



HAL
open science

Rôle de la PARylation sur l'apparition des troubles cardiovasculaires dans la progeria de Hutchinson-Gilford

Déborah Cardoso

► **To cite this version:**

Déborah Cardoso. Rôle de la PARylation sur l'apparition des troubles cardiovasculaires dans la progeria de Hutchinson-Gilford. Médecine humaine et pathologie. Sorbonne Université, 2022. Français. NNT : 2022SORUS020 . tel-03973171

HAL Id: tel-03973171

<https://theses.hal.science/tel-03973171>

Submitted on 4 Feb 2023

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

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



Sorbonne Université

École doctorale Complexité du vivant

Centre de recherche en Myologie

Sorbonne Université Inserm UMRS 974 – Institut de Myologie

THÈSE

Rôle de la PARylation sur l'apparition des troubles cardiovasculaires dans la progéria de Hutchinson-Gilford

Soutenue par Déborah Cardoso

Dirigée par le Dr. Antoine Muchir

Présentée et soutenue publiquement le jeudi 3 février 2022

Pour l'obtention du titre de Docteur de Sorbonne Université

Devant un jury composé de :

Madame le Dr. Pascale Bertrand

Rapporteur

Monsieur le Dr. Mathias Mericskay

Rapporteur

Madame le Dr. Claire Navarro

Examineur

Monsieur le Pr. Onnik Agbulut

Président du jury

Monsieur le Dr. Antoine Muchir

Directeur de thèse



Sorbonne Université

École doctorale Complexité du vivant

Centre de recherche en Myologie

Sorbonne Université Inserm UMRS 974 – Institut de Myologie

THÈSE

Rôle de la PARylation sur l'apparition des troubles cardiovasculaires dans la progéria de Hutchinson-Gilford

Soutenue par Déborah Cardoso

Dirigée par le Dr. Antoine Muchir

Présentée et soutenue publiquement le jeudi 3 février 2022

Pour l'obtention du titre de Docteur de Sorbonne Université

Devant un jury composé de :

Madame le Dr. Pascale Bertrand

Monsieur le Dr. Mathias Mericskay

Madame le Dr. Claire Navarro

Monsieur le Pr. Onnik Agbulut

Monsieur le Dr. Antoine Muchir

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Président du jury

Directeur de thèse

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury en commençant par le Pr. Onnik Agbulut qui avait déjà accepté de faire partie de mon comité de suivi et qui me fait l'honneur de présider le jury de thèse. Je remercie également le Dr. Pascale Bertrand et le Dr. Mathias Mericskay pour avoir accepté et pris le temps d'être rapporteurs de mon travail. Je remercie aussi le Dr. Claire Navarro pour son rôle d'examinatrice. Je suis reconnaissante envers l'ensemble de ces experts qui n'ont pas hésité à évaluer mon projet de thèse.

Parce qu'une thèse ne peut se faire seule, je tiens à remercier tout particulièrement Antoine, mon directeur de thèse, pour la confiance qu'il m'a accordée dès mon arrivée. Il a su m'orienter sur un projet qui me tenait à cœur tout en me laissant l'autonomie dont j'avais besoin. J'ai vraiment apprécié travailler dans un environnement détendu et très souvent, plein d'humour. Je le remercie pour son enthousiasme, sa disponibilité et ses brillantes idées qui m'ont permis de mener à bien ce travail de thèse.

Je remercie également l'école doctorale 515 « Complexité du Vivant » de Sorbonne Université pour le financement de mon doctorat. Un grand merci aussi aux enseignants-chercheurs de l'UFR « Sciences de la vie » qui m'ont intégrée au sein de leur équipe pédagogique dans le cadre de ma mission de chargée d'enseignement. Je les remercie pour cette expérience très enrichissante et plaisante que j'ai eu l'occasion de vivre pendant mes 3 années de thèse.

J'adresse aussi mes remerciements à Xavier Nissan, Solenn Guilbert, Laurence Colleaux et Aurélie Carabalona pour leur collaboration sur le projet PARaging. Merci également à Inès Barthélémy et Stéphane Blot pour m'avoir donné l'opportunité de travailler sur le projet ReNARD. Mon travail de thèse a pu aboutir grâce à la contribution de chacun d'entre eux.

Je remercie très sincèrement tous les membres de l'équipe 9 qui m'ont accompagnée au cours de ces 3 années de thèse et qui sont devenus au cours du temps, de véritables amis. Merci à Caroline pour tous ces fous rires et pour l'écoute dont elle a fait preuve à mon égard. Je n'oublierai jamais son humour ainsi que sa positivité qui résiste à toute épreuve. Je remercie Cécile, qui n'a jamais hésité à m'aider. J'ai beaucoup appris à

ses côtés notamment grâce à ses très bons conseils de labo. Un très grand merci à Lorenzo dont je suis très reconnaissante du temps accordé à chaque fois que j'en avais besoin. Merci à Nicolas, avec qui ce fût toujours un plaisir de discuter tant il est passionné de tout. Nos nombreuses conversations m'ont permis d'acquérir différents regards aussi bien sur le plan scientifique que sur des sujets du quotidien. Merci à Stéphanie pour son âme généreuse et sa joie de vivre. Elle a su m'écouter et être présente quand j'en avais besoin. Je les remercie tous ainsi qu'Antoine pour leur soutien dans mon travail de thèse qui n'aurait pas été possible sans l'aide de chacun d'entre eux. Merci à cette superbe équipe pour tous les bons moments passés ensemble et ceux qui restent à venir.

Un grand merci également au groupe « crunch » avec qui j'ai partagé des bons moments tant au labo qu'en dehors. Merci à Lucile pour sa bonne humeur ainsi que pour les passions que nous avons partagées comme les crok'n'nuts, le Doubs mais aussi les brunchs. Merci à Mathilde que j'admire pour son imagination débordante et merci à Zoheir pour sa gentillesse et sa patience. Je ne suis pas près d'oublier sa disponibilité pour l'analyse d'images ou les différents problèmes informatiques que j'ai rencontrés. Merci à Chiara qui a été un vrai rayon de soleil, toujours joyeuse et partante pour faire la fête. Merci aussi à Massiré, sur qui on peut toujours compter pour aller danser. Merci à Arielle et Mohamed pour leur présence au cross du Figaro que nous avons commencé et terminé ensemble ! Merci à Cynthia pour sa sérénité très réconfortante. Un très sincère merci à Marie-Thérèse, arrivée trop tard au labo, pour toute l'attention qu'elle m'a accordée dans les moments de doute. Je n'oublierai pas sa gentillesse ni son soutien.

Un très grand merci au groupe des « pirates » pour leur bonne humeur et toutes ces soirées en espérant qu'il y en ait pleines d'autres. Merci à Amélie, Cloé, Odessa, Juliette, Benoit, Nicolas, Axel, Samy, Morgane et Marius, sans qui mes 3 années de thèse n'auraient pu être aussi drôles !

Je remercie aussi Alexandrine et Bérénice avec qui j'ai eu l'occasion de partager des bons moments lors de cours d'aquabike, de hula hoop mais aussi de gym suédoise. Merci pour leur gentillesse, leur soutien ainsi que toutes ces initiatives sportives qui constituent de réels souvenirs.

Je tiens également à remercier Élise, Delphine, Marie-Ange et Florence que j'ai pu croiser au labo, au bar ou lors de congrès. Merci pour leur disponibilité, leur gentillesse et leur humour. J'ai vraiment apprécié tous les moments passés ensemble au cours de ces 3

années.

Je remercie aussi les personnes du 105 que je n'ai pas encore citées avec qui j'ai pu partager des moments autour d'un café, d'un repas ou autre : Anne, Sestina, Aurore, Sofia, Pierre, Christel, Sonia, Alessandra, Thibault, Bruno, Pierra, France, Steeve, Damien, Céline B., Celine A. et Chloé.

Un grand merci à tous ceux qui ont été de passage au labo mais qui ont néanmoins laissé un bon souvenir tant par leur joie de vivre que par leur gentillesse. Merci à Jacqueline, Lucie, Kenza, Corentin et Salahdin qui ont rendu mes journées au labo plus drôles et sont devenus de véritables amis. Merci à Meryem et Lylia pour les nombreuses pauses goûters que je n'oublierai jamais. Enfin, merci à Samar, Pauline et Victor pour leur bonne humeur et les bons moments passés au labo ou à l'extérieur dont je garderai d'excellents souvenirs. Ces stagiaires ont tous rendu ma thèse enrichissante tant sur le plan scientifique que sur le plan humain. Je leur en suis très reconnaissante et leur souhaite le meilleur pour la suite.

Je remercie également Saline, Éline, Alexandra, Charles, Justine et Maureen avec qui nous avons partagé nos premières galères de stagiaires à Babinski mais surtout de très bons moments inoubliables comme cette semaine de congrès à Bordeaux.

Merci aussi aux membres du Centre de recherche en Myologie que je n'ai pas encore cités. Merci à Gisèle qui m'a accueillie dans son équipe pour mon stage de Master 2. Merci à Blanca, Isabelle et Anne qui m'ont guidée dans mes débuts au sein du laboratoire. Merci pour tout le temps qu'elles m'ont accordé et notamment pour leurs conseils judicieux et pertinents.

J'adresse mes sincères remerciements à Laura et Zohra qui ont gentiment proposé de relire mon manuscrit de thèse. J'ai beaucoup apprécié leur retour constructif à la suite d'une lecture avec autant d'attention dont je leur suis très reconnaissante.

Enfin, je terminerais mes remerciements par ceux qui m'ont soutenue pendant ces 3 années de thèse mais qui me soutiennent depuis bien plus longtemps, voire depuis toujours.

Merci à Célia, Farah, Chloé, Juliette, Julie et Aurélie qui n'ont jamais cessé de prendre des nouvelles de l'avancée de mon projet de thèse. Elles ont toujours fait preuve de beaucoup d'intérêt envers mes travaux de recherche mais aussi envers mes futurs

projets. Je les remercie pour leur soutien, leur bienveillance et leurs encouragements dont j'espère pouvoir bénéficier encore longtemps.

Merci à toute ma famille et belle-famille pour leur soutien. Merci à ma sœur qui n'a jamais cessé de prendre de mes nouvelles malgré les milliers de kilomètres qui nous séparent. Merci à mon père de m'avoir donné cette force de caractère qui me permet de terminer tout ce que j'entreprends. Merci à ma mère de m'avoir autant aidé pendant ces longs mois de rédaction afin que je puisse me concentrer sur mon travail. J'adresse ainsi un immense merci à mes parents qui m'ont toujours soutenue sans conditions dans les choix que j'ai faits. Merci pour tout... Sans eux, je n'aurais jamais pu en arriver là et je continuerai d'avancer pour qu'ils restent fiers de moi.

Enfin, merci à ce camarade de classe du lycée qui est aujourd'hui bien plus que ça... Merci infiniment à Benjamin qui partage ma vie avec autant d'amour. Son soutien sans faille, ses encouragements et sa confiance en moi m'ont porté tout au long de mon parcours universitaire. Merci d'être toujours là pour moi. À ses côtés, tout devient possible. Je mesure la chance que j'ai de l'avoir rencontré. Nous avons réalisé ensemble de beaux projets et j'espère que ceux qui restent à venir auront autant de succès.

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES	10
LISTE DES FIGURES	12
LISTE DES TABLES	13
LISTE DES ABRÉVIATIONS	14
RÉSUMÉ.....	20
ABSTRACT.....	21
CHAPITRE 1 : INTRODUCTION	23
1.1. Des lamines aux laminopathies.....	27
1.1.1. Généralités	27
1.1.2. Des gènes aux protéines	28
1.1.3. Structure des lamines	33
1.1.4. Localisation et dynamique au cours du cycle cellulaire.....	36
1.1.5. Fonctions	38
A. Architecture du noyau.....	38
B. Régulation de la chromatine	39
i. Organisation de la chromatine	39
ii. Dommages à l'ADN	42
iii. Réplication et transcription de l'ADN.....	43
iv. Homéostasie des télomères.....	44
C. Mécanotransduction	45
1.1.6. Laminopathies	46
A. Laminopathies des muscles striés	46
B. Lipodystrophies.....	47
C. Laminopathies du nerf périphérique	47
D. Laminopathies multi-systémiques.....	48
1.2. Focus sur une laminopathie : La progéria de Hutchinson-Gilford	49
1.2.1. Généralités	49
1.2.2. Épidémiologie	49
1.2.3. Phénotype clinique.....	50
A. Anomalies osseuses et tendineuses	50
B. Perte du tissu adipeux sous-cutané et alopécie	51
C. Athérosclérose sévère et pathologies cardiovasculaires	52
D. Phénotypes du vieillissement absents de la progéria	52
1.2.4. Physiopathologie.....	53
1.2.5. Mécanismes moléculaires	56
A. Lien entre vieillissement et progéria de Hutchinson-Gilford.....	56
B. Altération de la structure nucléaire et de la résistance aux contraintes mécaniques.....	57
C. Désorganisation de la chromatine et changements épigénétiques	58
D. Dérégulation de l'expression génique et altération des voies de signalisation	59
E. Dommages à l'ADN et instabilité génomique	62
F. Dysfonction mitochondriale.....	64
G. Sénescence et SAPS.....	65
H. Raccourcissement des télomères.....	66
I. Épuisement des cellules souches adultes	67
1.2.6. Modèles d'étude	68
A. In vitro.....	69
B. In vivo	69
1.2.7. Traitements et perspectives thérapeutiques.....	72
A. Inhiber l'expression de la progérine.....	73
B. Inhiber la prénylation de la progérine	74
C. Augmenter l'élimination de la progérine	75
D. Diminuer les effets toxiques de la progérine.....	75
1.3. Système cardiovasculaire : physiopathologie de la paroi aortique et des VSMCs	79
1.3.1. Généralités	79
1.3.2. L'aorte.....	79
1.3.3. Structure et fonction des cellules VSMCs	81
A. Phénotype contractile.....	82
B. Phénotype synthétique	82
1.3.4. Plasticité des VSMCs.....	83

1.3.5.	VSMCs dans la progéria de Hutchinson-Gilford	85
A.	Perte des VSMCs vasculaires	86
B.	Athérosclérose	87
C.	Calcification vasculaire	87
1.4.	PARylation	89
1.4.1.	Histoire	89
1.4.2.	Acteurs de la PARylation	90
A.	Poly(ADP-ribose) polymérase (PARPs)	90
B.	Poly(ADP-ribose) glycohydrolases (PARGs)	94
1.4.3.	Fonctions de la PARylation	96
A.	Rôles cytoprotecteurs de la PARylation	96
B.	Rôles cytotoxiques de la PARylation	99
1.4.4.	Métabolisme du NAD ⁺	102
CHAPITRE 2 : RÉSULTATS ET DISCUSSION		107
2.1.	Altération de la PARylation dans la progéria : impact sur la physiopathologie vasculaire	111
2.1.1.	Contexte et positionnement de l'étude	111
A.	Introduction	111
B.	Objectifs	112
C.	Hypothèses	112
D.	Impact	112
2.1.2.	Article n°1: Targeting PARylation improves aortic disease in Hutchinson-Gilford progeria syndrome ...	113
2.1.3.	Données complémentaires	139
A.	Résultats complémentaires	139
B.	Matériels et méthodes complémentaires	148
2.1.4.	Discussion et perspectives	151
2.2.	Projet annexe : rôle de la PARylation sur la fonction cardiaque et musculaire dans la dystrophie musculaire de Duchenne	159
2.2.1.	Contexte et objectifs de l'étude	159
A.	Introduction	159
B.	Hypothèses	159
C.	Objectifs	160
D.	Impact	160
2.2.2.	Article n°2: Replenishing NAD ⁺ content improves striated muscle function in GRMD dogs	161
CHAPITRE 3 : CONCLUSION GENERALE		181
CHAPITRE 4 : BIBLIOGRAPHIE		185
CHAPITRE 5 : ANNEXES		217
5.1.	Article n°3 (REVUE)	219
5.2.	Article n°4 (REVUE)	237
CHAPITRE 6 : APPENDICES		249
6.1.	Article n°5	251

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Structure des gènes LMNA, LMNB1 et LMNB2 codant les lamines de type A, les lamines B1 ainsi que les lamines B2 respectivement	30
Figure 2 : Modifications post-traductionnelles des lamines A et B	31
Figure 3 : Modifications post-traductionnelles des prélamines	32
Figure 4 : Schéma des différences de structure entre les protéines des FI cytoplasmiques et les lamines	34
Figure 5 : Constituants du cytosquelette et lamines en microscopie électronique	35
Figure 6 : Schéma de l'assemblage des lamines en filaments intermédiaires	36
Figure 7 : Modélisation numérique de l'enveloppe nucléaire	37
Figure 8 : Domaines associés aux lamines (LADs).....	41
Figure 9 : Protéines impliquées dans la mécanotransduction	45
Figure 10 : Phénotypes des laminopathies	48
Figure 11 : Évolution du phénotype clinique de la progéria de Hutchinson-Gilford	51
Figure 12 : Phénotypes cliniques de la progéria de Hutchinson-Gilford communs et différents du vieillissement physiologique.....	53
Figure 13 : Synthèse de la lamine A chez un sujet sain (gauche) et synthèse de la progérine chez un sujet atteint de la progéria (droite)	54
Figure 14 : Synthèse de la progérine.....	55
Figure 15 : L'expression de la progérine induit une déformation de l'enveloppe nucléaire présentant des bourgeonnements et des replis caractéristiques des cellules HGPS	58
Figure 16 : Instabilité génomique des cellules HGPS.....	64
Figure 17 : Mécanismes moléculaires à l'origine de la sénescence des cellules HGPS.....	68
Figure 18 : Mécanismes ciblés par les potentielles stratégies de traitement pour la progéria.....	77
Figure 19 : Physiologie de l'aorte	81
Figure 20 : Plasticité phénotypique des cellules musculaires lisses (VSMCs)	85
Figure 21 : Poly(ADP-ribosylation)	91
Figure 22 : Principaux partenaires des poly(ADP-ribose) polymérases (PARP) et leur fonction associée	94
Figure 23 : Fonctions cytoprotectrices et cytotoxiques de la poly(ADP-Ribosylation) (PARylation).....	96
Figure 24 : Poly(ADP-ribose) polymérase et réparation des dommages à l'ADN.....	99
Figure 25 : La Parthanatos	101
Figure 26 : Rôle de la poly(ADP-ribose) polymérase (PARP-1) dans les voies de mort cellulaire.....	102
Figure 27 : Métabolisme du nicotinamide adénine dinucléotide (NAD ⁺).....	105
Figure 28 : Increased aortic cell death in <i>Lmna</i> ^{G609G/G609G} mice	131
Figure 29 : Increased apoptosis of cultured VSMCs from <i>Lmna</i> ^{G609G/G609G}	132
Figure 30 : Increased Global Poly(ADP-ribosylation) participates in altered NAD ⁺ metabolism in <i>Lmna</i> ^{G609G/G609G} models.....	134
Figure 31 : High-throughput screening of on HGPS-VSMCs allows Z identification for treatment <i>Lmna</i> ^{G609G/G609G} models	135
Figure 32 : Z treatment restores NAD ⁺ levels and improves aortic disease.....	137
Figure 33 : Altération de la fonction mitochondriale des VSMCs <i>Lmna</i> ^{G609G/G609G}	141
Figure 34 : Fragmentation du réseau mitochondriale des VSMCs <i>Lmna</i> ^{G609G/G609G}	142
Figure 35 : Modifications épigénétiques des VSMCs <i>Lmna</i> ^{G609G/G609G}	143
Figure 36 : Traitement in vitro des VSMCs à l'olaparib.....	145
Figure 37 : Expression d'une lamines A tronquée induite par un PMO dans les VSMCs.....	147

Figure 38 : <i>NAD⁺ salvage pathway is altered in striated muscles of golden retriever muscular dystrophy</i>	173
Figure 39 : <i>Global Poly(ADP-ribosylation) is increased in striated muscles of golden retriever muscular dystrophy</i>	174
Figure 40 : <i>NAM supplementation improves NAD⁺ levels in striated muscles of golden retriever muscular dystrophy</i>	175
Figure 41 : <i>NAM supplementation stabilized muscular function of golden retriever muscular dystrophy</i>	176
Figure 42 : <i>Working model</i>	177
Figure 43 : <i>Golden retriever model of muscular dystrophy: a more translatable model to human DMD</i>	180
Figure 44 : <i>Schéma bilan représentant le mécanisme par lequel la PARylation conduit à la perte des VSMCs <i>Lmna</i>^{G609G/G609G}</i>	184

LISTE DES TABLES

Table 1 : <i>Classification des protéines des filaments intermédiaires</i>	27
Table 2 : <i>Isoformes des lamines nucléaires humaines</i>	28
Table 3 : <i>Principaux modèles d'étude de la progéria</i>	72
Table 4 : <i>Résumé des molécules thérapeutiques étudiées dans la HGPS</i>	78
Table 5 : <i>Antibodies used for western blotting</i>	138
Table 6 : <i>Antibodies used for immunofluorescence</i>	138
Table 7 : <i>Liste des anticorps utilisés pour les immunoblots et les immunofluorescences</i>	150
Table 8 : <i>Antibodies used for western blotting</i>	179

LISTE DES ABRÉVIATIONS

A.

