J Hum Genet* 20, 933-937.
- **Rey A** (2003). [Are stem cells well named?]. *Med Sci (Paris)* 19, 645.
- **Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, and Weissman IL** (2001). Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 414, 105-111.
- **Richards SA, Muter J, Ritchie P, Lattanzi G, and 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.
- **Rodriguez S, Coppede F, Sagelius H, and Eriksson M** (2009). Increased expression of the Hutchinson-Gilford progeria syndrome truncated lamin A transcript during cell aging. *Eur J Hum Genet* 17, 928-937.
- **Rosengardten Y, McKenna T, Grochova D, and Eriksson M** (2011). Stem cell depletion in Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Aging Cell* 10, 1011-1020.

- **Rudnik-Schoneborn S, Botzenhart E, Eggermann T, Senderek J, Schoser BG, Schroder R, Wehnert M, Wirth B, and Zerres K** (2007). Mutations of the LMNA gene can mimic autosomal dominant proximal spinal muscular atrophy. *Neurogenetics* 8, 137-142.
- **Rusinol AE, and Sinensky MS** (2006). Farnesylated lamins, progeroid syndromes and farnesyl transferase inhibitors. *J Cell Sci* 119, 3265-3272.
- **Russo V, Rago A, Politano L, Papa AA, Di Meo F, Russo MG, Golino P, Calabro R, and Nigro G** (2012). Increased dispersion of ventricular repolarization in Emery Dreifuss muscular dystrophy patients. *Med Sci Monit* 18, CR643-647.
- **Ryter SW, Cloonan SM, and Choi AM** (2013). Autophagy: A critical regulator of cellular metabolism and homeostasis. *Mol Cells*.
- **Sagelius H, Rosengardten Y, Hanif M, Erdos MR, Rozell B, Collins FS, and Eriksson M** (2008). Targeted transgenic expression of the mutation causing Hutchinson-Gilford progeria syndrome leads to proliferative and degenerative epidermal disease. *J Cell Sci* 121, 969-978.
- **Said Hassane F, Saleh AF, Abes R, Gait MJ, and Lebleu B** (2010). Cell penetrating peptides: overview and applications to the delivery of oligonucleotides. *Cell Mol Life Sci* 67, 715-726.
- **Saj M, Bilinska ZT, Tarnowska A, Sioma A, Bolongo P, Sobieszcanska-Malek M, Michalak E, Golen D, Mazurkiewicz L, Malek L, Walczak E, Fidzianska A, Grzybowski J, Przybylski A, Zielinski T, Korewicki J, Tesson F, and Ploski R** (2013). LMNA mutations in Polish patients with dilated cardiomyopathy: prevalence, clinical characteristics, and in vitro studies. *BMC Med Genet* 14, 55.
- **Sane KM, Mynderse M, Lalonde DT, Dean IS, Wojtkowiak JW, Fouad F, Borch RF, Reiners JJ, Jr., Gibbs RA, and Mattingly RR** (2010). A novel geranylgeranyl transferase inhibitor in combination with lovastatin inhibits proliferation and induces autophagy in STS-26T MPNST cells. *J Pharmacol Exp Ther* 333, 23-33.
- **Saunders LR, Sharma AD, Tawney J, Nakagawa M, Okita K, Yamanaka S, Willenbring H, and Verdin E** (2010). miRNAs regulate SIRT1 expression during mouse embryonic stem cell differentiation and in adult mouse tissues. *Aging (Albany NY)* 2, 415-431.
- **Scaffidi P, and Misteli T** (2005). Reversal of the cellular phenotype in the premature aging disease Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Nat Med* 11, 440-445.
- **Scaffidi P, and Misteli T** (2006). Lamin A-dependent nuclear defects in human aging. *Science* 312, 1059-1063.
- **Scaffidi P, and Misteli T** (2008). Lamin A-dependent misregulation of adult stem cells associated with accelerated ageing. *Nat Cell Biol* 10, 452-459.
- **Schade A, Delyagina E, Scharfenberg D, Skorska A, Lux C, David R, and Steinhoff G** (2013). Innovative Strategy for MicroRNA Delivery in Human Mesenchymal Stem Cells via Magnetic Nanoparticles. *Int J Mol Sci* 14, 10710-10726.