α SMA	αlpha Smooth Muscle Actin
a-NHEJ	alternative Non-Homologous End-Joining (jonction d'extrémités non-homologues alternative)
AAV	Adeno-Associated Virus (virus adéno-associé)
ABE	Adenine Base Editor (éditeurs de bases d'adénine)
Ac	Acetylation
ACMS	α-Amino-β-Carboxy-Muconate-ϵ-Semialdéhyde
ACMSD	α-Amino-β-Carboxy-Muconate-Semialdéhyde Décarboxylase
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ADPR	ADP-Ribosyl
AIF	Apoptotic Induced Factor (facteur inducteur d'apoptose)
ALP	Alkaline Phosphatase (phosphatase alcaline)
AMP	Adénosine MonoPhosphate
AMPc	Adénosine MonoPhosphate cyclique
AMS	α-Amino-Muconate Semialdéhyde
ApoE	Apolipoprotéines E
AONs	Antisense OligoNucleotides (oligonucléotides anti-sens)
APE	Apurinic/apyrimidinic (AP) Endonuclease
APS	Atypical Progeroid Syndrome (syndrome de progéria atypique)
ARH3	ADP- RibosylHydrolase 3
ARTs	ADP-RibosylTransférases
ASO E11-31	AntiSense Oligonucleotides E11-31
ATP	Adénosine TriPhosphate
ATM	Ataxie Télangiectasie Mutée

B.

BAF	Barrier-to-Autointegration Factor (facteur barrière à l'auto-intégration)
BER	Base Excision Repair
BMP	Bone Morphogenetic Protein (protéines morphogéniques osseuses)
BRCA1	BReast CAncer type 1 susceptibility protein
BRCA2	BReast CAncer type 2 susceptibility protein
BSA	Bovin Serum Albumin (Albumine de sérum bovin)
Bub3	Budding uninhibited by Benzimidazoles 3

C.

c-NHEJ	classic Non-Homologous End-Joining (jonction d'extrémités non-homologues classique)
Ca ²⁺	Calcium
CaaX	motif cystéine (C) suivi de 2 acides aminés aliphatiques (aa) et d'un acide aminé quelconque (X)
CaMKII	Ca²⁺/calModulin-dependent protein Kinase II
CD38	Cluster de Différenciation 38
cADPR	Cyclic ADP-ribose

CDB	Cassures D ouble- B rin de l'ADN
CDK1	C yclin- D e p endent K inase 1
CDK2	C yclin- D e p endent K inase 2
CDK5	C yclin- D e p endent K inase 5
Cenpa/b	C entromeric protein a/b (protéine centromérique a/b)
CKII	C asein K inase II
CMT	C harcot- M arie- T ooth
CTCF	C CC T C-binding F actor
CRISPR	C lustered R egularly I nterspaced S hort P alindromic R epeats
CSB	Cassures S imple- B rin
CSB	C ockayne S yndrome group B (syndrome de Cockayne de type B)
CtIP	C -terminal-binding protein(CtBP)- I nteracting P rotein
CtBP	C -terminal- B inding P rotein

D.

DamID	D N A adenine m ethyltransferase I dentification (identification de l'ADN adénine méthyltransférase)
DCM-CD	D ilated C ardio M yopathy with C onduction systems D isease (cardiomyopathies dilatées)
DEK	Oncogène DEK
DMD	D ystrophie M usculaire de D uchenne
DNAP	D N A P olymerase
DNA-PK	D N A -dependent P rotein K inase (protéine kinase dépendante de l'ADN)
DNA-PKcs	D N A -dependent P rotein K inase c atalytic s ubunit (sous-unité catalytique de la protéine kinase activée par l'ADN)
DNA-Pol β	D N A P olymerase β (ADN polymérase β)

E.

ECM	E xtra C ellular M atrix (matrice extracellulaire)
EDMD	E myr- D reifuss M uscular D ystrophy (dystrophie musculaire d'Emery-Dreifuss)
ePPI	P yrrophos P hate i norganique e xtracellulaire
ER	E ndoplasmic R eticulum (reticulum endoplasmique)
ESC	E mbryonic S tem C ells (cellules souches embryonnaires)
Ex	E xon

F.

FCCP	C arbonyl cyanide- p -trifluoromethoxyphenylhydrazone
FEN-1	F lapstructure-specific E ndo N uclease 1
FI	F ilaments I ntermédiaires
FPLD	F amilial P artial L ipo D ystrophy (lipodystrophie partielle familiale)
FT	F acteurs de T ranscription
FTI	F arnesyl T ransferase I nhibitor (inhibiteur des farnesyltransférases)

G.	
GGTI	GeranylGeranylTransferase Inhibitor
H.	
HGPS	Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome (syndrome de progéria de Hutchinson-Gilford)
HMGB1	High Mobility Group Box 1
HR	Homologous Recombination (recombinaison homologue)
I.	
ICMT	Isoprenylcysteine Carboxyl MethylTransferase
Ig-fold	Organisation 3D en feuillets beta, comparable à la structure retrouvée dans les immunoglobulines
IL	InterLeukines
INM	Inner Nuclear Membrane (membrane nucléaire interne)
iPSCs	induced Pluripotent Stem Cells (cellules souches pluripotentes induites)
K.	
KI	Knock-In
KIF4	KInesin Family member 4
KO	Knock-Out
Ku70/80	Ku 70/80 kDa
KYN	Acide KYN urénic
L.	
LADs	Lamines Associated Domains (domaines associés aux lamines)
Lamines-A	Lamines de type A
Lamines-B	Lamines de type B
LAP	Lamina-Associated Polypeptide (polypeptide associé à la lamine)
LBR	Lamin B-Receptor (récepteurs de la lamine B)
LGMD1B	Limb Girdle Muscular Dystrophy type 1B (dystrophie musculaire des ceintures de type 1B)
LINC	LI inker of N ucleoskeleton and C ytoskeleton (lien entre le cytosquelette et le nucléosquelette de lamines)
<i>LMNA</i>	Gène codant les lamines A/C
M.	
MAR	Matrix Attachment Region (région d'attachement à la matrice)
MARylation	Mono (ADP-Ribosylation)
Me	Methylation
MFN1/2	MitoFusiNe 1/2
MCL	Myosin Light-Chain (chaînes légères de myosine)
MLCK	Myosin Light-Chain Kinase (kinase des chaînes légères de myosine)
MmEx10	Morpholino ciblant l'Exon 10

MmEx11	M orpholino ciblant l' Exon 11
MMP	M atrix M etallo P roteinase (Métalloprotéases matricielles)
MMP13	M atrix M etallo P roteinase 13 (Métalloprotéases matricielles 13)
Mono-APs	M ono- A mino P rimidines
MRE11	M eiotic R Ecombination 11 (recombinaison méiotique 11)
MRN	M re11- R ad50- N bs1 complex
MSC	M esenchymal S tem C ell (cellules souches mésenchymateuses)
MYH11	M Yosin H eavy chain 11 (chaîne lourde de la myosine des muscles lisses)

N.

NA	N icotinic A cid ou NiAc ine (acide nicotinique)
NAAD	N icotinic A cid A denine D inucleotide (acide nicotinique adénine dinucléotide)
NAC	N - A cétyl C ystéine
NAD ⁺	N icotinamide A dénine D inucleotide
NADH	N icotinamide A denine D inucleotide + H ydrogen
NADS	NAD ⁺ synthase
NAM	N icotin A Mide
NAMN	N icotinic A cid M ono N ucleotide (mononucléotide de l'acide nicotinique)
NAMPT	N icotin A Mides P hosho-ribosyl- T ransférases
NAPRT	N icotinic A cid P hosho- R ibosyl- T ransferase (nicotinate phospho-ribosyl-transférase)
NAT10	N - A cétyl T ransférase 10
NE	N uclear E nvelope (enveloppe nucléaire)
NHEJ	N on- H omologous E nd- J oining (jonction d'extrémités non-homologues)
NLS	N uclear L ocalisation S ignals (signaux d'adressage au noyau)
NMN	N icotinamide M ono N ucléotide
NMNAT	N icotinamide M ono- N ucléotide A dénylyl- T ransférase
NMNAT 1, 2 et 3	N icotinamide M ono- N ucléotide A dénylyl- T ransférase 1, 2 et 3
NPC	N uclear P ore C omplex (pores nucléaires)
NPY	N euro P eptide Y
NR	N icotinamide R iboside
NRK1/2	N icotinamides R iboside K inases 1/2
NuRD	N ucleosome R emodeling and D eacetylation (remodelage et désacétylation des nucléosomes)

O.

OCR	O xygen C onsumption R ate (taux de consommation d'oxygène)
OGG1	8 - O xo G uanine G lycosylase 1
ONM	O uter N uclear M embrane (membrane nucléaire externe)
OXPHOS	O Xydativ P HOSphorylation (phosphorylation oxydative)

P.

p21	Inhibiteur 1A de la kinase dépendante de la cycline
p53	Protéine suppresseur de tumeurs p53

PAAN	PARP1 dependent AIF-Associated Nuclease (nucléase associée à l'AIF dépendante de PARP-1)
PAR	Poly(ADP-Ribose)
PARG	Poly(ADP-Ribose) Glycohydrolase
PARG111	Poly(ADP-Ribose) Glycohydrolase 111kDa
PARPs	Poly(ADP-Ribose) Polyméras
PARP-1	Poly(ADP-Ribose) Polymerase-1
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen (antigène nucléaire des cellules en prolifération)
PDGF-BB	Platelet-Derived Growth Factor-BB
PKC	Protéine Kinase C
PMO	Phosphorodiamidate Morpholino Oligomers (oligomorpholino phosphorodiamidate)
PP1	Protéines Phosphatases 1
PP2A	Protéines Phosphatases 2A
PPi	PyroPhosphate inorganique
pRb	Retinoblastoma protein (protéine du rétinoblastome)
pré-ARNm	ARN prémessager
PRF	Progeria Research Foundation (fondation pour la recherche sur la progéria)

Q.

QA	Quinolinic Acid (acide quinolinique)
QaPRT	Quinolinic acid Phospho-Ribosyl-Transferase (phospho-ribosyl-transférase de l'acide quinolinique)

R.

RE	Reticulum Endoplasmique
RNS	Reactive Nitrogen Species (espèces réactives du nitrogen)
ROS	Reactive Oxygen Species (espèces réactives de l'oxygène)
RPA	Replication Protein A

S.

SARM1	Sterile α and TIR Motif Containing 1
SASP	Senescence-Associated Secretory Phenotype (phénotype sécrétoire associé à la sénescence)
shICMT	short hairpin ICMT
SIRT	SIRTuines
SM	Smooth Muscle
SMC	Smooth Muscle Cell
SNC	Système Nerveux Central
SRSF	Serine/arginine-Rich Splicing Factor
SSBR	Single-Strand Break Repair

T.

tASO	telomeric AntiSense Oligonucleotides (oligonucléotides anti-sens spécifiques des séquences télomériques)
TBS-T	Tris-Buffered Saline Tween

TCA **TriCarboxylic Acid** (acide tricarboxylique)
TGF- β **Transforming Growth Factor- β**
TRF2 **Telomeric Repeat-binding Factor 2** (facteur 2 de liaison répétée télomérique)
Trp **Tryptophane**
TUDCA **TauroUrsoDeoxyCholic Acid**

U.

UTR **UnTranslated Regions** (régions non traduites)

V.

VDAC **Voltage-Dependent Anion Channel** (canaux ioniques voltage-dépendants)
VSMCs **Vascular Smooth Muscle Cells** (cellules musculaires lisses vasculaires)

W.

WRN Protéine du syndrome de **WeRNer**

X.

XPA **Xeroderma Pigmentosum, complementation Group A** (groupe de complémentation A du xeroderma pigmentosum)
XRCC1 **X-ray Repair Complementing defective in Chinese hamster 1**
XRCC4 **X-ray Repair Complementing defective in Chinese hamster 4**

Z.

ZMPSTE24 **Zinc MetalloProteinase STE24**

RÉSUMÉ

Introduction | La progéria de Hutchinson-Gilford (HGPS) est une maladie génétique rare, qui mime les caractéristiques moléculaires et cliniques du vieillissement. Les patients HGPS ne présentent aucun symptôme à la naissance mais développent, dès leur première année de vie, différents signes du vieillissement accéléré. La HGPS est une maladie autosomique dominante sporadique causée dans la majorité des cas par une substitution *de novo* d'une seule base dans le gène *LMNA*, codant les lamines nucléaires de type A. Cette mutation crée un site donneur d'épissage cryptique, conduisant à l'expression d'une lamine A délétée de 50 acides aminés et farnésylée de façon constitutive appelée "progérine". Parmi toutes les caractéristiques cliniques associées au vieillissement prématuré, les atteintes du système cardiovasculaire sont la principale cause du décès prématuré des patients vers l'âge de 14 ans. Malgré sa grande importance, l'étude de la pathologie artérielle a été extrêmement limitée, principalement en raison de la faible incidence des syndromes progéroïdes.

Hypothèse | Les cellules musculaires lisses vasculaires (VSMCs) sont importantes pour le maintien de l'intégrité de l'aorte. Il est connu que l'abondance et la fonctionnalité des VSMCs diminuent avec le vieillissement dans les modèles animaux de syndromes progéroïdes. L'objectif de cette thèse a été d'étudier les mécanismes par lesquels la progérine conduit à une perte massive de VSMCs.

Résultats | En utilisant l'aorte d'un modèle murin de HGPS, les souris *Lmna*^{G609G/G609G}, j'ai montré une augmentation de la mort cellulaire des VSMCs associée à un défaut de réparation des dommages à l'ADN. La poly(ADP-Ribosyl)ation (PARylation) est une modification post-traductionnelle centrale des protéines impliquée dans la détection et la réparation des dommages à l'ADN. Mes résultats démontrent pour la première fois qu'une augmentation de PARylation se produit dans les VSMCs de souris *Lmna*^{G609G/G609G}. L'augmentation de la PARylation est associée à une diminution du nicotinamide adénine dinucléotide (NAD⁺) qui est un régulateur critique du métabolisme. Le traitement de souris *Lmna*^{G609G/+} avec un inhibiteur de la PARylation permet de restaurer les niveaux de NAD⁺ dans les VSMCs et d'améliorer la pathologie vasculaire.

Conclusion | Dans l'ensemble, mes travaux de thèse soutiennent l'hypothèse selon laquelle la PARylation peut être impliquée dans la perte de VSMCs chez les patients atteints de HGPS et suggèrent une nouvelle approche thérapeutique pour l'implication cardiovasculaire dans la progéria et le vieillissement en général.

Mots-Clés | HGPS ; NAD⁺ ; PARP-1 ; VSMCs

ABSTRACT

Introduction | Hutchinson-Gilford progeria syndrome (HGPS) is an extremely rare genetic disorder mimicking clinical and molecular features of accelerated aging. Children with HGPS appear asymptomatic at birth but within a year begin to display the effects of accelerated aging. HGPS is a sporadic autosomal dominant disease caused in nearly all cases by a *de novo* single-base substitution of *LMNA*, encoding nuclear A-type lamins. The *LMNA* mutation creates a cryptic splice donor site, resulting in a lamin A mutant called “progerin”, which remains farnesylated. Among all of the clinical features associated with premature aging, the cardiovascular disease is the cause of death in almost all patients. Despite its great importance, investigation of the arterial pathology has been extremely limited mainly due to the low incidence of progeroid syndromes.

Thesis hypothesis | Vascular smooth muscle cells (VSMCs) are important for maintaining aortic integrity. It is known that the abundance and functionality of VSMCs decline with aging in animal models of progeroid syndromes. The main thesis project was to study the mechanisms of how “progerin” leads to massive VSMCs loss.

Results | Using aorta tissue from a mouse model of HGPS, *Lmna*^{G609G/G609G} mice, we showed an increase in VSMCs death associated with an inability to correctly repair DNA damages. Poly(ADP-Ribosyl)ation (PARylation) is now recognized as a central post-translational protein modification that coordinates the building of repair complexes at damage sites with the timely controlled dissociation of the repair factors. Our results demonstrate for the first time that aberrant PARylation occurs in VSMCs of premature aging mouse model. Increased PARylation in VSMCs from *Lmna*^{G609G/G609G} mice were associated with a decrease in nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺), which is a critical regulator of metabolism and thus, contributes to the pathogenesis. Treatment of *Lmna*^{G609G/+} mice with a PARylation inhibitor restores NAD⁺ levels in VSMCs and improves vascular pathology.

Conclusion | Taking together, these thesis works support our hypothesis that PARylation can be involved in VSMCs loss in patients with HGPS and suggest a novel approach towards therapeutics for cardiovascular involvement in progeroid syndromes and aging in general.

Keywords | HGPS ; NAD⁺ ; PARP-1 ; VSMCs

Chapitre 1

INTRODUCTION

L'introduction de ce manuscrit se compose de quatre parties majeures. La première partie : (1.1) « Des lamines aux laminopathies » traitera du gène *LMNA* codant les lamines qui sont des protéines nucléaires dont la structure et la fonction seront également abordées. Les maladies associées aux mutations du gène *LMNA*, regroupées sous le terme laminopathies, seront ensuite brièvement exposées. Parmi elles, la progéria de Hutchinson-Gilford sera plus précisément détaillée et fera ainsi l'objet d'une deuxième partie : (1.2) « Focus sur une laminopathie : La progéria de Hutchinson-Gilford ». L'épidémiologie, le phénotype clinique, les mécanismes physiopathologiques ainsi que les modèles d'étude de la progéria seront alors décrits. Seront également abordées les perspectives thérapeutiques visant à limiter la mort prématurée des patients à la suite d'atteintes sévères du système cardiovasculaire. Ce système sera alors présenté au travers d'une troisième partie (1.3) : « Système cardiovasculaire : physiopathologie de la paroi aortique et des cellules musculaires lisses vasculaires (VSMCs) ». Cette partie se consacrera à l'aorte ainsi qu'aux VSMCs qui régulent le tonus vasculaire. Un résumé des études portant sur les VSMCs dans la progéria complètera cette partie. Les atteintes du système cardiovasculaire ont récemment été associées à la Poly(ADP-ribosylation), aussi appelée PARylation. Cette modification post-traductionnelle sera détaillée dans la dernière partie de cette introduction : (1.4) « La PARylation ». Les enzymes effectrices seront d'abord abordées et les fonctions de la PARylation seront ensuite décrites. Enfin, le métabolisme du nicotinamide adénine dinucléotide (NAD^+), essentiel à la PARylation, clôturera cette partie.

1.1. Des lamines aux laminopathies

1.1.1. Généralités

Les lamines sont des protéines très conservées au cours de l'évolution et s'expriment chez tous les métazoaires (Melcer et al., 2007). Initialement identifiées en 1975 par Aaronson et Blobel (Aaronson and Blobel, 1975), les lamines sont aujourd'hui décrites comme appartenant à la classe V des protéines des filaments intermédiaires (FI). Les autres groupes de protéines des FI comprennent des protéines fibrillaires cytoplasmiques : les cytokératines (classe I et II) ; les desmines (classe III) ; les neurofilaments (classe IV) ; les nestines (classe VI) ou encore les filensines et les phakinines (autre classe) (**Table 1**). Dans les cellules eucaryotes, les lamines sont les seules protéines des FI localisées dans le noyau (Herrmann and Aebi, 2016) où elles forment principalement un réseau tapissant la face interne de la membrane nucléaire appelé lamina nucléaire (Broers et al., 2006).

Classe	Protéines	Spécificité d'expression
I	Kératines acides	Epithélium
II	Kératines neutres/basiques	Epithélium
III	Desmine	Muscles
	GFAP (glial fibrillary acidic protein)	Astrocytes
	Vimentine	Précurseurs embryonnaires
	Périphérine	Neurones
IV	Neurofilaments	Neurones
	Internexines	Neurones
V	Lamines	Ubiquitaire (compartiment nucléaire)
VI	Nestine	Cellules souches neuroépithéliales
Autres	Filensine, Phakinine	Cristallin

Table 1 : Classification des protéines des filaments intermédiaires
Adaptée de (Gomes et al., 1999) et réalisée avec Biorender.

Les lamines sont divisées en 2 groupes selon leur expression, leur structure ainsi que leurs propriétés biochimiques. Les lamines de type B (lamines-B) sont exprimées à tous les stades du développement tandis que les lamines de type A (lamines-A) sont essentiellement exprimées dans les cellules différenciées (Stuurman et al., 1998). Par ailleurs, les lamines-B restent associées à l'enveloppe nucléaire lors de la mitose alors que les lamines-A se solubilisent, se dispersent puis retrouvent leur ancrage à l'enveloppe nucléaire en fin de mitose (Georgatos et al., 1994). Enfin, les lamines-B et les lamines-A diffèrent par leur point isoélectrique, c'est-à-dire le pH pour lequel la charge électrique de la molécule est nulle. En effet, les lamines-B présentent un point isoélectrique acide contrairement aux lamines-A qui ont un point isoélectrique neutre (Nigg, 1989 ; Peter et al., 1991).