- **Schmidmaier R, Simsek M, Baumann P, Emmerich B, and Meinhardt G** (2006). Synergistic antimyeloma effects of zoledronate and simvastatin. *Anticancer Drugs* 17, 621-629.
- **Schraivogel D, Weinmann L, Beier D, Tabatabai G, Eichner A, Zhu JY, Anton M, Sixt M, Weller M, Beier CP, and Meister G** (2011). CAMTA1 is a novel tumour suppressor regulated by miR-9/9* in glioblastoma stem cells. *EMBO J* 30, 4309-4322.
- **Schreiber KH, and Kennedy BK** (2013). When lamins go bad: nuclear structure and disease. *Cell* 152, 1365-1375.
- **Sebti SM, and Der CJ** (2003). Opinion: Searching for the elusive targets of farnesyltransferase inhibitors. *Nat Rev Cancer* 3, 945-951.
- **Sehdev V, Katsha A, Ecsedy J, Zaika A, Belkhiri A, and El-Rifai W** (2013). The combination of alisertib, an investigational Aurora kinase A inhibitor, and docetaxel promotes

cell death and reduces tumor growth in preclinical cell models of upper gastrointestinal adenocarcinomas. *Cancer* 119, 904-914.

- **Seki T, Yuasa S, Oda M, Egashira T, Yae K, Kusumoto D, Nakata H, Tohyama S, Hashimoto H, Kodaira M, Okada Y, Seimiya H, Fusaki N, Hasegawa M, and Fukuda K** (2010). Generation of induced pluripotent stem cells from human terminally differentiated circulating T cells. *Cell Stem Cell* 7, 11-14.
- **Selcuklu SD, Donoghue MT, Rehmet K, de Souza Gomes M, Fort A, Kovvuru P, Muniyappa MK, Kerin MJ, Enright AJ, and Spillane C** (2012). MicroRNA-9 inhibition of cell proliferation and identification of novel miR-9 targets by transcriptome profiling in breast cancer cells. *J Biol Chem* 287, 29516-29528.
- **Shalev SA, De Sandre-Giovannoli A, Shani AA, and Levy N** (2007). An association of Hutchinson-Gilford progeria and malignancy. *Am J Med Genet A* 143A, 1821-1826.
- **Shekhani MT, Jayanthi AS, Maddodi N, and Setaluri V** (2013). Cancer stem cells and tumor transdifferentiation: implications for novel therapeutic strategies. *Am J Stem Cells* 2, 52-61.
- **Shimada H, Hashimoto Y, Nakada A, Shigeno K, and Nakamura T** (2012). Accelerated generation of human induced pluripotent stem cells with retroviral transduction and chemical inhibitors under physiological hypoxia. *Biochem Biophys Res Commun* 417, 659-664.
- **Shimshi M, Abe E, Fisher EA, Zaidi M, and Fallon JT** (2005). Bisphosphonates induce inflammation and rupture of atherosclerotic plaques in apolipoprotein-E null mice. *Biochem Biophys Res Commun* 328, 790-793.
- **Shukrun R, Pode Shakked N, and Dekel B** (2013). Targeted therapy aimed at cancer stem cells: Wilms' tumor as an example. *Pediatr Nephrol*.
- **Shumaker DK, Dechat T, Kohlmaier A, Adam SA, Bozovsky MR, Erdos MR, Eriksson M, Goldman AE, Khuon S, Collins FS, Jenuwein T, and Goldman RD** (2006). Mutant nuclear lamin A leads to progressive alterations of epigenetic control in premature aging. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 8703-8708.
- **Shumaker DK, Kuczmarski ER, and Goldman RD** (2003). The nucleoskeleton: lamins and actin are major players in essential nuclear functions. *Curr Opin Cell Biol* 15, 358-366.
- **Sicard F, Gayral M, Lulka H, Buscail L, and Cordelier P** (2013). Targeting miR-21 for the therapy of pancreatic cancer. *Mol Ther* 21, 986-994.
- **Simha V, and Garg A** (2002). Body fat distribution and metabolic derangements in patients with familial partial lipodystrophy associated with mandibuloacral dysplasia. *J Clin Endocrinol Metab* 87, 776-785.
- **Simon DN, and Wilson KL** (2011). The nucleoskeleton as a genome-associated dynamic 'network of networks'. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12, 695-708.