1.1.2. Des gènes aux protéines

Chez l'Homme, 3 gènes codent les lamines : le gène *LMNA* code les lamines de type A tandis que les gènes *LMNB1* et *LMNB2* codent respectivement les lamines de type B1 et de type B2 ([Table 2](#)).

Gène	Protéines	Expression
<i>LMNA</i>	Lamine A	Plupart des cellules différenciées
	Lamine C	Plupart des cellules différenciées
	Lamine C2	Cellules germinales
	Lamine AΔ10	Cellules tumorales
<i>LMNB1</i>	Lamine B1	Plupart voire toutes les cellules somatiques
<i>LMNB2</i>	Lamines B2	Plupart voire toutes les cellules somatiques
	Lamines B3	Cellules germinales

Table 2 : Isoformes des lamines nucléaires humaines

Adaptée de (Worman, 2012) et réalisée avec Biorender.

Le gène *LMNA* contient 12 exons localisés au niveau du chromosome 1 en position 1q21.2 (Wydner et al., 1996) et code 2 isoformes majeurs : les lamines A et C, exprimées

dans la plupart des cellules somatiques différenciées. Les lamines C2 et A Δ 10 sont des isoformes minoritaires des lamines-A respectivement exprimées dans des lignées cellulaires germinales et tumorales (Machiels et al., 1996 ; Nakajima and Abe, 1995). L'expression de ces 4 isoformes résulte de l'épissage alternatif de l'ARN pré-messager codé par le gène *LMNA* (*Lin and Worman, 1993*). La lamine C est synthétisée directement sous sa forme mature à la suite de l'épissage alternatif des 10 premiers exons. La lamine-A est quant à elle synthétisée sous la forme d'un précurseur appelé prélamine A. Cette dernière est issue de l'épissage alternatif des exons 1 à 9 ainsi que des 90 premières paires de bases de l'exon 10, suivi des exons 11 et 12 du gène *LMNA*. Les lamines A et C sont donc identiques pour la majeure partie de leur séquence mais diffèrent par leurs domaines C-terminaux (Lin and Worman, 1993). En effet, la prélamine A possède une séquence unique de 98 acides aminés en C-terminal.

Le gène *LMNB1* contient 11 exons et se situe sur le chromosome 5q23.3-q31.1 (Wydner et al., 1996) tandis que le gène *LMNB2* contient 12 exons en position chromosomique 19p13.3 (Biamonti et al., 1992) (*Figure 1*). Les lamines B1 et B2 sont toutes deux exprimées dans presque toutes les cellules somatiques. La lamine B3, une isoforme des lamines B2 est, quant à elle, exprimée dans les cellules germinales (Gerace and Blobel, 1982).

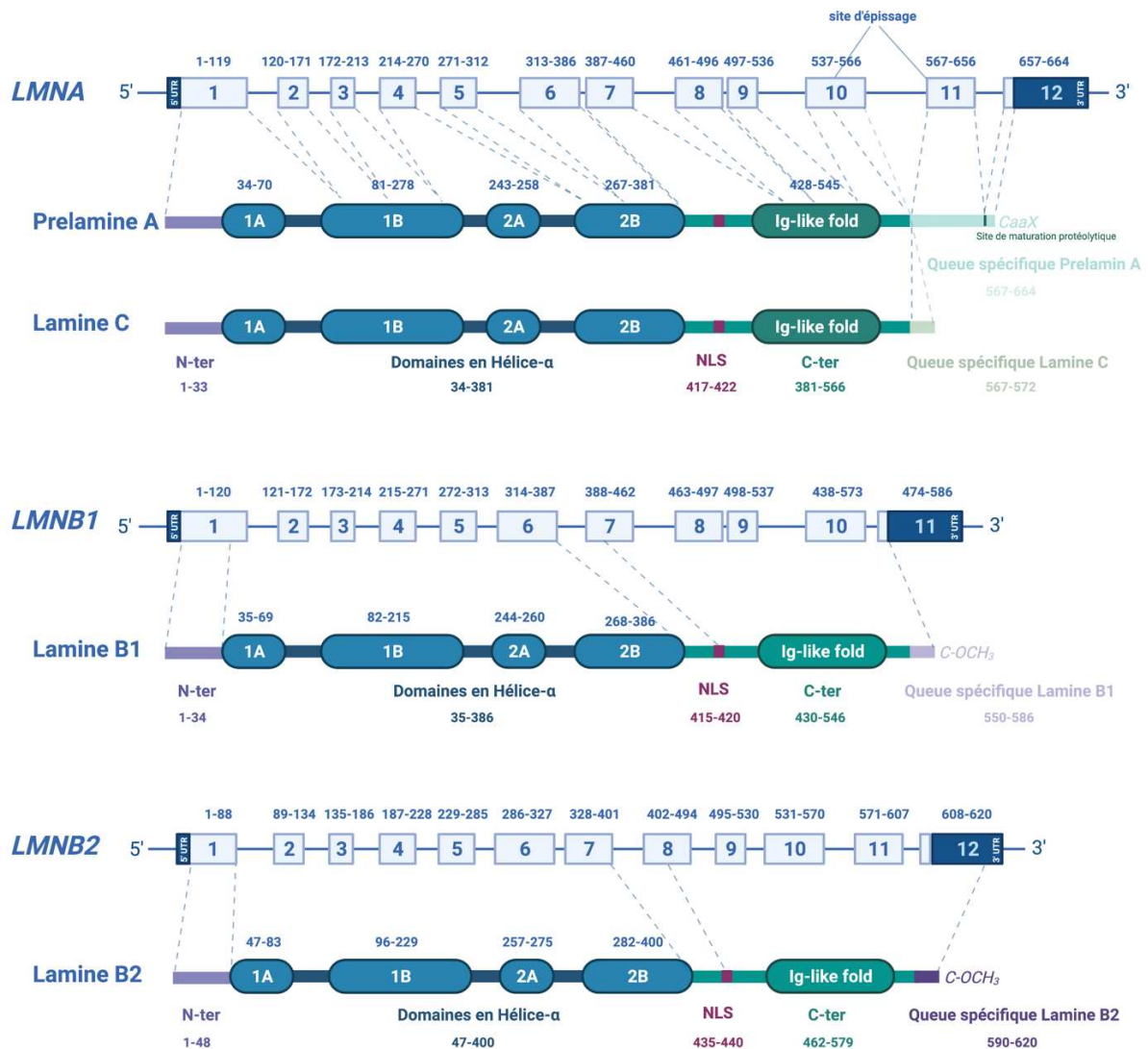


Figure 1 : Structure des gènes *LMNA*, *LMNB1* et *LMNB2* codant les lamines de type A, les lamines B1 ainsi que les lamines B2 respectivement

NLS: nuclear localisation signals; UTR : untranslated regions.

Adaptée de (Bertrand et al., 2011 ; Capell and Collins, 2006 ; Simon and Wilson, 2013 ; Walling and Murphy, 2021) et réalisée avec Biorender.

Contrairement à la lamine C, les lamines A, B1 et B2 sont toutes trois exprimées dans le cytoplasme sous forme de précurseurs et subissent des modifications post-traductionnelles dans leur domaine C-terminal avant d'être adressées au noyau (Gerace and Blobel, 1982 ; Laliberté et al., 1984 ; Lehner et al., 1986). Plus précisément, les modifications post-traductionnelles se font au niveau de la terminaison CaaX correspondant à un motif cystéine (C) suivi de 2 acides aminés aliphatiques (aa) et d'un acide aminé quelconque (X). Les trois premières étapes de maturations protéiques sont communes aux lamines-A et aux lamines-B : (1) Après la traduction par les ribosomes, la cystéine en C-terminal du motif CaaX va être farnésylée par une farnésyltransférase. La

prénylation, c'est-à-dire l'ajout d'un groupement hydrophobe de 15 carbones, va permettre l'ancrage des prélamines à la membrane du reticulum endoplasmique (RE) afin de faciliter les étapes de maturation protéique suivantes qui seront réalisées par des enzymes spécifiques du RE (Cau et al., 2014). (2) Le motif aaX est ensuite clivé par les métallo-protéases à zinc FACE1/ZMPSTE24 et FACE2/Rce1 pour les lamines-A tandis que le motif aaX des lamines-B est uniquement clivé par FACE2/Rce1. (3) Ajout d'un groupement méthyle sur la cystéine farnésylée (carboxyméthylation) par l'isoprenylcystéine carboxyl methyltransferase (ICMT) (Dechat et al., 2008) (*Figure 2*).

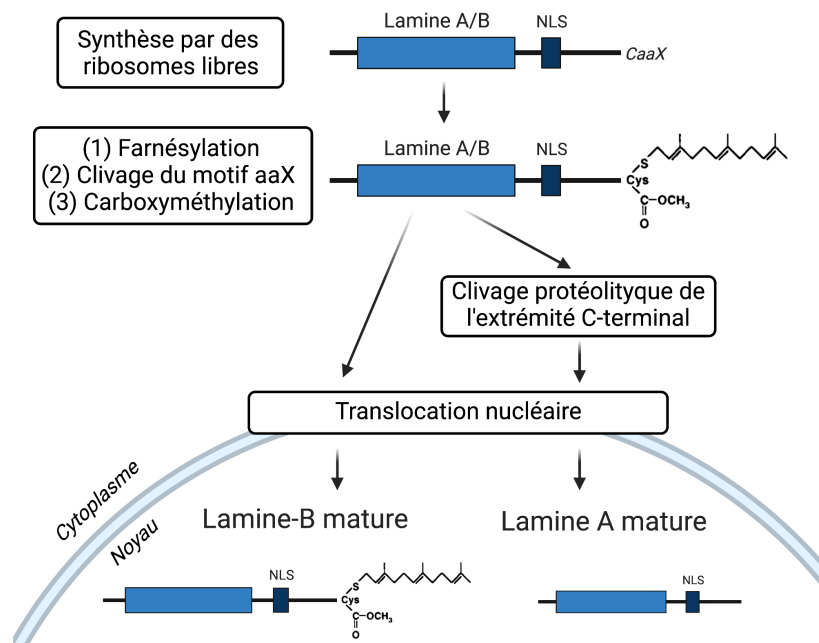


Figure 2 : Modifications post-traductionnelles des lamines A et B

Trois étapes de maturation protéique sont communes aux lamines A et B et ont lieu dans le cytoplasme. Les lamines A subissent une modification post-traductionnelle supplémentaire pour former les lamines A matures. Les lamines sont ensuite transloquées dans le noyau via leur signal NLS (nuclear localisation signals).

Adaptée de (Nigg et al., 1992), réalisée avec Biorender.

Le processus de maturation des lamines-B s'achève à la 3^{ème} étape conduisant à l'expression des lamines-B farnésylées et carboxyméthylées de façon constitutive. Par opposition, la maturation de la lamine A nécessite une quatrième et dernière étape de clivage protéolytique par ZMPSTE24/FACE1. Ce clivage permet l'élimination des 15 acides aminés en C-terminal, comprenant le résidu cystéine carboxyméthylé et farnésylé afin de former les lamines A matures (Weber et al., 1989). À l'issue de ces étapes de maturation, les lamines matures sont importées au noyau via les pores nucléaires grâce au NLS pour « nuclear localisation signals » situé en C-terminal (*Figure 3*). Outre le NLS,

toutes les lamines possèdent des domaines centraux en hélice α . Toutes les lamines, à l'exception de la lamine C, contiennent un motif CaaX en C-terminal.

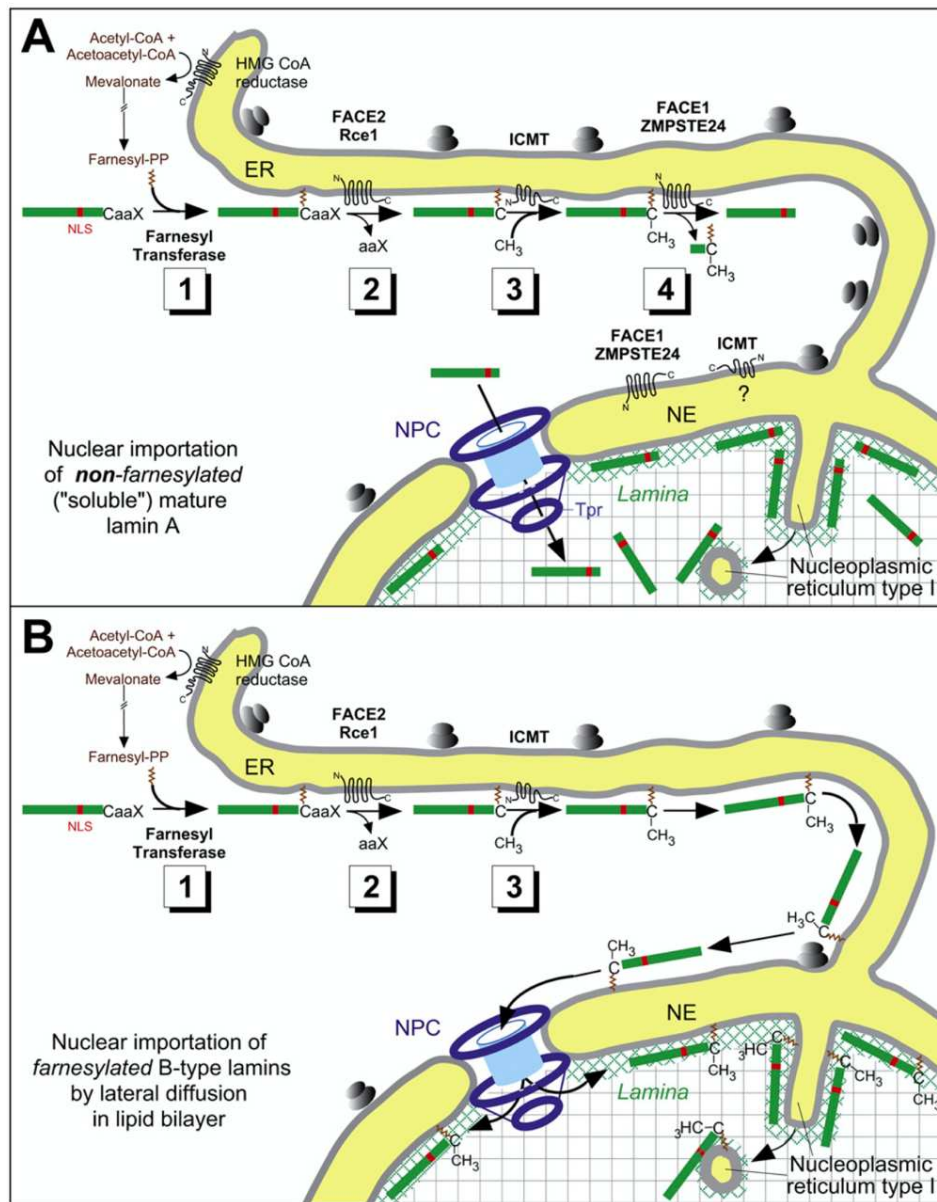


Figure 3 : Modifications post-traductionnelles des prélamines

A. Processus de maturation des lamines-A en 4 étapes au niveau du reticulum endoplasmique (ER) et importation nucléaire grâce au signal de localisation nucléaire (NLS) via les pores nucléaires (NPC) de l'enveloppe nucléaire (NE).

B. Processus de maturation des lamines-B en trois étapes puis translocation des lamines-B matures dans le noyau. Sachant que le motif farnésyl n'est pas clivé, les lamines-B restent ancrées à la membrane interne nucléaire.

ICMT : isoprenylcysteine carboxyl methyltransferase ; ZMPSTE24 : Zinc MetalloProteinase STE24.

Adaptée de (Cau et al., 2014).

1.1.3. *Structure des lamines*

Les lamines nucléaires possèdent une structure « tripartite » commune à celle des autres protéines des FI et sont composées d'un domaine central très conservé en hélice α , entouré de 2 domaines globulaires variables aux extrémités C-terminales et N-terminales (Parry et al., 1986). Les protéines des FI cytoplasmiques ont un domaine central de 360 résidus composé de 4 sous-domaines en hélice α super enroulés, appelés 1A, 1B, 2A et 2B tandis que les lamines possèdent 42 résidus supplémentaires dans la région 1B (Fisher et al., 1986). Les lamines se distinguent des FI cytoplasmiques par leurs 2 domaines globulaires terminaux : l'extrémité N-terminale (tête) est plus courte alors que l'extrémité C-terminale (queue) est plus longue. En effet, la partie C-terminale des lamines contient un motif structurel hautement conservé, appelé Immunoglobuline-like (Ig-fold) (Dhe-Paganon et al., 2002), un signal de localisation nucléaire ainsi qu'un motif Caax comme décrit précédemment ([Figure 4](#)). Nécessaire au transport dans le noyau, le NLS est constitué soit d'une séquence de 4 acides aminés Lys-Lys-Arg-Lys pour les lamines-A, soit d'une séquence Lys-Arg-Lys-Arg pour les lamines-B (Herrmann and Aebi, 2016). Bien que les motifs Caax et NLS soient absents des FI cytoplasmiques des vertébrés, ils existent chez les mollusques. Les lamines sont ainsi considérées comme les ancêtres évolutifs de tous les FI cytoplasmiques (Riemer et al., 1998).

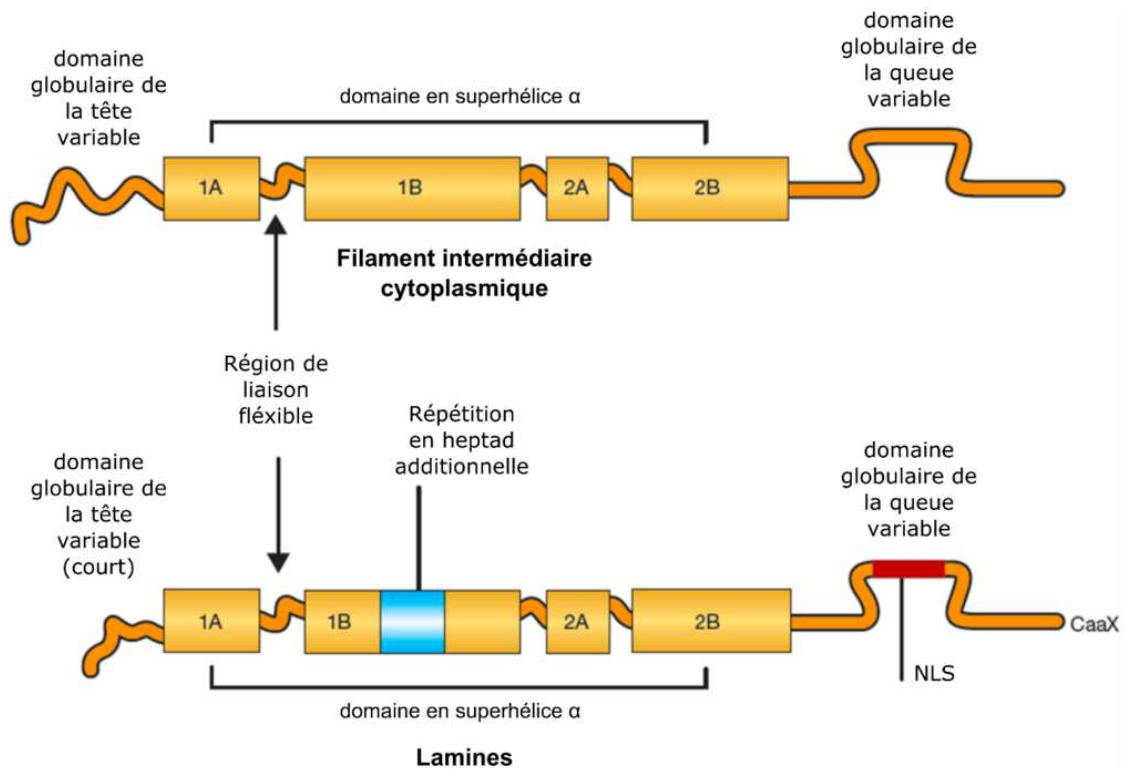


Figure 4 : Schéma des différences de structure entre les protéines des FI cytoplasmiques et les lamines

Les protéines des FI ont une structure tripartite : une structure centrale en hélice α composée de 4 sous-domaines et 2 domaines globulaires terminaux composant les extrémités C-terminales et N-terminales. Cette dernière contient un signal de localisation nucléaire (NLS) ainsi qu'un motif CaaX pour les lamines.

Adaptée de (Worman, 2012).

Par définition, les FIs sont des protéines fibrillaires assemblées de façon hélicoïdale en un filament d'environ 10nm qui est intermédiaire entre le diamètre des microfilaments d'actines (7nm) et celui des microtubules (25nm). De plus, il a récemment été démontré en microscopie électronique que le diamètre des protofilaments de lamines serait de 3,5nm (Turgay et al., 2017) (**Figure 5**).