- **Simon DN, Zastrow MS, and Wilson KL** (2010). Direct actin binding to A- and B-type lamin tails and actin filament bundling by the lamin A tail. *Nucleus* 1, 264-272.
- **Sinensky M, Fantle K, Trujillo M, McLain T, Kupfer A, and Dalton M** (1994). The processing pathway of prelamin A. *J Cell Sci* 107 (Pt 1), 61-67.
- **Singh H, Mok P, Balakrishnan T, Rahmat SN, and Zweigerdt R** (2010). Up-scaling single cell-inoculated suspension culture of human embryonic stem cells. *Stem Cell Res* 4, 165-179.
- **Sinnecker D, Goedel A, Dorn T, Dirschinger RJ, Moretti A, and Laugwitz KL** (2013). Modeling long-QT syndromes with iPS cells. *J Cardiovasc Transl Res* 6, 31-36.
- **Smirnova L, Gafe A, Seiler A, Schumacher S, Nitsch R, and Wulczyn FG** (2005). Regulation of miRNA expression during neural cell specification. *Eur J Neurosci* 21, 1469-1477.

- **Smythe C, Jenkins HE, and Hutchison CJ** (2000). Incorporation of the nuclear pore basket protein nup153 into nuclear pore structures is dependent upon lamina assembly: evidence from cell-free extracts of *Xenopus* eggs. *EMBO J* 19, 3918-3931.
- **Soldner F, Hockemeyer D, Beard C, Gao Q, Bell GW, Cook EG, Hargus G, Blak A, Cooper O, Mitalipova M, Isacson O, and Jaenisch R** (2009). Parkinson's disease patient-derived induced pluripotent stem cells free of viral reprogramming factors. *Cell* 136, 964-977.
- **Sowa B** (2009). Bilateral shoulder dislocation in a 7-year-old child with progeria syndrome. *Ortop Traumatol Rehabil* 11, 68-71.
- **Spann TP, Goldman AE, Wang C, Huang S, and Goldman RD** (2002). Alteration of nuclear lamin organization inhibits RNA polymerase II-dependent transcription. *J Cell Biol* 156, 603-608.
- **Spann TP, Moir RD, Goldman AE, Stick R, and Goldman RD** (1997). Disruption of nuclear lamin organization alters the distribution of replication factors and inhibits DNA synthesis. *J Cell Biol* 136, 1201-1212.
- **Spradling A, Drummond-Barbosa D, and Kai T** (2001). Stem cells find their niche. *Nature* 414, 98-104.
- **Stadtfeld M, Nagaya M, Utikal J, Weir G, and Hochedlinger K** (2008). Induced pluripotent stem cells generated without viral integration. *Science* 322, 945-949.
- **Steiner D, Khaner H, Cohen M, Even-Ram S, Gil Y, Itsykson P, Turetsky T, Idelson M, Aizenman E, Ram R, Berman-Zaken Y, and Reubinoff B** (2010). Derivation, propagation and controlled differentiation of human embryonic stem cells in suspension. *Nat Biotechnol* 28, 361-364.
- **Stewart C, and Burke B** (1987). Teratocarcinoma stem cells and early mouse embryos contain only a single major lamin polypeptide closely resembling lamin B. *Cell* 51, 383-392.
- **Stierle V, Couprie J, Ostlund C, Krimm I, Zinn-Justin S, Hossenlopp P, Worman HJ, Courvalin JC, and Duband-Goulet I** (2003). The carboxyl-terminal region common to lamins A and C contains a DNA binding domain. *Biochemistry* 42, 4819-4828.
- **Subramanyam D, Lamouille S, Judson RL, Liu JY, Bucay N, Deryck R, and Blelloch R** (2011). Multiple targets of miR-302 and miR-372 promote reprogramming of human fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol* 29, 443-448.
- **Sullivan T, Escalante-Alcalde D, Bhatt H, Anver M, Bhat N, Nagashima K, Stewart CL, and Burke B** (1999). Loss of A-type lamin expression compromises nuclear envelope integrity leading to muscular dystrophy. *J Cell Biol* 147, 913-920.
- **Sumanasekera C, Watt DS, and Stamm S** (2008). Substances that can change alternative splice-site selection. *Biochem Soc Trans* 36, 483-490.