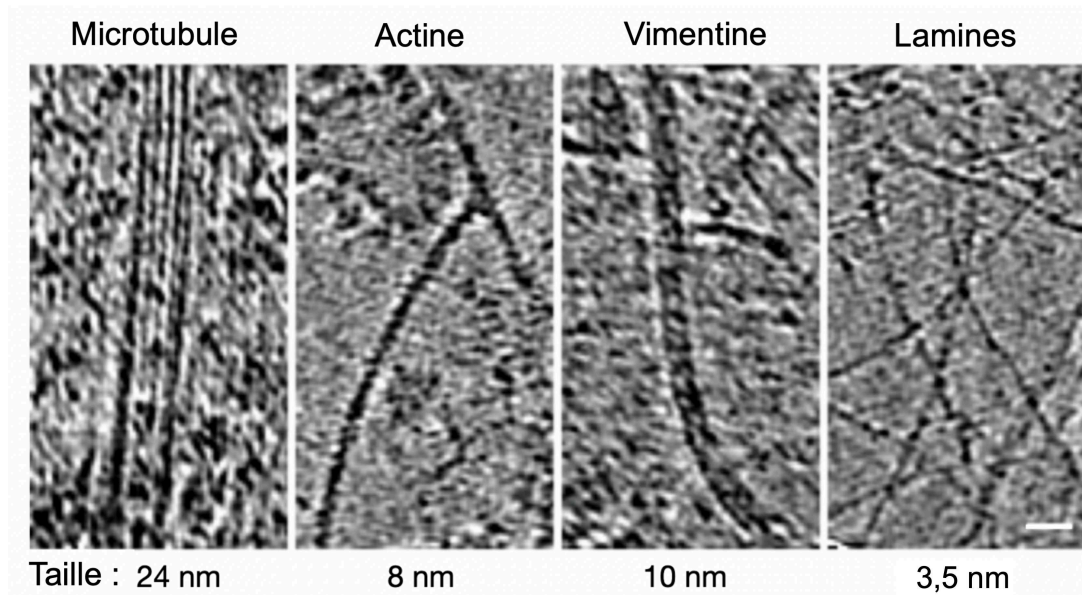


Figure 5 : Constituants du cytosquelette et lamines en microscopie électronique
 Comparaison de la taille des filaments intermédiaires. Barre d'échelle : 20nm.
 Adaptée de (Turgay et al., 2017).

Les lamines sont organisées en structures filamenteuses. L'assemblage des lamines est successif et débute par la dimérisation parallèle de monomères grâce à leur domaine central en hélice α (Turgay et al., 2017). Les dimères s'assemblent ensuite de façon longitudinale en polymères dans lesquels les domaines Ig-fold sont placés à des intervalles réguliers d'environ 40nm. Cette conformation provoque un aspect en collier de perles qui est caractéristique des polymères de lamines (Herrmann and Aebi, 2000). Deux polymères de lamines sont finalement assemblés de façon antiparallèle pour former un protofilament. *In vitro*, les lamines s'auto-assemblent en structures d'ordre supérieur à partir de 4 protofilaments de lamines conduisant à la formation de filaments intermédiaires de 10nm (Stuurman et al., 1998 ; Heitlinger et al., 1991 ; Ben-Harush et al., 2009) (Figure 6). Enfin, des hétéropolymères de lamines A et de lamines B ont été observés *in vitro* (Ye and Worman, 1995 ; Schirmer and Gerace, 2004). *In vivo*, seuls des homopolymères distincts de lamine-A ou de lamines-B ont été réellement décrits à ce jour et interagissent ensuite au sein de la lamina. Il a cependant été démontré que l'expression *in vivo* d'une forme mutée de la lamine A, permet la formation d'un hétéropolymère de lamines-A, lamines-B et lamines A mutées (Delbarre et al., 2006). Les différences observées entre les structures *in vivo* et *in vitro* sont probablement dues à la présence de partenaires protéiques et/ou de modifications post-traductionnelles des lamines.

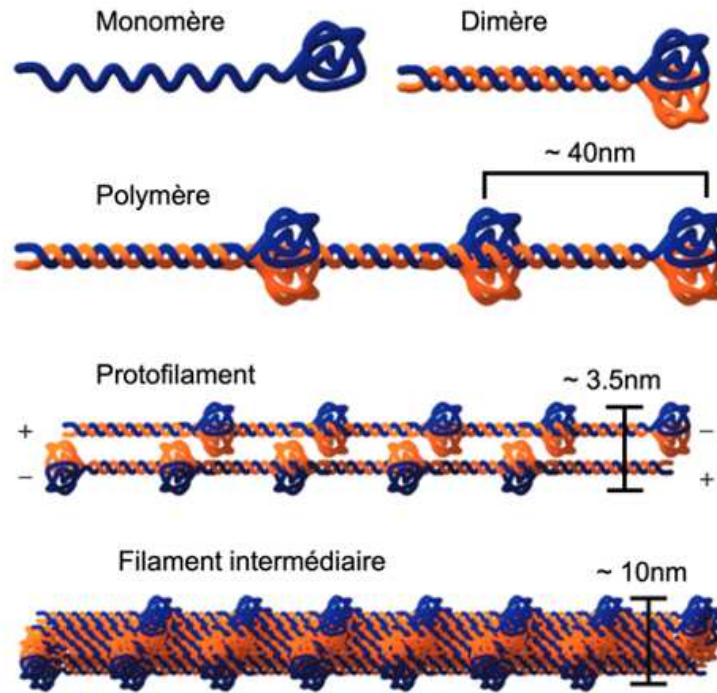


Figure 6 : Schéma de l'assemblage des lamines en filaments intermédiaires

Les monomères de lamines s'associent de manière parallèle pour former des dimères. Les polymères de lamines résultent de l'association longitudinale de dimères. Les protofilaments d'environ 3,5nm de diamètre sont finalement produits par l'association antiparallèle de deux polymères. Enfin, l'association latérale de 3 et 4 protofilaments forme un filament intermédiaire d'environ 10nm.

Adaptée de (Dittmer and Misteli, 2011).

1.1.4. Localisation et dynamique au cours du cycle cellulaire

Les lamines interagissent avec différents partenaires pour former un réseau de filaments, ou lamina, sous la membrane nucléaire interne qui constitue une matrice nucléaire appelée nucléosquelette (Aebi et al., 1986 ; Goldberg et al., 2008 ; Grossman et al., 2012 ; Zhang et al., 2017). Chez les mammifères, il a été mis en évidence par tomographie que la lamina nucléaire constitue une couche d'environ 14nm d'épaisseur, connectée aux pores nucléaires (Turgay et al., 2017). Cette dernière peut s'avérer plus fine ou plus épaisse selon le type cellulaire (Fawcett, 1966).

Bien que les réseaux des lamines-A et ceux des lamines-B soient similaires dans leurs caractéristiques physiques, il a été observé en microscopie électronique que ces deux isoformes majeures constituent des maillages de fibrilles distincts (Shimi et al.,

2008) (*Figure 7*). Plus récemment, la même équipe a montré que les lamines A, C, B1 et B2 forment des maillages de filaments distincts et les lamines-A interagissent de façon indirecte avec les lamines-B (Shimi et al., 2015). Par ailleurs, l'altération de l'expression d'une isoforme des lamines suffit à perturber la structure de la lamina nucléaire (Sullivan et al., 1999 ; Vigouroux et al., 2001 ; Muchir et al., 2004 ; Vergnes et al., 2004 ; Guo et al., 2014) confirmant l'influence réciproque des lamines-A et des lamines-B sur leur maillage respectif.

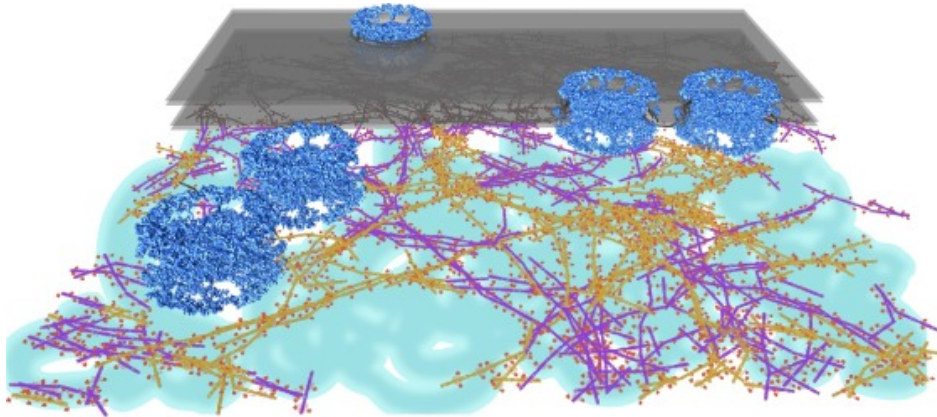


Figure 7 : Modélisation numérique de l'enveloppe nucléaire

Les lamines-A (jaune) et les lamines-B (violet) forment des maillages filamenteux séparés et connectés aux complexes de pores nucléaires (bleu).

Adaptée de (de Leeuw et al., 2018).

En raison de la forte densité de la lamina, l'organisation exacte de cette dernière reste difficile à déterminer. Cependant, les lamines-B étant farnésylées, il est supposé qu'elles soient majoritairement associées à la membrane interne du noyau tandis que les lamines-A soient plutôt localisées proches de la chromatine périphérique (Shimi et al., 2015).

La localisation des lamines varie au cours du cycle cellulaire et plus particulièrement lors de la mitose. Pendant la prophase, l'enveloppe nucléaire se désagrège conduisant à la dispersion de ses composants dans le cytoplasme. La dépolymérisation du réseau résulte de la phosphorylation des lamines par des protéines kinases CDK1 (cyclin-dépendant kinase 1) et PKC (proteïn kinase C) (Haas and Jost, 1993 ; Heald and McKeon, 1990 ; Peter et al., 1991). L'hyperphosphorylation des lamines est cruciale dans leur maintien sous une forme de dimères (Moir et al., 2000). Les deux isoformes majeures ne se désassemblent pas de façon simultanée. Les lamines-A sont rapidement solubilisées dans le cytoplasme (Gerace and Blobel, 1982) contrairement aux

lamines-B qui restent associées aux membranes nucléaires grâce à l'ancrage de leur groupement farnésyl (Stick et al., 1988). Lors de la télophase en fin de mitose, les lamines s'assemblent à nouveau grâce à la déphosphorylation des lamines par des protéines phosphatases 1 et 2A (PP1 et PP2A respectivement) afin de reconstituer la lamina dans le noyau de chacune des deux cellules filles nouvellement formées (Gant and Wilson, 1997). Enfin, l'interphase entre deux divisions cellulaires, la localisation et l'architecture des lamines-A et lamines-B sont stables (Broers et al., 1999 ; Newport and Spann, 1987 ; Ottaviano and Gerace, 1985).

1.1.5. Fonctions

Du fait de leur structure en réseau de filaments sous l'enveloppe nucléaire, l'unique rôle attribué aux lamines a d'abord été structural dans le maintien de la forme du noyau et dans la résistance aux contraintes mécaniques. Cependant, on sait aujourd'hui que les lamines sont également présentes dans le nucléoplasme et remplissent d'autres fonctions allant de la régulation de la transcription aux réparations de l'ADN en passant par la communication entre le noyau et le cytosquelette. Les différentes fonctions des lamines seront décrites ci-dessous au travers de 3 axes : (A) l'architecture du noyau ; (B) la régulation de la chromatine ; (C) la mécanotransduction.

A. Architecture du noyau

La lamina nucléaire qui tapisse la membrane interne du noyau constitue un support mécanique essentiel à l'enveloppe nucléaire. En effet, les cellules qui n'expriment pas les lamines sont plus déformables et plus fragiles que des cellules saines (Camps et al., 2014; Lammerding et al., 2004, 2006). Plus précisément, c'est le ratio lamine-A/lamine-B qui influence la viscoélasticité du noyau. Ainsi, un faible ratio sera à l'origine d'un noyau plus déformable rendant également la cellule plus sensible aux contraintes mécaniques (Schuldt, 2013). Pour répondre à cette contrainte, le ratio lamine-A/lamine-B est proportionnel à l'élasticité du tissu (Swift et al., 2013). Dans les tissus mous qui sont élastiques (tissus adipeux, cerveaux), les lamines-A sont moins exprimées au profit d'une expression élevée de lamines-B afin de protéger efficacement le noyau des cellules de ces tissus contre les contraintes mécaniques. À l'inverse, les lamines-A seront fortement

exprimées dans des tissus peu élastiques, également appelés tissus durs (muscles, os) afin de réduire la distension du noyau. Les lamines-A confèrent donc viscosité et rigidité, tandis que les lamines-B confèrent l'élasticité nécessaire au noyau pour lui permettre de revenir à une forme normale après déformation (Lammerding et al., 2006 ; Pajeroski et al., 2007).

Par ailleurs, les cellules qui expriment des lamines-A mutées ou en quantité insuffisante présentent *in vivo* des dysmorphies accrues du noyau (Favreau et al., 2003). L'étude de fibroblastes issus de biopsies de peau de patients souffrant de la progéria de Hutchinson-Gilford (Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome ou HGPS) qui expriment une lamine A mutée, appelée progérine ou LA Δ 50, a permis de montrer que dans 48% des cas, l'enveloppe nucléaire de ces fibroblastes ont une forme irrégulière (Eriksson et al., 2003a). Plus précisément, leurs noyaux sont sévèrement déformés avec des invaginations de l'enveloppe nucléaire formant des protubérances nommées « blebs » (Dahl et al., 2006 ; Goldman et al., 2004) (cf. partie 1.2 « Focus sur une laminopathie : La progéria de Hutchinson-Gilford »). De plus, dans un modèle murin n'exprimant pas les lamines A/C, il a été montré que les fibroblastes possèdent des perturbations nucléaires telles qu'une élongation du noyau ainsi que des délocalisations de l'Emerine, une protéine partenaire des lamines A et C (Sullivan et al., 1999). Par ailleurs, l'altération des niveaux de lamine B1 induit également des altérations de l'architecture nucléaire (Schirmer et al., 2001; Barascu et al., 2012; Chen et al., 2019).

La localisation des NPC est également perturbée lorsque le niveau d'expression des lamines n'est pas suffisamment élevé (Chen et al., 2013 ; Kubben et al., 2011). L'altération des lamines A et B conduit à une distribution anormale des NPC (Guo et al., 2014) confirmant l'importance des lamines dans l'architecture nucléaire.

B. Régulation de la chromatine

i. Organisation de la chromatine

Les premières images de microscopie électronique à transmission qui illustraient la lamina nucléaire ont également révélé son association étroite avec la chromatine conférant aux lamines un rôle dans l'organisation du génome (Fawcett, 1966; Patrizi and Poger, 1967) (**Figure 8A**). Ce rôle a plus récemment été démontré au travers de différentes études (Dechat et al., 2008 ; Briand and Collas, 2018). Parmi ces études, des

travaux de microscopie électronique ont permis de mettre en évidence une perte partielle de l'hétérochromatine périphérique ainsi qu'une condensation et un réarrangement de l'hétérochromatine centromérique dans des fibroblastes embryonnaires et des cardiomyocytes issues de souris *Lmna*^{-/-} (Galiová et al., 2008). Du fait de leur interaction, les lamines peuvent ainsi organiser et réguler la position de la chromatine. L'interaction entre la lamina nucléaire et la chromatine peut être directe ou indirecte par le biais de protéines de liaisons aux lamines.

La lamina interagit directement avec la chromatine au niveau de régions génomiques précises appelées domaines associés aux lamines (LADs pour « lamines associated domains ») qui s'étendent de 10 kilobases (Kb) à 10 mégabases (Mb) et qui sont distribués le long des chromosomes (*Figure 8B*). Chez l'Homme et la souris, la technique DamID qui permet de cartographier l'interaction protéine-génome, a permis d'identifier entre 1000 et 1500 LADs associés aux lamines B1, soit un tiers du génome faisant des LADs l'une des composantes les plus importantes de l'épigénome (van Steensel and Belmont, 2017a). Les LADs sont des régions d'hétérochromatine de par leur faible densité et expression génique (Guelen et al., 2008), leur temps de réplication long (Peric-Hupkes et al., 2010), leur séquence riche en A-T appelée région d'attachement à la matrice (MAR pour « matrix attachment region ») (Zhao et al., 1996) ainsi que de par leur nombre important de modifications d'histones H3H9me2 et H3K9me3 (Wen et al., 2009). Les LADs sont donc majoritairement constitués de locis inactifs qui sont bordés par des protéines CCCTC-binding factor (CTCF) afin de délimiter les locis actifs situés à l'extérieur des LADs jouant ainsi un rôle dans la répression génique (van Steensel and Belmont, 2017a) (*Figure 8C*).

La lamina peut également interagir avec la chromatine de façon indirecte. Plusieurs groupes de protéines permettant d'établir un lien entre les lamines et la chromatine ont été décrits. Le premier à avoir été identifié est celui regroupant : (1) le polypeptide associé à la lamine (LAP pour « lamina-associated polypeptide ») ; (2) l'Emerine ; (3) MAN1. Ce groupe très conservé au cours de l'évolution (Barton et al., 2015), est appelé LEM qui est également le nom du domaine globulaire d'environ 40 acides aminés commun au 3 protéines qui le constitue. Il a été démontré que le domaine LEM permet l'ancrage de BAF (pour « barrier-to-autointegration factor ») qui est lui-même lié à l'ADN formant de grands complexes nucléoprotéiques. Les récepteurs de la lamine B (LBR pour « lamin B-receptor ») est le deuxième groupe de protéines membranaires connu pour sa capacité à

lier la chromatine ainsi que la lamina pendant l'interphase (Olins et al., 2010). L'extrémité N-terminale se lie à la lamine B et à l'hétérochromatine alors que l'extrémité C-terminale permet l'ancrage à la membrane nucléaire interne. Les LAPs et les LBRs interagissent avec la chromatine via les histones tandis qu'il a été démontré que les lamines peuvent se lier directement à l'ADN (Shoeman and Traub, 1990; Rzepecki et al., 1998; Stierlé et al., 2003) possiblement via les régions d'ADN d'attachement à la matrice (MAR pour « matrix attachment regions ») (Baricheva et al., 1996; Ludérus et al., 1992, 1994; Zhao et al., 1996).

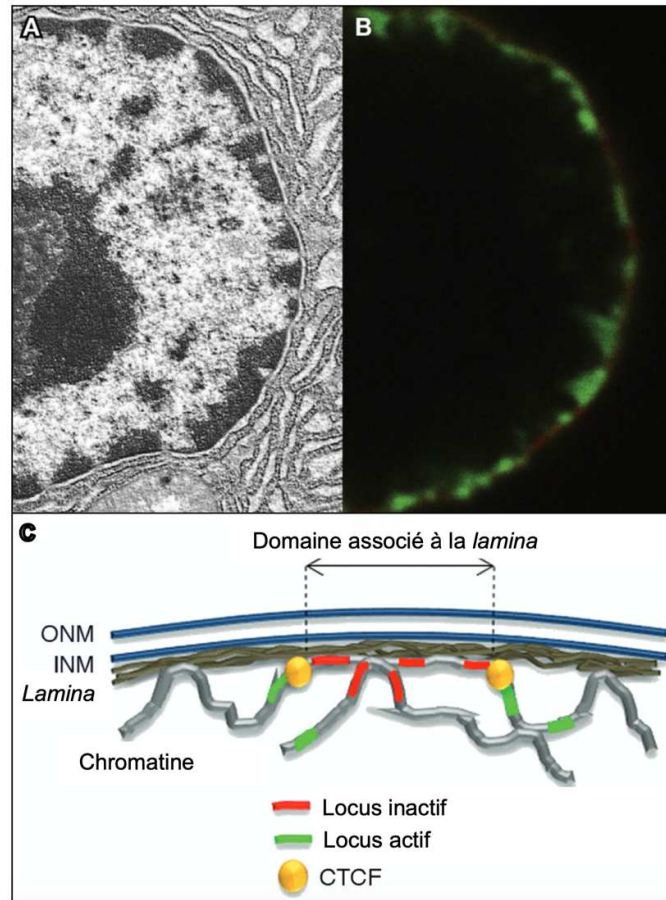


Figure 8 : Domaines associés aux lamines (LADs)

A. Noyau de cellule murine en microscopie électronique. L'hétérochromatine (densément colorée) est associée à la lamina sous l'enveloppe nucléaire mais se retrouve également autour des nucléoles et est dispersée dans le noyau.

B. Marquage des zones de liaisons entre la chromatine et les lamines (vert) dans une cellule humaine par la technologie DamID (pour « DNA adenine methyltransferase identification »). La lamine B1 est représentée en rouge.

C. Modèle schématisant la lamina nucléaire interagissant avec la chromatine via les LADs. L'enveloppe nucléaire se compose d'une membrane nucléaire externe et interne (ONM et INM respectivement) doublée de la lamina. Les LADs sont constitués de régions chromatiniennes inactives et sont bordés par des protéines CTCF.

Adaptée de (Lund and Collas, 2013; van Steensel and Belmont, 2017b).

ii. Dommages à l'ADN

Les cassures double-brin de l'ADN (CDB) peuvent être induites soit par des dommages exogènes tels que les radiations ionisantes/chimiques et les ultra-violets, soit par des dommages endogènes comme les radicaux libres, les erreurs de réplication ou encore l'action de certaines enzymes. Selon le stade du cycle cellulaire, il existe deux voies de réparations mutuellement exclusives : (1) la réparation par jonction d'extrémités non-homologues (NHEJ), dont les deux extrémités de la cassure sont directement fusionnées, se produisent tout au long du cycle cellulaire mais principalement en phase G₀/G₁ et G₂ ; (2) la recombinaison homologue (HR) est basée sur la copie de l'information génétique d'une région homologue et est favorisée en phase S, par la présence de chromatide sœur ainsi qu'en phase G₂ grâce aux séquences homologues répétées et dispersées dans l'ensemble génome (Jackson and Bartek, 2009). Les lamines de type A et B sont essentielles à ces 2 mécanismes de réparations des CDB (Willaume et al., 2021). Néanmoins, sachant que mon projet de thèse s'intéresse à une maladie associée à la mutation du gène *LMNA*, cette partie se focalisera sur le rôle des lamines-A dans la réponse aux dommages à l'ADN.

L'absence de lamines-A dans des fibroblastes murins issus de souris *Zmpste24*^{-/-} a été associée à une altération de 53BP1, une protéine du nucléosquelette qui permet le recrutement des facteurs de la NHEJ au niveau des cassures (Liu et al., 2005). Les niveaux de 53BP1 sont également altérés dans des fibroblastes humains qui n'expriment pas les lamines A/C conduisant à une augmentation des CDB (Liu et al., 2005; Redwood et al., 2011; Gibbs-Seymour et al., 2015). Les lamines-A jouent également un rôle dans la HR. En effet, l'expression de BRCA1 est diminuée dans des fibroblastes *Lmna*^{-/-} murins. Ainsi, la translocation de RAD51 et la réparation des dommages par HR est également diminuée (Redwood et al., 2011). Les lamines-A ont donc un double rôle majeur dans la réparation des CDB du fait de la régulation de facteurs impliqués à la fois dans la NHEJ et dans la HR. Il a également été démontré que les lamines interagissent avec la forme phosphorylée de l'histone 2aX (γ H2Ax), un marqueur de dommages à l'ADN. Cette interaction est d'autant plus importante que le nombre de dommages à l'ADN est grand ce qui confirme l'implication des lamines-A dans la détection des dommages à l'ADN (Mahen et al., 2013).

Les lamines-A jouent aussi un rôle dans la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS). Dans des fibroblastes de patients HGPS, le niveau basal de ROS est 5 fois supérieur aux fibroblastes sains indépendamment de la morphologie anormale du noyau. Dans cette même étude, le traitement de ces cellules avec un antioxydant a permis de

diminuer les niveaux de ROS ainsi que les cassures de l'ADN (Richards et al., 2011). Dans leur ensemble, ces études confirment le rôle des lamines dans la stabilité génomique au travers : (1) du contrôle de la production de ROS ; (2) de la détection et la réparation des dommages à l'ADN ; (3) de la régulation du cycle cellulaire ; (4) de l'assemblage nucléaire post-mitose (pour les points (3) et (4), cf. partie 1.1.4 « Localisation et dynamique au cours du cycle cellulaire »).

iii. Réplication et transcription de l'ADN

De nombreuses études ont permis de mettre en évidence le rôle des lamines dans la réplication de l'ADN. Cependant, leur rôle exact n'a pas encore été clairement défini. L'altération de l'assemblage des lamines dans des œufs de *Xenopus* inhibe l'initiation de la réplication de l'ADN tandis que la perturbation des lamines dans les noyaux, qui ont déjà initié la réplication de l'ADN, n'inhibe pas la synthèse d'élongation. Cela se traduit par l'importance des lamines dans la phase d'initiation de la réplication de l'ADN mais pas pour la phase d'élongation (Newport and Spann, 1987; Meier et al., 1991; Ellis et al., 1997; Spann et al., 1997; Moir et al., 2000; Broers et al., 2006). De plus, lors la phase S, la lamine B1 interagit avec le facteur de réplication « antigène nucléaire des cellules en prolifération » (PCNA) qui permet d'augmenter la processivité des ADN polymérase ce qui confirme le rôle des lamines dans l'organisation d'un échafaudage protéique essentiel pour la phase d'élongation de la réplication (Moir et al., 1994). La lamine C peut également se lier directement à PCNA via son motif Ig-Fold. Une mutation de le motif Ig-Fold inhibe la liaison PCNA-Lamine C à l'origine de l'inhibition de la réplication de l'ADN (Shumaker et al., 2008). Enfin, le rôle majeur des lamines A/C dans la réplication a également été démontré lors d'un stress répliatif par la liaison des lamines-A à l'ADN nouvellement formé permettant de recrutement des facteurs RPA et RAD51 qui assurent le maintien de la fourche de réplication (Graziano et al., 2021). Ainsi, l'expression de la progérine qui induit un stress répliatif entraîne un blocage de la fourche de réplication (Kreienkamp et al., 2018).

Les lamines ont également la capacité de réguler l'activité transcriptionnelle de par son effet modulateur sur la structure et l'organisation de la chromatine (Peric-Hupkes et al., 2010). De plus, les lamines-A interagissent avec des facteurs de transcription tels que pRb, c-Fos, SREBP1, ERK1/2 et MEL18 qui seront libérés de la lamina nucléaire sous

l'influence de signaux spécifiques afin de permettre l'activation de gènes cibles (Nili et al., 2001). Ces derniers étant impliqués dans la prolifération, la différenciation et l'apoptose des cellules (Patil and Sengupta, 2021). La liaison des lamines-A aux promoteurs géniques induit une répression transcriptionnelle (Lee et al., 2009). Enfin, les lamines-B peuvent se lier à des facteurs de transcription ainsi qu'à l'ARN polymérase II à la fois dans les cellules embryonnaires et somatiques (Spann et al., 2002).

iv. Homéostasie des télomères

Les télomères sont les régions de séquences répétitives localisées aux extrémités des chromosomes qui participent au maintien de l'intégrité du génome. Les ADN polymérases ne peuvent répliquer les derniers nucléotides ce qui conduit à un raccourcissement progressif des chromosomes au cours des divisions cellulaires successives. L'homéostasie des télomères est principalement maintenue par les télomérases qui assurent l'allongement des télomères dans les cellules souches, germinales et cancéreuses. Dans les cellules somatiques, son activité est faible voire nulle (Blackburn, 2001). L'homéostasie des télomères est également assurée par les lamines-A. Sachant que 50% des télomères sont associés aux lamines-A, l'absence de ces dernières conduit à des altérations de compartimentation, longueur, stabilité et d'architecture des télomères (Gonzalez-Suarez et al., 2009).

In vivo, les télomères se lient aux lamines mais aussi aux protéines associées aux lamines telles que LAP2 α , BAF (Baricheva et al., 1996). Ces interactions participeraient à la réorganisation des télomères et de la chromatine après division cellulaire (Loi et al., 2016). De plus, l'interaction lamine B1 et TRF2 (facteur 2 de liaison répétée télomérique) au niveau des séquences télomérique serait importante pour la formation ainsi que la stabilisation des T-loops (Pennarun et al., 2021). De plus, l'interaction de TRF2 avec les lamines A/C a également été démontrée (Wood et al., 2014) ce que confirme le rôle des lamines dans l'intégrité des télomères.

Dans des fibroblastes embryonnaires de souris (MEF) *Lmna*^{-/-}, les télomères présentent des altérations de taille, de structure et de fonction (Gonzalez-Suarez et al., 2009). Enfin, une déficience en lamines A/C entraîne des modifications épigénétiques (Gonzalez-Suarez et al., 2009) qui sont nécessaires au contrôle de la longueur des télomères confirmant l'importance des lamines dans le maintien de l'homéostasie des télomères.

C. Mécanotransduction

La mécanotransduction est le processus par lequel les cellules convertissent les stimuli mécaniques exercés par leur environnement en message électrique, biochimique ou génétique (Sidi and Rosa, 2004). Les stimuli extracellulaires sont d'abord perçus par des protéines transmembranaires, les intégrines, qui transmettent le signal au cytosquelette. Au sein de l'enveloppe nucléaire, les protéines SUN (Sad1 et UNc84) ainsi que les Nesprines, des protéines à domaine KASH (Klarsicht, Anc1 et Syne1), forment un complexe protéique qui assure le lien entre le cytosquelette et le nucléosquelette de lamines (LINC pour « Linker of Nucleoskeleton and Cytoskeleton ») (Crisp et al., 2006) (*Figure 9*). La lamina est donc un mécanosenseur capable de recevoir les stimuli extracellulaires mais c'est également un mécanotransducteur du fait de sa capacité à convertir ces stimuli en réponses cellulaires. En effet, le niveau de phosphorylation des lamines conduit à une modification de leur structure moléculaire ainsi que de la lamina (Liu and Ikegami, 2020). Ces réarrangements ont un impact sur la structure de la chromatine et par conséquent, sur l'expression génique. Cela permet ainsi à la cellule de s'adapter à son environnement en fonction des signaux reçus via l'activation de voies impliquées notamment dans la protection nucléaire, la mobilité cellulaire ou la différenciation (Donnaloja et al., 2020). En présence de mutations dans les lamines nucléaires, ces voies de signalisations sont altérées ce qui confirme le rôle des lamines dans la mécanotransduction (Andrés and González, 2009).

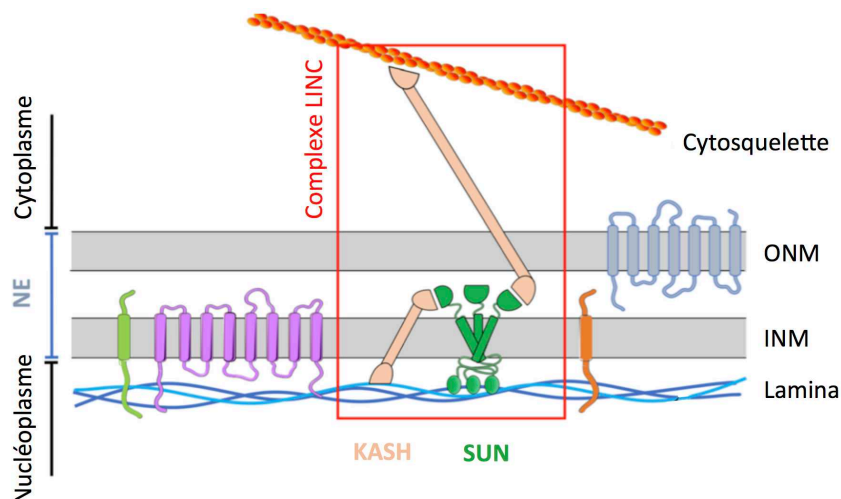


Figure 9 : Protéines impliquées dans la mécanotransduction

Les protéines à domaine KASH ainsi que les SUN forment le complexe LINC qui assure une transmission des signaux mécaniques jusqu'au noyau.

ONM : outer nuclear membrane ; INM : inner nuclear membrane ; NE : nuclear envelope.
Adaptée de (Janin et al., 2017).

1.1.6. *Laminopathies*

Les laminopathies constituent un groupe hétérogène de maladies génétiques causées par des mutations du gène *LMNA* exclusivement. Des mutations dans les gènes *LMNB1* et *LMNB2* ont également été associées à des maladies humaines qui forment, avec les laminopathies, un groupe appelé « envelopathies » (Hegele et al., 2006; Padiath et al., 2006). Les lamines-B étant exprimées au cours du développement, l'organogénèse est perturbée en présence d'une altération de l'expression de ces dernières. En effet, l'embryon de souris mutantes pour *Lmnb1* se développe mais présentent des défauts pulmonaires ainsi qu'osseux et décèdent à la naissance (Vergnes et al., 2004). Le rôle majeur des lamines-B dans le développement embryonnaire explique le faible nombre de pathologies associées aux mutations des gènes *LMNB1/2* contrairement aux mutations du gène *LMNA* qui, n'étant pas incompatibles avec la survie, sont à l'origine des laminopathies (Donnaloja et al., 2020).

Par clonage positionnel en 1999, les premières pathologies à avoir été associées à une mutation du gène *LMNA* sont la dystrophie musculaire d'Emery-Dreifuss (EDMD) (Bonne et al., 1999) ainsi que les cardiomyopathies. Depuis les années 2000, les progrès en génétique ont permis d'identifier plus de 200 mutations dans le gène *LMNA* qui conduisent à une dizaine de laminopathies. Ces dernières sont communément divisées en 4 groupes selon le nombre et le type de tissus affectés : (A) muscles striés ; (B) tissu adipeux ; (C) système nerveux ; (D) multi-système : syndrome de vieillissement prématuré (**Figure 10**). Dans la majeure partie des cas, les laminopathies sont à l'origine d'une unique mutation dans le gène *LMNA* conduisant dans 74% des cas à une myopathie. Pour les 26% restant, cela aboutit à l'apparition d'une lipodystrophie ou d'un syndrome de vieillissement prématuré. Toutes les mutations, ainsi que les laminopathies associées, sont répertoriées dans une base de données universelle qui est accessible à l'adresse suivante : www.umd.be/LMNA/.

A. Laminopathies des muscles striés

Cette première catégorie regroupe un ensemble de myopathies affectant à la fois les muscles squelettiques et cardiaques. L'EDMD est une laminopathie des muscles striés pour laquelle, en plus de l'atrophie des muscles huméro-péronéaux, les patients souffrent de rétractations tendineuses dès l'enfance et développent une cardiomyopathie dilatée

ainsi que des troubles de rythme/conduction à l'âge adulte (Emery, 2000; Muchir et al., 2007). La dystrophie musculaire des ceintures de type 1B (LGMD1B) est quant à elle caractérisée par une atrophie musculaire spécifique des ceintures pelviennes et scapulaires. Les atteintes cardiaques à l'âge adulte sont identiques à celles observées dans l'EDMD (Muchir et al., 2000). Il existe également des cardiomyopathies dilatées (DCM-CD) liées à des mutations du gène *LMNA* sans atteintes squelettiques. Dans ces formes, les troubles de rythme et de conduction sont également similaires à ceux observés dans l'EDMD (Fatkin et al., 1999; Muchir et al., 2009; Lu et al., 2011). Plus récemment, la dystrophie musculaire congénitale ainsi que le syndrome de cœur-main ont été associés aux laminopathies des muscles striés compte tenu des troubles squelettiques et cardiaques sévères développés par les patients (Quijano-Roy et al., 2008; Renou et al., 2008).

B. Lipodystrophies

Dans cette classe de laminopathies, on retrouve des dystrophies du tissu adipeux ayant des conséquences sur la fonction du métabolisme. La lipodystrophie partielle familiale de type Dunnigan (FPLD) est la forme la plus fréquemment observée. Elle se caractérise par une lipoatrophie des membres inférieurs, une accumulation du tissu adipeux viscéral ainsi que sous-cutané au niveau du cou et du visage (Shackleton et al., 2000). La dysplasie mandibulo-acrale est également une laminopathie du tissu adipeux puisque les patients ont une répartition anormale du tissu adipeux sous-cutané. Cependant, les patients présentent également des symptômes du vieillissement accéléré ce qui explique que cette laminopathie peut également être classée dans les syndromes multi-systèmes (Novelli et al., 2002). Enfin, de très rares cas de lipoatrophies généralisées ont été associés à des mutations du gène *LMNA* (Caux et al., 2003).

C. Laminopathies du nerf périphérique

Des mutations du gène *LMNA* ont été décrites chez certains individus atteints de la maladie de Charcot-Marie-Tooth (CMT) (Charcot-Marie-Tooth Disorder Type 2) (De Sandre-Giovannoli et al., 2002). C'est actuellement la seule laminopathie du nerf périphérique connue. Sur le plan clinique, ces patients présentent une neuropathie motrice et sensorielle qui conduit à une atrophie musculaire et une perte des réflexes ostéotendineux.

D. Laminopathies multi-systémiques

Cette dernière classe de laminopathies regroupe des syndromes qui affectent plusieurs systèmes. Ces laminopathies, autrement appelées syndromes progéroïdes, sont caractérisées par un vieillissement prématuré. Parmi eux, le plus étudié est le syndrome de Progéria de Hutchinson-Gilford (HGPS) qui sera décrit dans la prochaine section (cf. partie 1.2. « Focus sur une laminopathie : La progéria de Hutchinson-Gilford ») (De Sandre-Giovannoli et al., 2003; Eriksson et al., 2003a). Le syndrome atypique de Werner est similaire à celui HGPS avec généralement une ostéoporose, de l'athérosclérose, une lipodystrophie, une atrophie cutanée ainsi qu'une petite taille (Yu et al., 1996). Enfin, la dermatopathie restrictive se caractérise par un retard de croissance prénatal qui conduit à une détresse pulmonaire et au décès des patients en période néonatale (Muchir et al., 2004; Navarro et al., 2004).

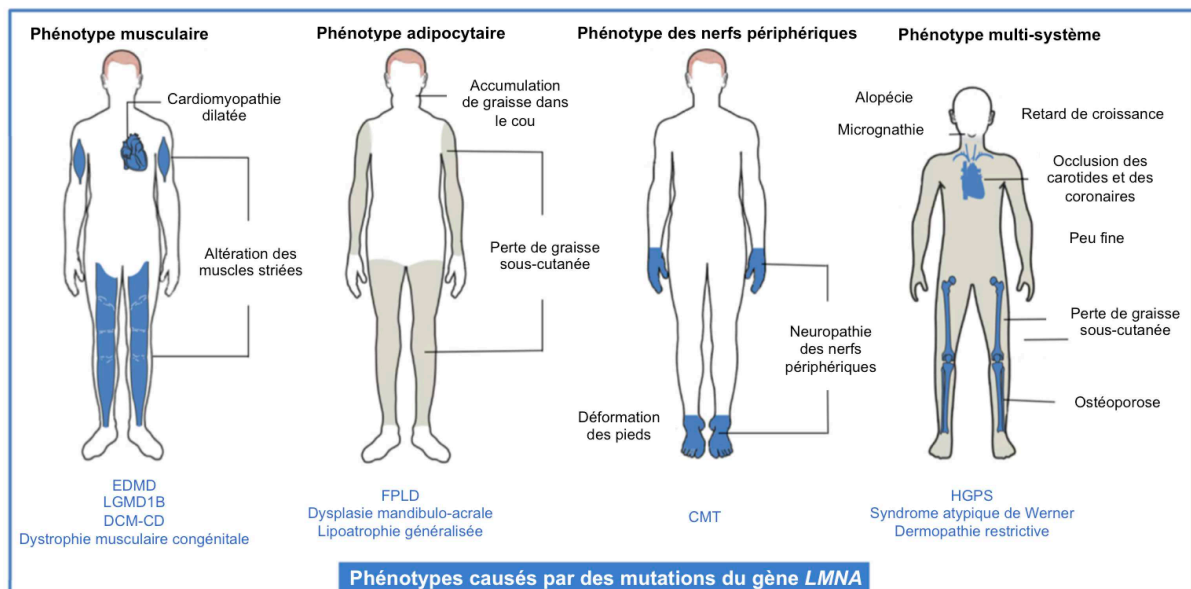


Figure 10 : Phénotypes des laminopathies

4 phénotypes majeurs ont permis de classer les laminopathies selon les atteintes : musculaires, adipocytaires, des nerfs périphériques ou multi-systémiques du vieillissement accéléré.

EDMD : Emery-Dreifuss muscular dystrophy ; LGMD1B : limb girdle muscular dystrophy type 1B ; DCM-CD : dilated cardiomyopathy with conduction systems disease ; FPLD : familial partial lipodystrophy ; CMT : Charcot-Marie-Tooth ; HGPS : Hutchinson-Gilford progeria syndrome.

Adaptée de (Janin et al., 2017).

1.2. Focus sur une laminopathie : La progéria de Hutchinson-Gilford

1.2.1. Généralités

La progéria est un mot dérivé du grec ancien qui provient de la contraction de « geras » qui signifie « vieillesse » et de « pro » caractérisant ainsi une maladie du vieillissement précoce. Les médecins anglais Jonathan Hutchinson et Hastings Gilford ont décrit pour la première fois la progéria en 1886 et 1897 respectivement (Hutchinson, 1886; Gilford, 1897), raison pour laquelle on l'appelle progéria de Hutchinson-Gilford abrégée « HGPS ». Dans les années 1900, plusieurs cas de progéria ont progressivement été signalés dans tous les continents. En 1998, la fondation pour la recherche sur la progéria (PRF) a été créée par les Dr. Leslie Gordon et Scott Berns à la suite du diagnostic HGPS de leur fils Sam. Peu de temps après, l'intérêt pour cette maladie s'est accrue en 2003 lorsque la mutation à l'origine de la progéria a été identifiée dans le gène *LMNA* par une équipe française ainsi qu'une équipe américaine (De Sandre-Giovannoli et al., 2003; Eriksson et al., 2003a). Cette découverte a permis de comprendre les mécanismes qui conduisent à la physiopathologie et de développer des stratégies thérapeutiques. Bien que les premiers essais cliniques remontent à 2007, il n'existe actuellement pas de traitement curatif. Fin 2020, le lonafarbib est le premier médicament approuvé aux États-Unis par la Food and Drug Administration (FDA) comme traitement pour la progéria puisqu'il permet une augmentation de la longévité des patients de 2 ans en moyenne. Afin d'augmenter davantage l'espérance de vie des patients, de nouvelles pistes sont en cours d'étude (cf. partie 1.2.6 « Traitements et perspectives thérapeutiques »).