- **Summerton J** (1999). Morpholino antisense oligomers: the case for an RNase H-independent structural type. *Biochim Biophys Acta* 1489, 141-158.
- **Sun N, Panetta NJ, Gupta DM, Wilson KD, Lee A, Jia F, Hu S, Cherry AM, Robbins RC, Longaker MT, and Wu JC** (2009). Feeder-free derivation of induced pluripotent stem cells from adult human adipose stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 15720-15725.
- **Swinney DC, and Anthony J** (2011). How were new medicines discovered? *Nat Rev Drug Discov* 10, 507-519.
- **Szablowska-Gadomska I, Zayat V, and Buzanska L** (2011). Influence of low oxygen tensions on expression of pluripotency genes in stem cells. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 71, 86-93.
- **Tachibana M, Amato P, Sparman M, Gutierrez NM, Tippner-Hedges R, Ma H, Kang E, Fulati A, Lee HS, Sritanaudomchai H, Masterson K, Larson J, Eaton D,**

- Sadler-Fredd K, Battaglia D, Lee D, Wu D, Jensen J, Patton P, Gokhale S, Stouffer RL, Wolf D, and Mitalipov S** (2013). Human embryonic stem cells derived by somatic cell nuclear transfer. *Cell* 153, 1228-1238.
- **Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, and Yamanaka S** (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131, 861-872.
 - **Takahashi K, and Yamanaka S** (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126, 663-676.
 - **Takayama K, Kawabata K, Nagamoto Y, Kishimoto K, Tashiro K, Sakurai F, Tachibana M, Kanda K, Hayakawa T, Furue MK, and Mizuguchi H** (2013). 3D spheroid culture of hESC/hiPSC-derived hepatocyte-like cells for drug toxicity testing. *Biomaterials* 34, 1781-1789.
 - **Takemoto M, Mori S, Kuzuya M, Yoshimoto S, Shimamoto A, Igarashi M, Tanaka Y, Miki T, and Yokote K** (2013). Diagnostic criteria for Werner syndrome based on Japanese nationwide epidemiological survey. *Geriatr Gerontol Int* 13, 475-481.
 - **Taura D, Sone M, Homma K, Oyamada N, Takahashi K, Tamura N, Yamanaka S, and Nakao K** (2009). Induction and isolation of vascular cells from human induced pluripotent stem cells--brief report. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29, 1100-1103.
 - **Taylor MR, Fain PR, Sinagra G, Robinson ML, Robertson AD, Carniel E, Di Lenarda A, Bohlmeier TJ, Ferguson DA, Brodsky GL, Boucek MM, Lascor J, Moss AC, Li WL, Stetler GL, Muntoni F, Bristow MR, and Mestroni L** (2003). Natural history of dilated cardiomyopathy due to lamin A/C gene mutations. *J Am Coll Cardiol* 41, 771-780.
 - **Tazi J, Bakkour N, and Stamm S** (2009). Alternative splicing and disease. *Biochim Biophys Acta* 1792, 14-26.
 - **Tazir M, Azzedine H, Assami S, Sindou P, Nouioua S, Zemmouri R, Hamadouche T, Chaouch M, Feingold J, Vallat JM, Leguern E, and Grid D** (2004). Phenotypic variability in autosomal recessive axonal Charcot-Marie-Tooth disease due to the R298C mutation in lamin A/C. *Brain* 127, 154-163.
 - **Thompson K, Keech F, McLernon DJ, Vinod K, May RJ, Simpson WG, Rogers MJ, and Reid DM** (2011). Fluvastatin does not prevent the acute-phase response to intravenous zoledronic acid in post-menopausal women. *Bone* 49, 140-145.
 - **Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, and Jones JM** (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282, 1145-1147.
 - **Thulin P, Wei T, Werngren O, Cheung L, Fisher RM, Grander D, Corcoran M, and Ehrenborg E** (2013). MicroRNA-9 regulates the expression of peroxisome proliferator-activated receptor delta in human monocytes during the inflammatory response. *Int J Mol Med* 31, 1003-1010.
 - **Tolar J, Xia L, Riddle MJ, Lees CJ, Eide CR, McElmurry RT, Titeux M, Osborn MJ, Lund TC, Hovnanian A, Wagner JE, and Blazar BR** (2011). Induced pluripotent stem cells from individuals with recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *J Invest Dermatol* 131, 848-856.