1.2.2. Épidémiologie

La progéria est une maladie génétique très rare puisqu'elle touche un enfant sur 20 millions. Cela représente une prévalence de 133 enfants dans le monde répartis dans 50

pays (données du mois d'octobre 2021, www.progeriaresearch.org). Ce chiffre est probablement sous-évalué puisqu'il y aurait environ 200 enfants atteints mais non diagnostiqués dont les deux tiers seraient localisés en Chine et en Inde. Ainsi, on estime à environ 350 le nombre total de patients atteints de progéria. La progéria est diagnostiquée autant chez les femmes que les hommes et sans prédisposition ethnique. Enfin, cette maladie génétique n'est pas héréditaire puisque les patients, dont l'espérance de vie est de 14 ans, décèdent avant la puberté (Ahmed et al., 2018).

1.2.3. *Phénotype clinique*

Bien que les enfants atteints de la progéria de Hutchinson-Gilford ne présentent aucun symptôme à la naissance, les patients développent différents signes cliniques du vieillissement dès leur première année de vie. La croissance postnatale est sévèrement perturbée ce qui explique leur petite taille, généralement inférieure à 120cm, pour un poids maximum de 30kg (Gordon et al., 2007). Le visage de ces enfants présente communément une micrognathie (hypoplasie de la mâchoire inférieure) accompagnée d'anomalies de la dentition (Kieran et al., 2007). En effet, les enfants souffrent d'encombrement dentaire qui se manifeste par des rangées doubles de dents. Leurs yeux sont souvent proéminents et les patients souffrent de strabisme et de myopie. Leur nez est en forme de bec, leur voix est aiguë et ils présentent une légère perte auditive (Domingo et al., 2009) (*Figure 11*). La progéria est une maladie du vieillissement segmentaire puisque les systèmes osseux, cutanés et cardiovasculaires sont atteints tandis que le système nerveux central est épargné. Le phénotype clinique sera ainsi détaillé sous 4 axes : (A) Anomalies osseuses et tendineuses ; (B) Perte du tissu adipeux sous-cutané et alopécie ; (C) Athérosclérose sévère et pathologies cardiovasculaires ; (D) Phénotypes du vieillissement absents de la progéria.

Parmi toutes ces atteintes, celles du système cardiovasculaire sont les principales causes de mortalité précoce des patients à un âge médian de 14.6 ans (Gordon et al., 2014).

A. Anomalies osseuses et tendineuses

Le squelette présente une diminution de la densité minérale et une déminéralisation plus particulièrement à l'extrémité des os longs. Les patients ont de

petites clavicules et de fines côtes à la suite d'une sévère ostéopénie de ces os (Sivaraman et al., 1999). Par ailleurs, les phalanges distales sont sujettes à l'ostéolyse conduisant à des déformations des doigts et des orteils. De plus, la croissance anormale du crâne le rend plus fragile et par conséquent, augmente le risque de fracture de la boîte crânienne. Le mouvement des articulations est normal à la naissance et diminue à l'âge de 2 ans au niveau des genoux puis des coudes et des doigts. Cette raideur articulaire est responsable de la démarche lente des patients. Avec l'âge, les articulations des chevilles, des poignets ainsi que des épaules perdent en mobilité et peuvent par conséquent devenir douloureuses (Gordon et al., 2011).

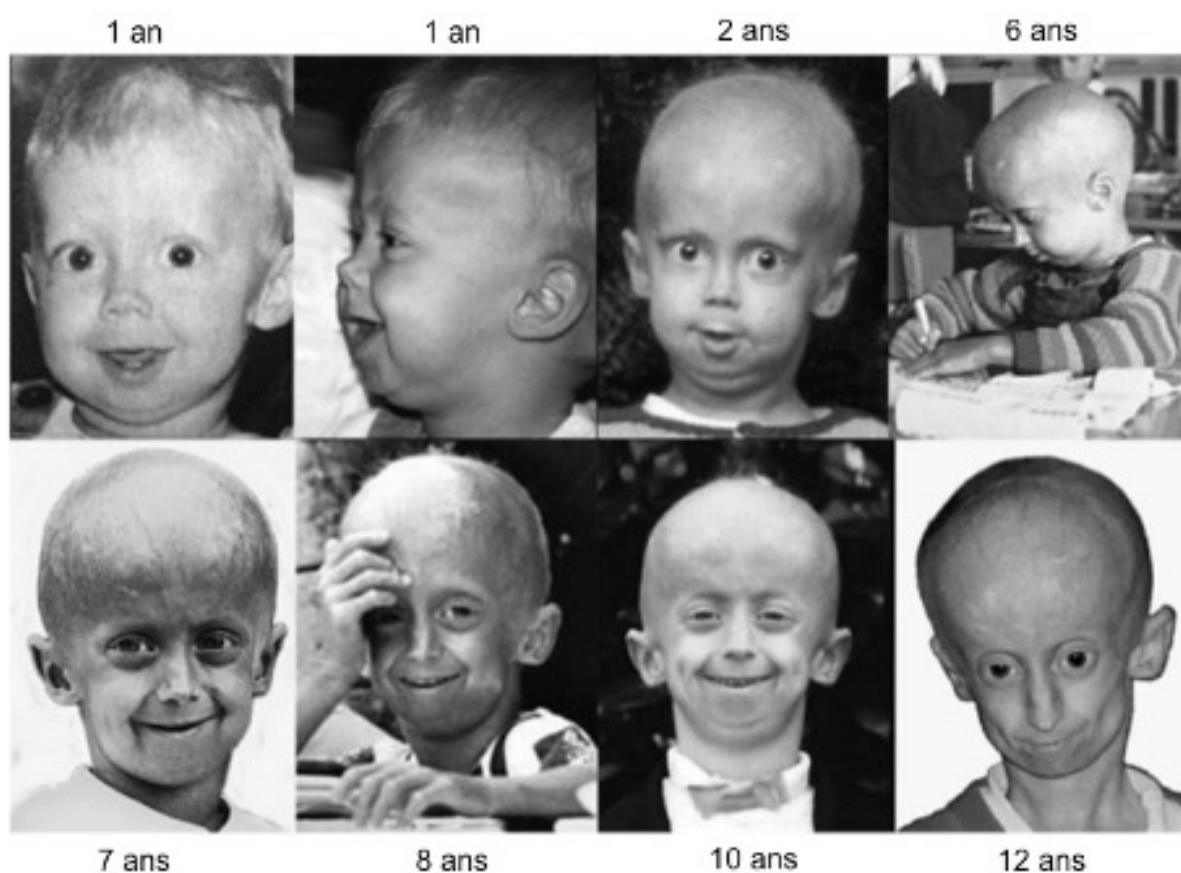


Figure 11 : Évolution du phénotype clinique de la progéria de Hutchinson-Gilford
Photographies d'un enfant atteint de la progéria à différents âges.
Adaptée de (Hennekam, 2006).

B. Perte du tissu adipeux sous-cutané et alopécie

La progéria se manifeste cliniquement par une lipodystrophie. Cette dernière est visible à partir de 3 ans et plus particulièrement au niveau des jambes. Elle est ensuite remarquable au niveau du thorax et du visage (Merideth et al., 2008). La perte de graisse

intra-orbitaire explique notamment la proéminence des yeux sans exophtalmie. (Hennekam, 2006). Avec l'âge, la diminution de graisse sous-cutanée ainsi que l'amincissement de la peau rendent les veines plus visibles. Les veines sont d'autant plus visibles au niveau du cuir chevelu puisque les patients perdent progressivement leurs cheveux dès 6 mois allant jusqu'à l'alopecie presque totale entre 2 et 3 ans (Rork et al., 2014).

C. Athérosclérose sévère et pathologies cardiovasculaires

Sur le plan cardiaque, les patients développent une dysfonction diastolique du ventricule gauche associée à des troubles de conduction (Prakash et al., 2018; Rivera-Torres et al., 2016). Au niveau vasculaire, les patients présentent une athérosclérose différente de celle observée dans la population âgée de façon physiologique. En effet, les patients n'ont pas d'hypercholestérolémie mais possèdent une calcification de la média, une inflammation de l'intima et une rupture des plaques vasculaires. De plus, la fibrose adventitielle touche les parois vasculaires de ces patients les rendant denses en collagène (Stehbens et al., 1999). Tous ces symptômes, couplés à une perte importante des cellules musculaires lisses, sont à l'origine de l'augmentation de la rigidité artérielle qui conduit à l'hypertension des patients entre 6 et 8 ans (Gerhard-Herman et al., 2012). Les atteintes coronaires peuvent entraîner des angines de poitrine mais également des accidents vasculaires cérébraux à un âge médian de 9 ans (Silvera et al., 2013). Compte tenu du couplage cœur-vaisseaux, les changements d'architecture et de pression vasculaire sont à l'origine d'infarctus du myocarde qui conduit dans la plupart des cas au décès prématuré des patients.

D. Phénotypes du vieillissement absents de la progéria

Les symptômes de la progéria listés ci-dessus se retrouvent généralement dans le vieillissement physiologique. Cependant, d'autres maladies associées à l'âge, comme la cataracte ou les cancers sont absents chez les patients HGPS. Ces derniers ne possèdent pas non plus d'augmentation du tissu adipeux abdominal ni d'ostéoporose. Par ailleurs, les enfants ne présentent aucune altération cognitive (Gonzalo et al., 2017) (*Figure 12*). Les raisons moléculaires de l'absence de troubles associés au système nerveux sont connues et seront détaillées plus tard (cf. partie 1.2.4 « Physiopathologie »).

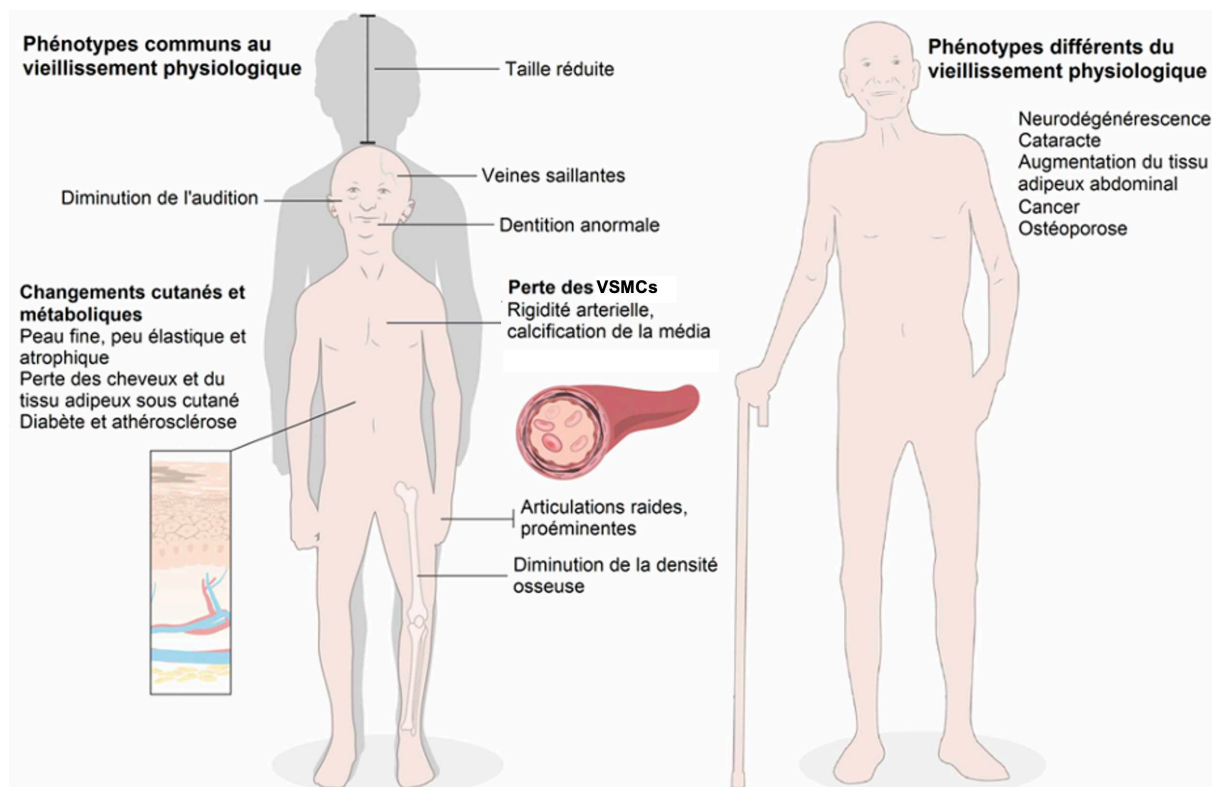


Figure 12 : Phénotypes cliniques de la progéria de Hutchinson-Gilford communs et différents du vieillissement physiologique

De manière similaire au vieillissement physiologique, les patients HGPS présentent des changements cutanés et métaboliques ainsi que des atteintes cardiovasculaires. Certains symptômes du vieillissement sont néanmoins absents tels que les cancers, la cataracte mais également la neurodégénérescence.

CMLs : Cellules Musculaires Lisses.

Adaptée de (Strandgren et al., 2017).

1.2.4. Physiopathologie

La progéria de Hutchinson-Gilford est une maladie autosomique dominante sporadique, causée dans 90% des cas par une substitution *de novo* d'une seule paire de bases dans l'exon 11 du gène *LMNA* (c.1824 C>T ; p.G608G) situé sur le chromosome 1q21.2-q21 (De Sandre-Giovannoli et al., 2003; Eriksson et al., 2003a). Cette mutation est responsable de l'apparition d'un site cryptique d'épissage au sein de l'ARN pré-messager (pré-ARNm) conduisant à la production d'une prélamine A délétée de 105 paires de bases. La protéine traduite est alors une prélamine A tronquée de 50 acides aminés (prélamine A Δ 50 ; Δ 606-656) en C-terminal dans laquelle se situe le site de clivage de l'endoprotéase ZMPSTE24 (cf. partie 1.1.2 « Du gène aux protéines »). La dernière étape de maturation post-traductionnelle de la prélamine A, qui est l'élimination du groupement farnésyl en C-

terminal par ZMPSTE, ne peut avoir lieu ce qui aboutit à l'expression d'une prélamine A tronquée et farnésylée de façon constitutive appelée « progérine » (**Figure 13**). Cette dernière, qui possède un signal de localisation nucléaire NLS, va être adressée au noyau tout en restant ancrée à la membrane nucléaire via son groupement farnésyl (**Figure 14**). L'accumulation de progérine au sein de la lamina nucléaire est responsable d'une toxicité dose-dépendante qui se manifeste par une altération de la structure et la fonction du noyau conduisant par conséquent, à l'altération de mécanismes cellulaires (cf. partie 1.2.5 « Mécanismes moléculaires ») (Burke and Stewart, 2013). La prélamine A Δ 50 a également été identifiée en faible quantité dans des fibroblastes de jeunes individus sains. Les quantités de prélamine A Δ 50 augmentent à la fois dans des cellules issues de sujets sains âgés (92 ans) et dans des cellules de patients HGPS soulignant l'existence de mécanismes moléculaires communs entre la progéria et le vieillissement physiologique (Rodriguez et al., 2009; Scaffidi and Misteli, 2006).

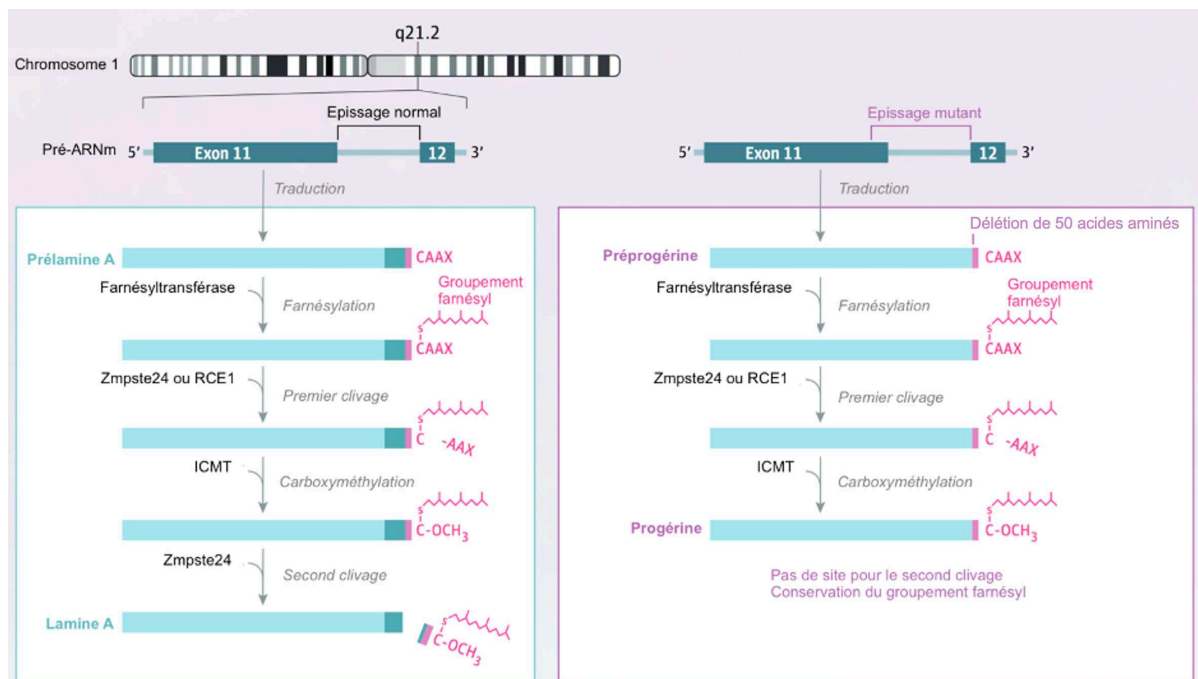


Figure 13 : Synthèse de la lamine A chez un sujet sain (gauche) et synthèse de la progérine chez un sujet atteint de la progéria (droite)

ICMT : isoprenylcysteine carboxyl methyltransferase ; ZMPSTE24 : zinc metalloproteinase STE24.

Adaptée de (Gordon et al., 2018).

Des mutations plus rares au sein du gène *LMNA* peuvent également conduire à l'expression de la progérine ou d'autres formes de lamines A tronquées : (1) prélamine A Δ 90 (c.1968 G>A ; c.1968+1 G>A ; c.1968+5 G>A) ; (2) prélamine A Δ 35 (c.1868 c>G)

(Barthélémy et al., 2015; Hisama et al., 2011). Le phénotype clinique associé à ces mutations est similaire à celui observé dans la HGPS classique, on parle donc de « HGPS-like ». Par ailleurs, il existe un deuxième groupe de laminopathies du vieillissement prématuré appelé syndrome de progéria atypique (APS). Ce syndrome est causé par des mutations faux-sens dominantes ou récessives du gène *LMNA* (c.1583 C>T ; c.1619 C>T) qui n'entraînent pas de production de la progérine ou d'autres formes de lamine A tronquée (Cabanillas et al., 2011). Sur le plan clinique, les patients ont des symptômes communs à la HGPS classique comme un retard de croissance, une micrognathie, une alopecie, une lipodystrophie ainsi que des atteintes du système cardiovasculaire (Cau et al., 2014).