 - **Tosca L, Uzbekova S, Chabrolle C, and Dupont J** (2007). Possible role of 5'AMP-activated protein kinase in the metformin-mediated arrest of bovine oocytes at the germinal vesicle stage during in vitro maturation. *Biol Reprod* 77, 452-465.
 - **Townley-Tilson WH, Callis TE, and Wang D** (2010). MicroRNAs 1, 133, and 206: critical factors of skeletal and cardiac muscle development, function, and disease. *Int J Biochem Cell Biol* 42, 1252-1255.

- **Ugalde AP, Ramsay AJ, de la Rosa J, Varela I, Marino G, Cadinanos J, Lu J, Freije JM, and Lopez-Otin C** (2011). Aging and chronic DNA damage response activate a regulatory pathway involving miR-29 and p53. *EMBO J* 30, 2219-2232.
- **Uitto J** (2002). Searching for clues to premature aging. *Trends Mol Med* 8, 155-157.
- **Utkal J, Maherli N, Kulalert W, and Hochedlinger K** (2009). Sox2 is dispensable for the reprogramming of melanocytes and melanoma cells into induced pluripotent stem cells. *J Cell Sci* 122, 3502-3510.
- **Uzbekova S, Arlot-Bonnemains Y, Dupont J, Dalbies-Tran R, Papillier P, Pennetier S, Thelie A, Perreau C, Mermilliod P, Prigent C, and Uzbekov R** (2008). Spatio-temporal expression patterns of aurora kinases a, B, and C and cytoplasmic polyadenylation-element-binding protein in bovine oocytes during meiotic maturation. *Biol Reprod* 78, 218-233.
- **van der Kooi AJ, van Meegen M, Ledderhof TM, McNally EM, de Visser M, and Bolhuis PA** (1997). Genetic localization of a newly recognized autosomal dominant limb-girdle muscular dystrophy with cardiac involvement (LGMD1B) to chromosome 1q11-21. *Am J Hum Genet* 60, 891-895.
- **Van Voorhis WC, Rivas KL, Bendale P, Nallan L, Horney C, Barrett LK, Bauer KD, Smart BP, Ankala S, Hucke O, Verlinde CL, Chakrabarti D, Strickland C, Yokoyama K, Buckner FS, Hamilton AD, Williams DK, Lombardo LJ, Floyd D, and Gelb MH** (2007). Efficacy, pharmacokinetics, and metabolism of tetrahydroquinoline inhibitors of Plasmodium falciparum protein farnesyltransferase. *Antimicrob Agents Chemother* 51, 3659-3671.
- **Varady E, Feher E, Levai A, and Battyany I** (2010). Estimation of vessel age and early diagnose of atherosclerosis in progeria syndrome by using echo-tracking. *Clin Hemorheol Microcirc* 44, 297-301.
- **Varela C, Denis JA, Polentes J, Feyeux M, Aubert S, Champon B, Pietu G, Peschanski M, and Lefort N** (2012). Recurrent genomic instability of chromosome 1q in neural derivatives of human embryonic stem cells. *J Clin Invest* 122, 569-574.
- **Varela I, Cadinanos J, Pendas AM, Gutierrez-Fernandez A, Folgueras AR, Sanchez LM, Zhou Z, Rodriguez FJ, Stewart CL, Vega JA, Tryggvason K, Freije JM, and Lopez-Otin C** (2005). Accelerated ageing in mice deficient in Zmpste24 protease is linked to p53 signalling activation. *Nature* 437, 564-568.
- **Varela I, Pereira S, Ugalde AP, Navarro CL, Suarez MF, Cau P, Cadinanos J, Osorio FG, Foray N, Cobo J, de Carlos F, Levy N, Freije JM, and Lopez-Otin C** (2008). Combined treatment with statins and aminobisphosphonates extends longevity in a mouse model of human premature aging. *Nat Med* 14, 767-772.
- **Varga R, Eriksson M, Erdos MR, Olive M, Harten I, Kolodgie F, Capell BC, Cheng J, Faddah D, Perkins S, Avallone H, San H, Qu X, Ganesh S, Gordon LB, Virmani R, Wight TN, Nabel EG, and Collins FS** (2006). Progressive vascular smooth muscle cell defects in a mouse model of Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 3250-3255.
- **Verstraeten VL, Broers JL, van Steensel MA, Zinn-Justin S, Ramaekers FC, Steijlen PM, Kamps M, Kuijpers HJ, Merckx D, Smeets HJ, Hennekam RC, Marcelis CL, and van den Wijngaard A** (2006). Compound heterozygosity for mutations in LMNA causes a progeria syndrome without prelamin A accumulation. *Hum Mol Genet* 15, 2509-2522.
- **Verstraeten VL, Peckham LA, Olive M, Capell BC, Collins FS, Nabel EG, Young SG, Fong LG, and Lammerding J** (2011). Protein farnesylation inhibitors cause donut-shaped cell nuclei attributable to a centrosome separation defect. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 4997-5002.

- **Vickaryous MK, and Hall BK** (2006). Human cell type diversity, evolution, development, and classification with special reference to cells derived from the neural crest. *Biol Rev Camb Philos Soc* 81, 425-455.
- **Vierck JL, McNamara JP, and Dodson MV** (1996). Proliferation and differentiation of progeny of ovine unilocular fat cells (adipofibroblasts). *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 32, 564-572.
- **Vigouroux C, Magre J, Vantyghem MC, Bourut C, Lascols O, Shackleton S, Lloyd DJ, Guerci B, Padova G, Valensi P, Grimaldi A, Piquemal R, Touraine P, Trembath RC, and Capeau J** (2000). Lamin A/C gene: sex-determined expression of mutations in Dunnigan-type familial partial lipodystrophy and absence of coding mutations in congenital and acquired generalized lipodystrophy. *Diabetes* 49, 1958-1962.
- **Villa-Bellosta R, Rivera-Torres J, Osorio FG, Acin-Perez R, Enriquez JA, Lopez-Otin C, and Andres V** (2013). Defective extracellular pyrophosphate metabolism promotes vascular calcification in a mouse model of hutchinson-gilford progeria syndrome that is ameliorated on pyrophosphate treatment. *Circulation* 127, 2442-2451.
- **Villa-Diaz LG, Ross AM, Lahann J, and Krebsbach PH** (2013). Concise review: The evolution of human pluripotent stem cell culture: from feeder cells to synthetic coatings. *Stem Cells* 31, 1-7.
- **Vincent M, Lauriault P, Dubois MF, Lavoie S, Bensaude O, and Chabot B** (1996). The nuclear matrix protein p255 is a highly phosphorylated form of RNA polymerase II largest subunit which associates with spliceosomes. *Nucleic Acids Res* 24, 4649-4652.
- **Viteri G, Chung YW, and 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.
- **Vlcek S, and Foisner R** (2007). Lamins and lamin-associated proteins in aging and disease. *Curr Opin Cell Biol* 19, 298-304.
- **Volkova EG, Kurchashova SY, Polyakov VY, and Sheval EV** (2011). Self-organization of cellular structures induced by the overexpression of nuclear envelope proteins: a correlative light and electron microscopy study. *J Electron Microsc (Tokyo)* 60, 57-71.
- **Wang F, Yin Y, Ye X, Liu K, Zhu H, Wang L, Chiourea M, Okuka M, Ji G, Dan J, Zuo B, Li M, Zhang Q, Liu N, Chen L, Pan X, Gagos S, Keefe DL, and Liu L** (2012). Molecular insights into the heterogeneity of telomere reprogramming in induced pluripotent stem cells. *Cell Res* 22, 757-768.
- **Wang H, Sarikonda G, Puan KJ, Tanaka Y, Feng J, Giner JL, Cao R, Monkkonen J, Oldfield E, and Morita CT** (2011). Indirect stimulation of human Vgamma2Vdelta2 T cells through alterations in isoprenoid metabolism. *J Immunol* 187, 5099-5113.
- **Wang Y, and Adjaye J** (2011). A cyclic AMP analog, 8-Br-cAMP, enhances the induction of pluripotency in human fibroblast cells. *Stem Cell Rev* 7, 331-341.
- **Wang Y, Panteleyev AA, Owens DM, Djabali K, Stewart CL, and Worman HJ** (2008). Epidermal expression of the truncated prelamin A causing Hutchinson-Gilford progeria syndrome: effects on keratinocytes, hair and skin. *Hum Mol Genet* 17, 2357-2369.