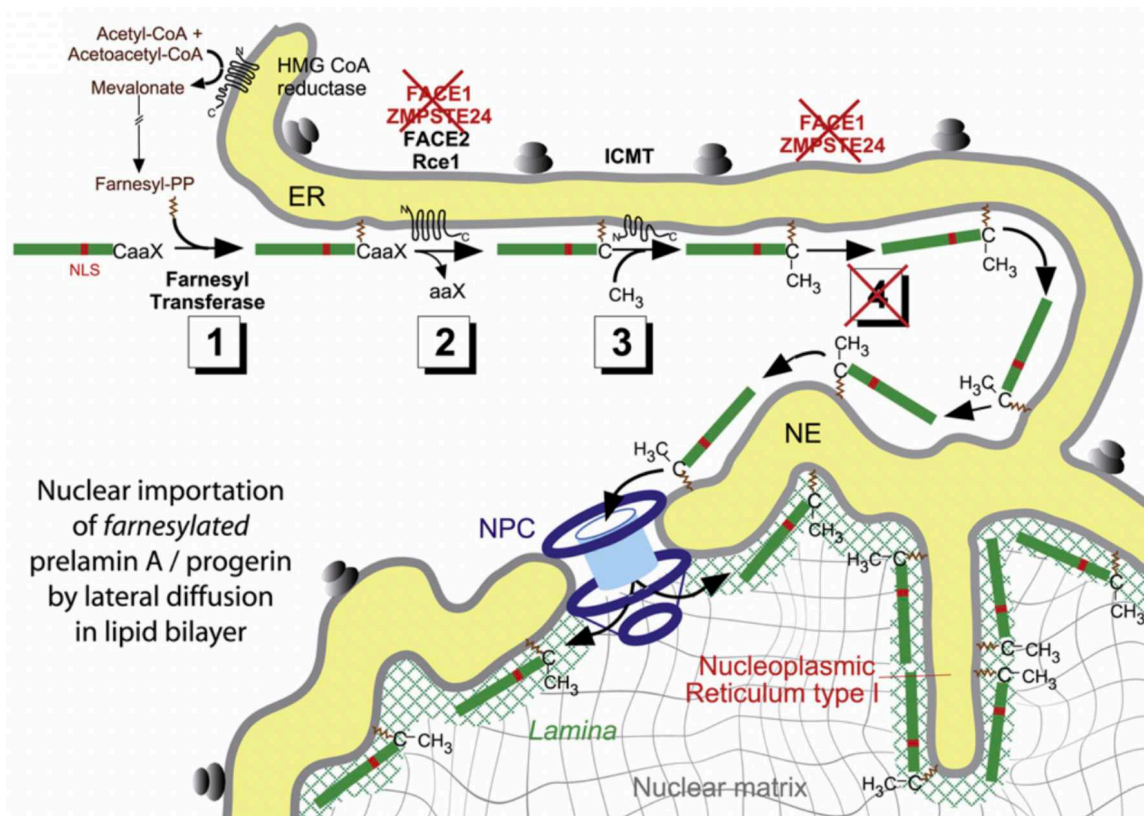


Figure 14 : Synthèse de la progérine

Processus de maturation de la progérine en 3 étapes au niveau du reticulum endoplasmique (ER) et importation nucléaire grâce au signal de localisation nucléaire (NLS) via les pores nucléaires (NPC) de l'enveloppe nucléaire (NE). Le motif farnésyl des progérines n'étant pas clivé, ces dernières restent ancrées à la membrane interne nucléaire.

ICMT : isoprenylcysteine carboxyl methyltransferase ; ZMPSTE24 : zinc metalloproteinase STE24

Adaptée de (Cau et al., 2014).

1.2.5. Mécanismes moléculaires

Les principaux mécanismes moléculaires conduisant à la physiopathologie HGPS sont actuellement bien décrits et sont généralement associés au vieillissement physiologique : (A) Lien entre vieillissement et progéria de Hutchinson-Gilford. Par ailleurs, ces mécanismes sont regroupés en différentes classes fonctionnelles qui peuvent être liées entre elles : (B) Altération de la structure nucléaire et de la résistance aux contraintes mécaniques ; (C) Désorganisation de la chromatine et changements épigénétiques ; (D) Dérégulation de l'expression génique et altération des voies de signalisation ; (E) Dommages à l'ADN et instabilité génomique ; (F) Dysfonction mitochondriale ; (G) Sénescence et SASP ; (H) Raccourcissement des télomères ; (I) Épuisement des cellules souches adultes.

A. Lien entre vieillissement et progéria de Hutchinson-Gilford

Le vieillissement se définit par une perte progressive de l'intégrité physique conduisant à une altération des fonctions de l'organisme et une vulnérabilité accrue à certaines maladies. Le vieillissement se manifeste chez la plupart des organismes vivants et conduit inévitablement au décès. Tous les mécanismes induisant le vieillissement ou conséquents à ce dernier ne sont pas complètement connus. Cependant, les phénomènes majeurs ont été décrits : (1) instabilité génomique ; (2) raccourcissement des télomères ; (3) dysfonction mitochondriale/accumulation de stress oxydatif ; (4) sénescence cellulaire ; (5) dérégulation des fonctions hormonales ; (6) défauts de réparation de l'ADN et accumulation des dommages à l'ADN ; (7) modifications épigénétiques ; (8) perte de l'homéostasie protéique ; (9) épuisement du stock de cellules souches et (10) défauts de communication intracellulaire (López-Otín et al., 2013). Ces défauts ont tous été décrits dans la progéria de Hutchinson-Gilford (Carrero et al., 2016) et seront détaillés ci-dessous. La progéria partage des altérations moléculaires communes à celles du vieillissement physiologique représentant donc un modèle d'étude du vieillissement pertinent qui suscite un vif intérêt depuis plusieurs années. Les données obtenues à la suite de différentes études sur des modèles animaux et humains de la progéria ont permis de comprendre le rôle de la prénylation de la progérine, la présence de la progérine ou le ratio entre la progérine et les lamines A/C dans les mécanismes moléculaires à l'origine de la HGPS.

B. Altération de la structure nucléaire et de la résistance aux contraintes mécaniques

La lamina nucléaire est déterminante pour la taille, la forme ainsi que pour les propriétés physiques du noyau des cellules somatiques en interphase (cf. partie 1.1.5 « Fonctions des lamines »). L'expression de la lamine A Δ 50, au détriment de lamine A dans les cellules HGPS, modifie les propriétés de la lamina nucléaire et par conséquent, la morphologie du noyau. En effet, la lamine A Δ 50 (ou la progérine) est ancrée à l'enveloppe nucléaire via le groupement farnésyl en C-terminal et s'accumule au sein de la lamina nucléaire conduisant à l'épaississement et à la déstructuration de cette dernière (Vidak and Foisner, 2016). Sachant que la lamina interagit directement avec les pores nucléaires, l'altération de l'intégrité de la lamina conduit à une distribution anormale des pores nucléaires dans les cellules HGPS (Goldman et al., 2004). Par ailleurs, le complexe LINC étant également en interaction directe avec la lamina nucléaire, l'expression de la progérine dans les cellules HGPS altère les fonctions du complexe LINC notamment par une diminution de la mobilité d'un acteur de ce complexe, SUN1 (Chen et al., 2014). De par le rôle majeur du complexe LINC dans la mécanotransduction, son dysfonctionnement en présence de la progérine contribue à la sensibilité accrue des cellules HGPS aux contraintes mécaniques (Vidak and Foisner, 2016). De plus, l'accumulation de la progérine augmente la rigidité de la lamina nucléaire ce qui diminue sa capacité de réarrangement sous les contraintes mécaniques (Dahl et al., 2006). Ainsi, les tissus avec des niveaux élevés de contraintes mécaniques tels que les os, le cœur ou les vaisseaux sont particulièrement affectés par l'expression de la progérine (Gonzalo et al., 2017). L'expression de la progérine se manifeste cependant dans tous les types cellulaires par une dysmorphie nucléaire. Le noyau des cellules HGPS est plus gros et la forme de l'enveloppe nucléaire est irrégulière avec de nombreux bourgeonnements (appelés également « blebs ») ainsi que de nombreux replis de l'enveloppe nucléaire (*Figure 15*) (Goldman et al., 2004). Les altérations de l'architecture des noyaux HGPS sont proportionnelles à la quantité de la progérine exprimée. L'apparition de défauts de l'enveloppe nucléaire sont donc progressifs et peuvent être diminués en présence d'inhibiteurs de farnésyltransférases confirmant le rôle majeur du groupement farnésyl de la lamine A Δ 50 dans la désorganisation de l'enveloppe nucléaire (Lu and Djabali, 2018).

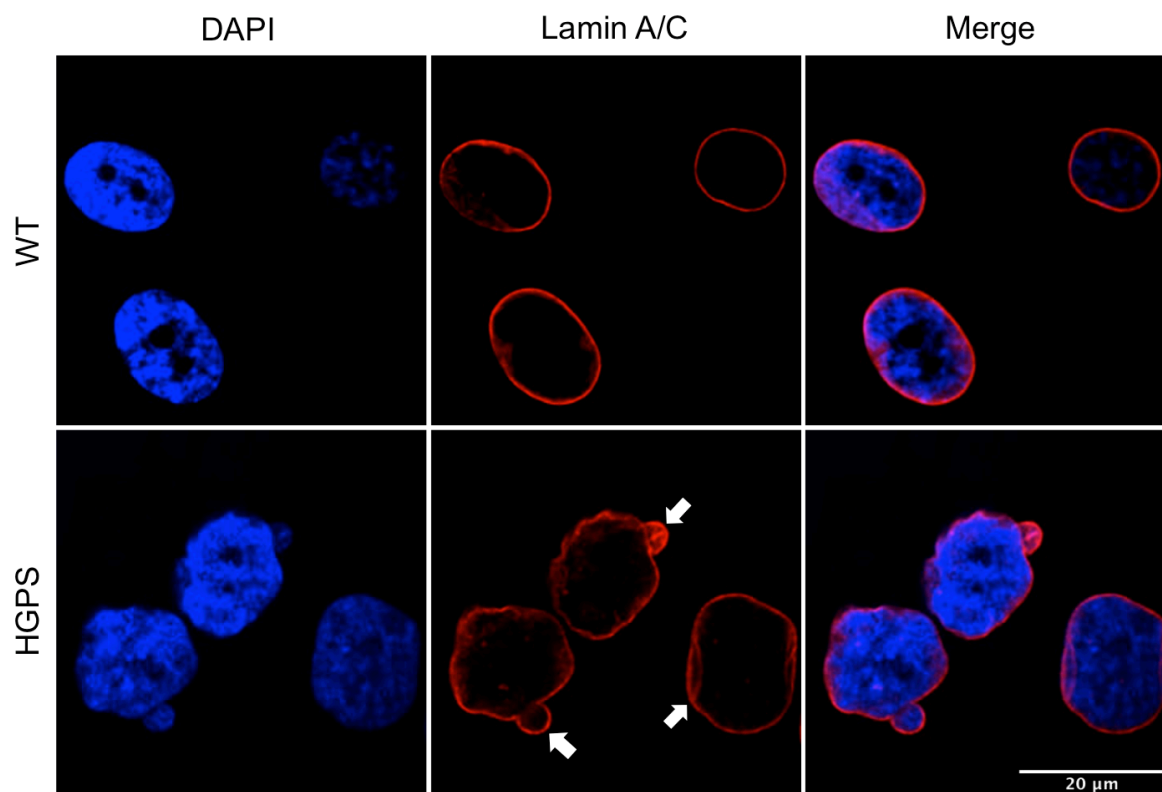


Figure 15 : L'expression de la progérine induit une déformation de l'enveloppe nucléaire présentant des bourgeonnements et des replis caractéristiques des cellules HGPS

Immunofluorescence de cellules musculaires lisses différenciées à partir de cellules pluripotentes induites (iPS pour « induced pluripotent stem cells ») dérivées de sujets sains (WT) ou de sujets HGPS avec un marquage du noyau au DAPI (bleu), des lamines A et C (Lamin A/C) et une superposition des 2 marquages précédents (merge). Les flèches mettent en évidence les bourgeonnements ainsi que les replis de l'enveloppe nucléaire des cellules HGPS. On remarque également l'augmentation de la taille du noyau des cellules HGPS comparé aux cellules saines.

C. Désorganisation de la chromatine et changements épigénétiques

Les lamines de type A interagissent avec la chromatine de façon directe via les LAD ou indirecte par l'intermédiaire des LEM et LAP conférant aux lamines A/C un rôle dans l'organisation de la chromatine et dans la régulation des changements épigénétiques (cf. partie 1.1.5 B. « Lamines et chromatines »). L'expression de la progérine dans les cellules HGPS est donc à l'origine de modifications épigénétiques ainsi que d'une désorganisation de la chromatine. L'augmentation de la lamine A Δ 50, en dépit de la lamine A, perturbe l'interaction lamina-chromatine et par conséquent, la disposition spatiale des régions chromosomiques ainsi que le repliement intranucléaire de la chromatine (Mewborn et al., 2010; Mehta et al., 2011; Puckelwartz et al., 2011). Ces désorganisations peuvent également s'expliquer par des modifications épigénétiques telles qu'une perte de

l'hétérochromatine. Les noyaux HGPS présentent en effet une diminution de marques répressives d'histones H3K9me3 et H3K27me3 (Scaffidi and Misteli, 2005; Shumaker et al., 2006). *In vitro*, la diminution de l'histone H3K27me3 est liée à une interaction délétère de la progérine avec LAP2 α (Gesson et al., 2016) tandis que la dérégulation de l'histone H3K9me3 dans les cellules HGPS est associée à une altération de l'expression de l'histone méthyltransférase Suv39h1 (Liu et al., 2013a). Par ailleurs, des études ont démontré que la lamine A interagit avec le facteur de remodelage NuRD pour « nucleosome remodeling and deacetylation » au niveau de la région délétée de la lamine A Δ 50. Sachant que cette interaction est indispensable au maintien de la méthylation de l'histone H3K9, cela expliquerait également la perte de cette marque dans les cellules HGPS (Meshorer and Gruenbaum, 2009; Pegoraro et al., 2009). De plus, l'expression de la progérine conduit notamment à une décondensation du chromosome X inactif (Shumaker et al., 2006). Enfin, une augmentation de la marque histone H4K20me3 a aussi été rapportée dans les cellules HGPS (Prokocimer et al., 2013). Ces changements épigénétiques sont contraires à ceux retrouvés dans plusieurs tumeurs expliquant la différence de certains phénotypes associés à la progéria avec ceux du vieillissement physiologique comme l'absence de cancers (Dimauro and David, 2009; Chi et al., 2010).

Les cellules HGPS présentent également des modifications de leur profil de méthylation de l'ADN. Des îlots CpG hypométhylés dans des cellules saines ont en effet été décrits comme hyperméthylés dans des cellules HGPS et inversement, des îlots hyperméthylés dans des cellules saines sont hypométhylés dans des cellules HGPS (Heyn et al., 2013). Enfin, une hyperméthylation des gènes de l'ARN ribosomal a été observée dans un modèle murin de la progéria (Osorio et al., 2010).

Dans l'ensemble, ces études révèlent que la progérine induit une désorganisation de la chromatine ainsi que des changements épigénétiques (modification des histones et de méthylation de l'ADN) expliquant, en partie, la dérégulation de l'expression de certains gènes qui sera détaillée dans le paragraphe suivant.

D. Dérégulation de l'expression génique et altération des voies de signalisation

L'expression génique est dépendante de la localisation ainsi que de l'état de compaction de la chromatine, tous deux altérés dans les cellules exprimant la progérine.

Il n'est donc pas surprenant que les cellules HGPS présentent des dérégulations de l'expression génique. Cette dernière dépend également des micro-ARN, des facteurs de transcription et de l'ARN polymérase dont les fonctions sont perturbées en présence de la progérine.

Les micro-ARN sont des régulateurs post-transcriptionnels capables d'inhiber l'expression d'un gène en se liant sur l'ARNm d'intérêt. L'expression du gène *LMNA* est régulée par des mi-ARN spécifiques. L'exemple le plus connu est celui du mi-ARN9 (miR-9) dont l'expression spécifique dans les cellules du système nerveux central (SNC) inhibe la synthèse de la progérine bloquant ainsi son effet toxique et expliquant l'absence de symptômes cliniques dans ce tissu (Jung et al., 2012; Nissan et al., 2012).

L'analyse du profil d'expression génique a permis de mettre en évidence des dérégulations transcriptionnelles dans les fibroblastes HGPS par rapport à des fibroblastes de sujets sains. Les protéines de la matrice extracellulaire (ECM pour « extracellular matrix ») ainsi que les facteurs de transcription (FT) sont les familles protéiques les plus différentiellement exprimées entre les fibroblastes sains et HGPS (Csoka et al., 2004a). Par ailleurs, l'expression de la progérine est à l'origine d'une séquestration des facteurs de transcription dans les cellules HGPS. En effet, la technique du double hybride a permis l'identification de 225 interactions progérine-FT contre seulement 61 interactions lamine A-FT. Cela confirme ainsi que l'affinité des FT avec la progérine est plus importante qu'avec la lamine A et par conséquent, les cellules qui expriment la progérine séquestrent les FT au niveau de l'enveloppe nucléaire (Csoka et al., 2004b).

De plus, les lamines A interagissent avec les acteurs de la machinerie de transcription de l'ARN polymérase II (pol II) tels que l'actine et la myosine nucléaires, les complexes de remodelage de la chromatine ainsi que les ribonucléoprotéides. L'expression de la lamine A Δ 50 a donc des effets négatifs sur la pol II (Prokocimer et al., 2013). Enfin, les changements de distribution des NPC à la surface nucléaire des cellules HGPS (cf. partie 1.2.5 B. « Altération de la structure nucléaire et de la résistance aux contraintes mécaniques ») sont responsables d'un défaut de trafic nucléocytoplasmique des protéines et de l'ARN.

Dans leur ensemble, les changements d'expression génique modifient la synthèse protéique et conduisent en partie à l'altération de certaines voies de signalisation dans les

cellules HGPS. NF- κ B est un facteur de transcription impliqué dans la réponse immunitaire et dans la réponse au stress cellulaire capable d'exercer un rétrocontrôle négatif sur l'apoptose. Dans deux modèles murins HGPS, les souris *Lmna*^{G609G/G609G} et *Zmpste24*^{-/-}, la réponse NF- κ B est hyperactivée (Osorio et al., 2012). L'inhibition pharmacologique de NF- κ B via le salicylate de sodium prolongent la longévité de ces souris (Osorio et al., 2012).

Une dérégulation de la voie Wnt/ β -caténine a également été mise évidence dans un modèle HGPS. La diminution de signalisation Wnt/ β -caténine chez des souris *Lmna*^{A9/A9} s'accompagne d'un défaut d'expression des protéines de la matrice extracellulaire pouvant contribuer aux anomalies osseuses et cartilagineuses des patients (Hernandez et al., 2010). Par ailleurs, la voie Wnt/ β -caténine étant suractivée dans les cellules cancéreuses, l'atténuation de son activation dans les cellules HGPS pourrait contribuer à la faible incidence des cancers chez les patients HGPS contrairement au vieillissement physiologique (Prokocimer et al., 2013).

Les lamines-A sont capables de s'associer avec SKIP, le co-activateur de Notch afin de réguler l'activité transcriptionnelle de Notch. L'expression de la lamine A Δ 50, qui possède une affinité réduite pour SKIP, conduit à l'augmentation de sa disponibilité et par conséquent, de l'activation de Notch dans les cellules HGPS (Scaffidi and Misteli, 2006). La surexpression de Notch et de ses effecteurs modifie les voies de différenciation des cellules souches mésenchymateuses illustrant le phénotype sévère chez les patients au niveau des tissus dérivés du mésoderme tels que les tissus adipeux et osseux ainsi que les cellules musculaires lisses.

La protéine du rétinoblastome (pRb pour « retinoblastoma protein ») est impliquée dans le cycle cellulaire et la prolifération cellulaire en s'associant aux lamines-A et LAP2 α pour réguler différents facteurs de transcription. Cette interaction est fortement altérée en présence de la lamine A Δ 50 conduisant à une dérégulation de la signalisation pRb-LamineA/LAP2 α observée dans des fibroblastes de patients HGPS (Marji et al., 2010).

Enfin, les cellules HGPS présentent une hyperactivation de la voie ERK et par conséquent, de l'hyperactivation d'une protéine intervenant dans la voie MAPK, la protéine p38 (Aliper et al., 2015). La signalisation p53 est également perturbée dans les cellules exprimant la progérine. Ce FT joue un rôle dans le contrôle du cycle cellulaire, l'autophagie ainsi que l'apoptose et est suractivée à la suite du dysfonctionnement des

télomères des cellules HGPS (cf. partie 1.2.5 F. « Raccourcissement des télomères ») (Benson et al., 2010).

Ces études démontrent que l'expression de la progérine conduit à l'altération de grandes voies de signalisation, bien que d'autres voies soient également impactées. Certaines d'entre elles seront décrites ultérieurement selon le mécanisme physiopathologique impliqué.

E. Dommages à l'ADN et instabilité génomique

Les cellules HGPS présentent une accumulation des dommages à l'ADN qui augmentent, *in vitro*, avec les passages et s'expliquent par une accumulation de ROS ainsi que par des défauts de réponse aux dommages à l'ADN. Les cassures double-brin de l'ADN sont plus fréquemment observées dans les cellules qui expriment la progérine puisque les deux voies de réparations majeures de ces cassures sont diminuées dans les cellules HGPS.