- **Warren L, Manos PD, Ahfeldt T, Loh YH, Li H, Lau F, Ebina W, Mandal PK, Smith ZD, Meissner A, Daley GQ, Brack AS, Collins JJ, Cowan C, Schlaeger TM, and Rossi DJ** (2010). Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA. *Cell Stem Cell* 7, 618-630.
- **Wenzel V, Roedl D, Gabriel D, Gordon LB, Herlyn M, Schneider R, Ring J, and Djabali K** (2012). Naive adult stem cells from patients with Hutchinson-Gilford progeria syndrome express low levels of progerin in vivo. *Biol Open* 1, 516-526.

- **Weterings AA, van Rijsingen IA, Plomp AS, Zwinderman AH, Lekanne Deprez RH, Mannens MM, van den Bergh Weerman MA, van der Wal AC, and Pinto-Sietsma SJ** (2013). A novel lamin A/C mutation in a Dutch family with premature atherosclerosis. *Atherosclerosis* 229, 169-173.
- **Will CL, and Luhrmann R** (2001). Spliceosomal UsnRNP biogenesis, structure and function. *Curr Opin Cell Biol* 13, 290-301.
- **Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, and Campbell KH** (1997). Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 385, 810-813.
- **Woltjen K, Michael IP, Mohseni P, Desai R, Mileikovsky M, Hamalainen R, Cowling R, Wang W, Liu P, Gertsenstein M, Kaji K, Sung HK, and Nagy A** (2009). piggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nature* 458, 766-770.
- **Wong AP, and Rossant J** (2013). Generation of Lung Epithelium from Pluripotent Stem Cells. *Curr Pathobiol Rep* 1, 137-145.
- **Wong CW, Hou PS, Tseng SF, Chien CL, Wu KJ, Chen HF, Ho HN, Kyo S, and Teng SC** (2010). Kruppel-like transcription factor 4 contributes to maintenance of telomerase activity in stem cells. *Stem Cells* 28, 1510-1517.
- **Wong VW, Levi B, Rajadas J, Longaker MT, and Gurtner GC** (2012). Stem cell niches for skin regeneration. *Int J Biomater* 2012, 926059.
- **Wood JG, Rogina B, Lavu S, Howitz K, Helfand SL, Tatar M, and Sinclair D** (2004). Sirtuin activators mimic caloric restriction and delay ageing in metazoans. *Nature* 430, 686-689.
- **Wydner KL, McNeil JA, Lin F, Worman HJ, and Lawrence JB** (1996). Chromosomal assignment of human nuclear envelope protein genes LMNA, LMNB1, and LBR by fluorescence in situ hybridization. *Genomics* 32, 474-478.
- **Xia X, and Wong ST** (2012). Concise review: a high-content screening approach to stem cell research and drug discovery. *Stem Cells* 30, 1800-1807.
- **Xie LQ, Sun HP, Wang T, Tang HL, Wang P, Zhu JH, Yao ZW, and Feng XY** (2013). Reprogramming of adult human neural stem cells into induced pluripotent stem cells. *Chin Med J (Engl)* 126, 1138-1143.
- **Xiong Z, Lu Y, Xue J, Luo S, Xu X, Zhang L, Peng H, Li W, Chen D, Hu Z, and Xia K** (2013). Hutchinson-Gilford progeria syndrome accompanied by severe skeletal abnormalities in two Chinese siblings: two case reports. *J Med Case Rep* 7, 63.
- **Xu C, Inokuma MS, Denham J, Golds K, Kundu P, Gold JD, and Carpenter MK** (2001). Feeder-free growth of undifferentiated human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 19, 971-974.
- **Yamanaka S, and Blau HM** (2010). Nuclear reprogramming to a pluripotent state by three approaches. *Nature* 465, 704-712.
- **Yang SH, Andres DA, Spielmann HP, Young SG, and Fong LG** (2008). Progerin elicits disease phenotypes of progeria in mice whether or not it is farnesylated. *J Clin Invest* 118, 3291-3300.
- **Yang SH, Bergo MO, Toth JI, Qiao X, Hu Y, Sandoval S, Meta M, Bendale P, Gelb MH, Young SG, and Fong LG** (2005). Blocking protein farnesyltransferase improves nuclear blebbing in mouse fibroblasts with a targeted Hutchinson-Gilford progeria syndrome mutation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 10291-10296.
- **Yang SH, Chang SY, Andres DA, Spielmann HP, Young SG, and Fong LG** (2006). Assessing the efficacy of protein farnesyltransferase inhibitors in mouse models of progeria. *J Lipid Res* 47, 400-405.
- **Yang SH, Meta M, Qiao X, Frost D, Bauch J, Coffinier C, Majumdar S, Bergo MO, Young SG, and Fong LG** (2006). A farnesyltransferase inhibitor improves disease

phenotypes in mice with a Hutchinson-Gilford progeria syndrome mutation. *J Clin Invest* 116, 2115-2121.

- **Yoo AS, Staahl BT, Chen L, and Crabtree GR** (2009). MicroRNA-mediated switching of chromatin-remodelling complexes in neural development. *Nature* 460, 642-646.
- **Yoshida Y, Takahashi K, Okita K, Ichisaka T, and Yamanaka S** (2009). Hypoxia enhances the generation of induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 5, 237-241.
- **Young HE, and Black AC, Jr.** (2004). Adult stem cells. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 276, 75-102.
- **Young HE, Mancini ML, Wright RP, Smith JC, Black AC, Jr., Reagan CR, and Lucas PA** (1995). Mesenchymal stem cells reside within the connective tissues of many organs. *Dev Dyn* 202, 137-144.
- **Young HE, Rogers JJ, Adkison LR, Lucas PA, and Black AC** (1998). Muscle morphogenetic protein induces myogenic gene expression in Swiss-3T3 cells. *Wound Repair Regen* 6, 543-554.
- **Young SG, Yang SH, Davies BS, Jung HJ, and Fong LG** (2013). Targeting protein prenylation in progeria. *Sci Transl Med* 5, 171ps173.
- **Yu J, Hu K, Smuga-Otto K, Tian S, Stewart R, Slukvin, II, and Thomson JA** (2009). Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences. *Science* 324, 797-801.
- **Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, Nie J, Jonsdottir GA, Ruotti V, Stewart R, Slukvin, II, and Thomson JA** (2007). Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 318, 1917-1920.
- **Yulin X, Lizhen L, Lifei Z, Shan F, Ru L, Kaimin H, and Huang H** (2012). Efficient generation of induced pluripotent stem cells from human bone marrow mesenchymal stem cells. *Folia Biol (Praha)* 58, 221-230.
- **Zbarskii IB, and Perevoshchikova KA** (1951). [Nature of contracting substance in the cell nucleus]. *Biokhimiia* 16, 547-555.
- **Zeng X, and Rao MS** (2007). Human embryonic stem cells: long term stability, absence of senescence and a potential cell source for neural replacement. *Neuroscience* 145, 1348-1358.
- **Zhang J, Chintalgattu V, Shih T, Ai D, Xia Y, and Khakoo AY** (2011a). MicroRNA-9 is an activation-induced regulator of PDGFR-beta expression in cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* 51, 337-346.
- **Zhang J, Lian Q, Zhu G, Zhou F, Sui L, Tan C, Mutualif RA, Navasankari R, Zhang Y, Tse HF, Stewart CL, and Colman A** (2011b). A human iPSC model of Hutchinson Gilford Progeria reveals vascular smooth muscle and mesenchymal stem cell defects. *Cell Stem Cell* 8, 31-45.
- **Zhang JH, Chung TD, and Oldenburg KR** (1999). A Simple Statistical Parameter for Use in Evaluation and Validation of High Throughput Screening Assays. *J Biomol Screen* 4, 67-73.
- **Zhao C, Sun G, Li S, and Shi Y** (2009). A feedback regulatory loop involving microRNA-9 and nuclear receptor TLX in neural stem cell fate determination. *Nat Struct Mol Biol* 16, 365-371.
- **Zhou W, and Freed CR** (2009). Adenoviral gene delivery can reprogram human fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Stem Cells* 27, 2667-2674.
- **Zhu S, Li W, Zhou H, Wei W, Ambasudhan R, Lin T, Kim J, Zhang K, and Ding S** (2010). Reprogramming of human primary somatic cells by OCT4 and chemical compounds. *Cell Stem Cell* 7, 651-655.