Dès l'apparition de CDB, l'histone H2Ax est rapidement phosphorylé au niveau de la serine 139 pour former l'histone γ H2AX (Rogakou et al., 1999). L'augmentation de foci γ H2AX a été mise en évidence dans différents modèles HGPS confirmant l'accumulation des CDB (Liu et al., 2008). Plusieurs acteurs de la réparation des CDB ont été décrits dans la progéria. Tout d'abord, des fibroblastes HGPS ont permis de mettre en évidence un défaut de recrutement des facteurs 53BP1, Rad50 ainsi que RAD51 aux sites de dommages (Liu et al., 2005). Dans ce même modèle, les niveaux de DNAPK, Ku70 et Ku80, composants de l'holoenzyme DNAPK, sont diminués (Liu et al., 2011). Par ailleurs, l'expression de la lamine A Δ 50 altère l'activité de NuRD (cf. partie 1.2.5 « Désorganisation de la chromatine et changements épigénétiques ») perturbant son rôle dans la réponse aux dommages notamment en assurant le recrutement des protéines de réparation de l'ADN (Lai and Wade, 2011). De plus, un défaut de signalisation ATM-KAP-1 a été décrit dans le modèle murin HGPS *Zmpste24^{-/-}* qui participerait à un défaut de recrutement des protéines de réparation au niveau des lésions de l'hétérochromatine (Liu et al., 2013b). La réplication du brin d'ADN à réparer est aussi altérée dans les cellules HGPS à la suite d'une interaction aberrante de la progérine avec le facteur de processivité de l'ADN polymérase (Musich and Zou, 2009). L'accumulation des dommages à l'ADN double-brin, médiée par l'expression de la progérine, s'explique donc par une altération de recrutement des protéines de réparation des dommages mais elle peut également s'expliquer par un défaut

de détection des dommages. En effet, un retard de localisation de phospho-NBS1 et MRE11 a été décrit dans des cellules HGPS humaines (Constantinescu et al., 2010). Sachant que ces 2 facteurs de réparation du complexe MRN sont nécessaires à la détection des dommages à l'ADN, leur recrutement anormalement lent explique l'augmentation des cassures de l'ADN observées dans les cellules HGPS. Enfin, la réparation par excision de nucléotide est aussi altérée dans les cellules exprimant la progérine. L'accumulation aberrante de foci xeroderma pigmentosum de groupe A (XPA) a été observée dans des cellules HGPS et dans le modèle murin *Zmpste24^{-/-}* (Liu et al., 2008). Dans l'ensemble, ces défauts de réparation des dommages à l'ADN conduisent à l'accumulation des dommages et participent à l'instabilité génomique. La poly(ADP-ribosylation) (PARylation), un mécanisme de réparation des dommages à l'ADN, a également fait l'objet d'une étude dans la progéria de Hutchinson-Gilford et sera détaillée par la suite (cf. partie 1.3 A. « Perte des VSMCs vasculaires »).

Parmi les autres facteurs à l'origine de l'instabilité génomique des cellules HGPS figure l'accumulation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) causée par des dysfonctions mitochondriales (cf. partie 1.2.5 F. « Dysfonction mitochondriale »). Les fibroblastes de patients HGPS présentent une plus grande sensibilité au stress oxydatif notamment à la suite d'une diminution de l'expression des protéines mitochondriales participant à la phosphorylation oxydative (Rivera-Torres et al., 2013). L'altération de la voie NRF2-ARE qui est l'un des principaux régulateurs de la transcription des gènes antioxydants, contribue également à l'augmentation des ROS dans les cellules HGPS. La progérine étant capable de se lier à NRF2, cela entraîne sa délocalisation et empêche la formation du complexe NRF2-ARE conduisant à une répression des gènes antioxydants. L'accumulation de ROS dans les cellules HGPS est d'autant plus importante que le passage est élevé (Kubben et al., 2016a) (**Figure 16**).

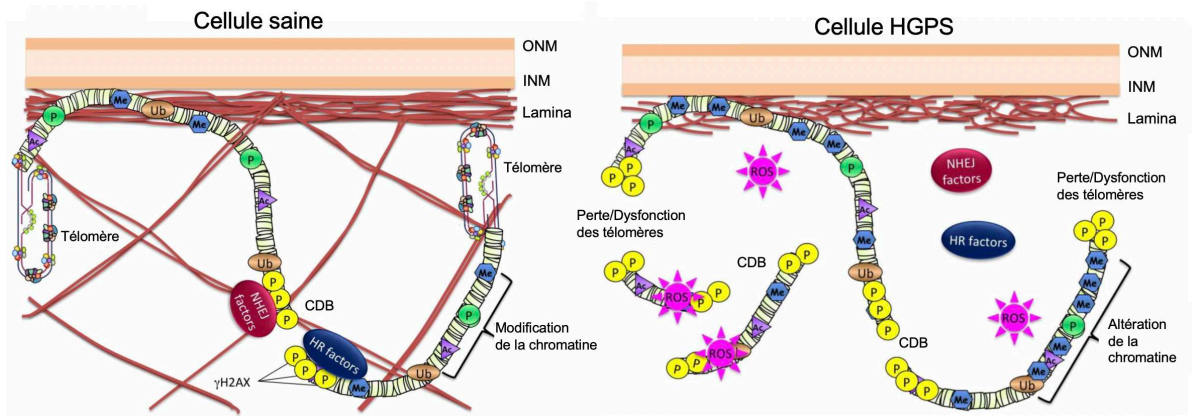


Figure 16 : *Instabilité génomique des cellules HGPS*

Les cellules HGPS souffrent d'un raccourcissement des télomères ainsi qu'un défaut des recrutements des facteurs de réparation des dommages à l'ADN conduisant à des altérations de la chromatine ainsi qu'à l'accumulation des dommages à l'ADN.

ONM : outer nuclear membrane ; INM : inner nuclear membrane ; ROS : reactive oxygen species ; CDB : cassure double-brin ; Ac : acetylation ; Me : méthylation ; Ub : ubiquitinylation ; P : γ H2AX ; HR : homologous repair ; NHEJ : non-homologous end joining.

Adaptée de (Gonzalo and Kreienkamp, 2015).

F. Dysfonction mitochondriale

Les mitochondries sont impliquées dans la physiopathologie de la progéria notamment en produisant une quantité anormalement importante de ROS dans les cellules HGPS (cf. partie 1.2.5 E. « Dommages à l'ADN et instabilité génomique »). Les ROS sont des molécules oxydantes générées par la chaîne de transport des électrons au sein de la chaîne respiratoire qui produit également de l'adénosine triphosphate (ATP) par phosphorylation oxydative (OXPHOS pour « Oxydative Phosphorylation »). Les ROS ne sont pas des déchets cellulaires puisqu'ils participent à la signalisation cellulaire. L'accumulation de ROS est cependant toxique puisqu'elle est à l'origine du stress oxydant qui se traduit par des cassures de l'ADN, par l'oxydation des protéines ou encore par la peroxydation des lipides conduisant à un arrêt de la prolifération cellulaire.

Dans des fibroblastes HGPS, l'activité OXPHOS est diminuée par rapport à des fibroblastes sains à la suite d'une diminution de l'expression de certains acteurs de la chaîne respiratoire tels que le cytochrome C, COX1 et l'ATPase β du complexe. Ces dérégulations conduisent à une diminution de la production d'ATP (Rivera-Torres et al., 2013). Dans cette même étude, l'analyse de muscles striés issus de 2 modèles murin HGPS, *Lmna*^{G609G/+} et *Zmpste24*^{-/-} a permis de mettre en évidence un effet dose-dépendant et temps-dépendant de la progérine sur l'activité OXPHOS. Enfin, les altérations

mitochondriales n'ont pas été observées dans le SNC où il n'y a pas d'expression de la progérine. Dans l'ensemble, ces études confirment une corrélation entre la progérine et la dysfonction mitochondriale.

G. Sénescence et SASP

La sénescence cellulaire se définit par un arrêt de la prolifération après un nombre précis de divisions en culture (Hayflick, 1965). On parle alors de sénescence répllicative par opposition à la sénescence post-mitotique dans le cas d'un arrêt irréversible de la mitose ou d'une exposition prolongée à différents stress. Contrairement à la quiescence dont l'arrêt du cycle cellulaire est réversible, la sénescence, qu'elle soit répllicative ou post-mitotique, conduit à un arrêt irréversible du cycle cellulaire en tant que suppresseur de tumeurs. L'entrée en sénescence dépend des protéines p53 et pRb. En effet, à la suite d'un stress génotoxique, une activation de la voie ATM/ATR va permettre l'inhibition des cyclines dépendantes des kinases (CDK1 et CDK2) entraînant un arrêt transitoire du cycle cellulaire. En parallèle, ATM via p53 induit une augmentation de p21, permettant l'inhibition de CDK1. Cela tend à bloquer la réplication et la mitose par l'inactivation de pRb assurant l'irréversibilité de l'arrêt (Shay et al., 1991).

Dans des fibroblastes HGPS, une étude a rapporté une diminution de l'expression de l'isoforme $\Delta 133p53$ et une augmentation de l'isoforme $p53\beta$ participant à une dérégulation via p53 de la sénescence de ces cellules. La restauration de $\Delta 133p53$ est suffisante pour augmenter le nombre de prolifération et retarder la sénescence bien que l'expression de la progérine soit persistante (von Muhlinen et al., 2018). La sénescence accélérée dans les cellules HGPS peut également s'expliquer par d'autres facteurs tels que le stress oxydatif induit par une dysfonction mitochondriale, le raccourcissement des télomères ainsi que l'instabilité génomique, conférant à la sénescence un rôle central dans le vieillissement prématuré de la progéria (Barascu et al., 2012).

En effet, lorsque les cellules sénescents s'accumulent, elles exercent un effet délétère sur leur microenvironnement via la sécrétion de cytokines inflammatoires formant le SASP (phénotype sécrétoire associé à la sénescence). Parmi elles figurent les interleukines (IL) IL-6 et IL-8 qui sont toutes deux augmentées dans des fibroblastes HGPS (von Muhlinen et al., 2018). L'augmentation de différentes autres cytokines inflammatoires du SASP a également été observée dans des cellules endothéliales HGPS

(Mojiri et al., 2021). Le caractère pro-inflammatoire du SAPS contribue à un état inflammatoire chronique également nommé « inflamm'aging » de par son rôle majeur dans le déclin des fonctions physiologiques qui s'opère au cours du vieillissement. La sécrétion accrue des cytokines du SAPS dans la progéria contribue ainsi au vieillissement accéléré (*Figure 17*).

H. Raccourcissement des télomères

Le raccourcissement des télomères est un phénomène observé à la fois dans des fibroblastes vieillissants qui expriment la lamine A et dans des fibroblastes qui expriment la lamine A Δ 50. Ce phénomène, associé à une altération de l'intégrité des télomères, est à l'origine de la sénescence réplivative qui participe au vieillissement physiologique (Gonzalo and Kreienkamp, 2015). Dans le cas du vieillissement accéléré de la HGPS, l'expression de la progérine est associée à une accélération du raccourcissement des télomères ainsi que des anomalies de structures telles que des doublets de télomères ou la perte de télomères sœurs (Decker et al., 2009). Une augmentation des cassures de l'ADN a également été décrite dans les régions télomériques de cellules (Benson et al., 2010; Gonzalo and Kreienkamp, 2015). Les mécanismes moléculaires par lesquels l'expression de la progérine conduit au dysfonctionnement des télomères n'ont pas été clairement établis. Cependant, certaines études permettent d'illustrer leur corrélation. En effet, l'expression ectopique de la progérine dans des fibroblastes sains engendre une activation des voies de dommages à l'ADN qui est spécifique aux télomères. Cela conduit à l'agrégation des télomères et par conséquent, à leur dysfonction (Benson et al., 2010). De façon synergique, des dommages à l'ADN télomériques au sein des fibroblastes sains entraînent une production de progérine favorisant le dysfonctionnement des télomères mettant ainsi en place un cercle vicieux. Le raccourcissement des télomères pendant la sénescence cellulaire induit l'expression de la progérine alors que l'expression de la progérine entraîne le raccourcissement des télomères (Cao et al., 2011a). Par ailleurs, la sénescence réplivative induite par la progérine est atténuée par l'expression d'une sous-unité catalytique de la télomérase et par l'inactivation parallèle de p53 (Kudlow et al., 2008). De même, les cellules souches embryonnaires (ESC pour « embryonic stem cells »), dont l'expression de la télomérase est élevée, ne présentent pas de phénotypes induits par la progérine ce qui confirme le rôle de la progérine dans l'intégrité télomérique (Chojnowski et al., 2015a). Dans cette même étude, le rôle de LAP2 α dans la stabilisation

de la structure des télomères a été suggéré. Plus précisément, LAP2 α augmente la marque H3K27me3 et prévient les dommages à l'ADN associés à la progérine ainsi que la sénescence prématurée (Chojnowski et al., 2015b). Dans des fibroblastes HGPS, il a également été montré que la réplication est plus précoce au niveau des télomères que dans des fibroblastes contrôles à la suite d'une désorganisation 3D du génome (Kychygina et al., 2021). L'ensemble de ces études témoigne du lien toxique entre les télomères et la progérine contribuant au déclin des cellules HGPS et au vieillissement prématuré.

I. Épuisement des cellules souches adultes

Les cellules souches adultes assurent un renouvellement constant des cellules dysfonctionnelles ou sénescents dans la plupart des tissus adultes. Le nombre de cellules souches adultes ainsi que leur capacité de régénération diminuent avec l'âge constituant un facteur majeur du vieillissement physiologique (Brassard et al., 2016). Sachant que la lamine A n'est pas exprimée dans les cellules souches embryonnaire (ESC), la progérine n'est pas non plus exprimée dans des ESC HGPS. Cependant, une faible expression de progérine est observée *in vivo* dans les cellules souches mésenchymateuses (MSC). Ces dernières accumulent des quantités significatives de progérine au cours de passages *in vitro* conduisant à leur épuisement (Wenzel et al., 2012). De façon cohérente, les MSC sont les cellules souches adultes à l'origine de la formation de plusieurs tissus qui présentent tous de sévères symptômes cliniques tels que les os, la peau, le tissu adipeux, etc. Dans un modèle murin de progéria, *Zmpste24*^{-/-}, la perte des cellules souches épidermiques a été observée et s'est accompagnée d'une diminution de la capacité proliférative (Espada et al., 2008; Rosengardten et al., 2011). L'altération de l'auto-renouvellement et de la différenciation des cellules souches adultes induites par l'expression de la progérine contribue donc au vieillissement accéléré dans la progéria.

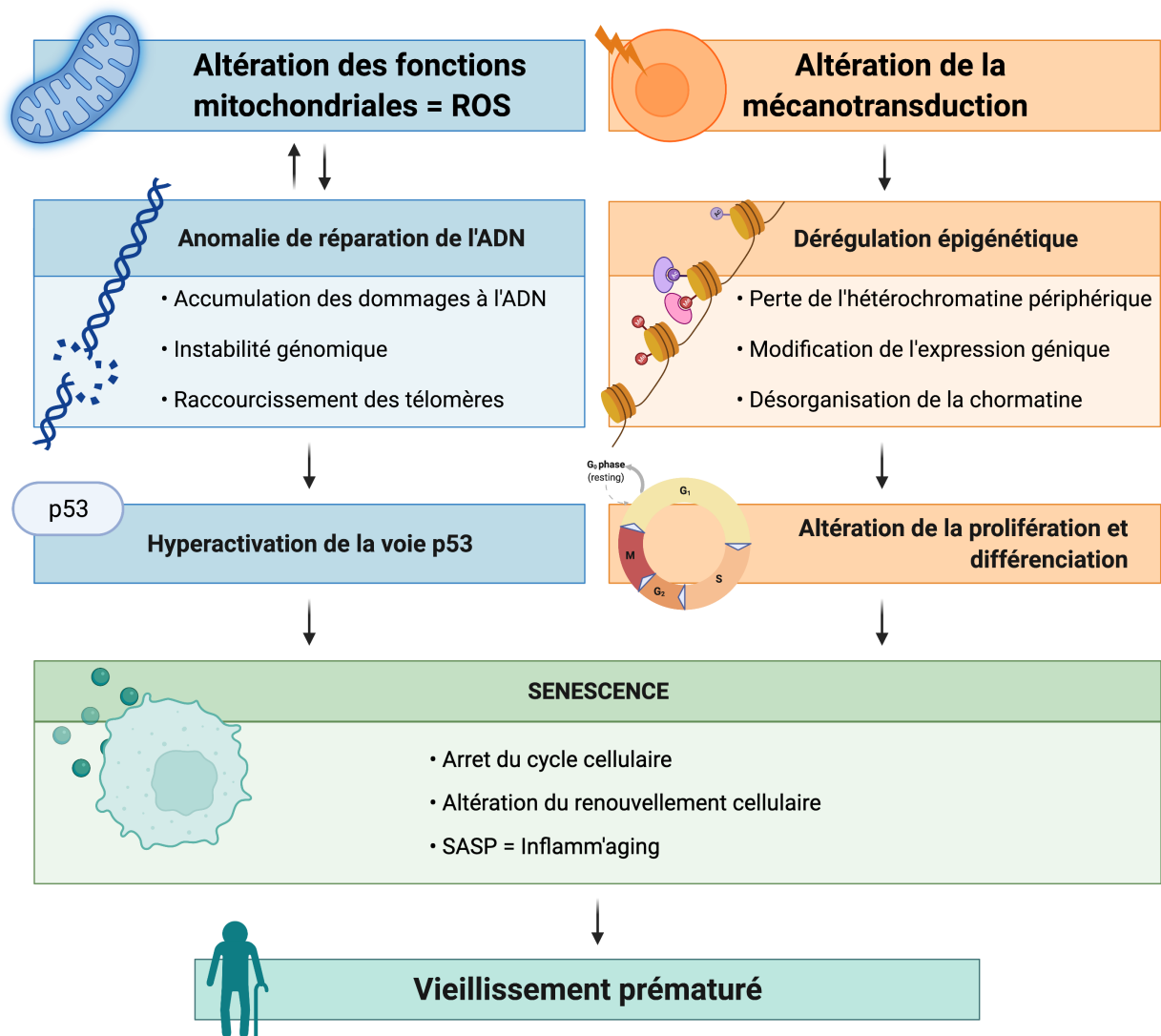


Figure 17 : Mécanismes moléculaires à l'origine de la sénescence des cellules HGPS
 Schéma récapitulatif des différents mécanismes décrits dans la progéria conduisant à la sénescence prématurée.
 ROS : Reactive oxygen species ; SASP : Senescence-associated secretory phenotype.
 Réalisée avec Biorender.

1.2.6. Modèles d'étude

De nombreux modèles cellulaires et animaux ont été développés pour comprendre les mécanismes moléculaires de la physiopathologie HGPS. Ils diffèrent par leur génotype ainsi que par leur phénotype associé et seront détaillés au travers de 2 grandes catégories de modèles : (A) *In vitro* ; (B) *In vivo*.

A. *In vitro*

Les fibroblastes isolés à partir de biopsies de peau de patients HGPS ont été le principal modèle disponible pour l'étude de la progéria (Goldman et al., 2004; Scaffidi and Misteli, 2006; Shumaker et al., 2006; Constantinescu et al., 2010). Bien que ce modèle exprimant la progérine soit facile d'accès et d'utilisation dans l'étude des phénotypes pathologiques, leur faible capacité proliférative ainsi que leur manque de transposabilité à tous les types de cellules ont amené les chercheurs à développer de nouveaux modèles *in vitro*. Les découvertes sur la reprogrammation des cellules somatiques en cellules souches pluripotentes (iPS) ont permis la création de nouveaux modèles tissu-spécifiques en quantité illimitée (Takahashi and Yamanaka, 2006). En effet, les iPS ont la capacité de s'auto-renouveler et de se différencier en n'importe quel type cellulaire. Le premier modèle d'iPS généré à partir de fibroblastes de patients HGPS a été publié en 2011 (Liu et al., 2011; Zhang et al., 2011). Tout comme les cellules souches embryonnaires, il a été montré que les iPS-HGPS n'exprimaient ni la lamine-A, ni la progérine. Ces 2 protéines sont réexprimées lors de la différenciation en certains types cellulaires. En effet, la progérine est fortement exprimée dans les MSCs et dans les cellules musculaires lisses vasculaires (VSMC) tandis qu'elle est absente dans les cellules neuronales. De plus, les cellules différenciées à partir d'iPS-HGPS présentent certaines caractéristiques pathologiques telles qu'une déstructuration de l'enveloppe nucléaire, un raccourcissement des télomères ainsi qu'une sénescence prématurée (Lo Cicero and Nissan, 2015). Les progrès dans le domaine de l'ingénierie tissulaire ont permis le développement d'un modèle 3D de VSMCs dérivées d'iPS-HGPS reproduisant un vaisseau sanguin à l'échelle d'une artériole (Atchison et al., 2017). Cette culture 3D présente des mécanismes moléculaires similaires à ceux observés dans la pathologie vasculaire de la progéria tels qu'une calcification ainsi que des altérations de la paroi vasculaire. Les études sur des modèles *in vitro* ne peuvent cependant livrer que des informations limitées. Par conséquent, des modèles animaux appropriés sont également nécessaires.

B. *In vivo*

Plusieurs modèles animaux ont été développés et diffèrent tant par leur génotype que par leurs phénotypes associés mais ont tous en commun une morphologie nucléaire anormale ainsi qu'une diminution de leur longévité. En 2002, les souris *Zmpste24^{-/-}* ont été le premier modèle *in vivo* de la progéria. Ce modèle possède de nombreux phénotypes

communs aux patients HGPS tels qu'un retard de croissance, une lipodystrophie, une cardiomyopathie ainsi qu'une mort prématurée à environ 20 semaines (Bergo et al., 2002; Pendás et al., 2002). L'inconvénient de ce modèle est qu'il n'exprime pas la progérine mais uniquement une lamine A farnésylée de façon constitutive, engendrée par le knock-out (KO) de l'enzyme *Zmpste24* qui ne peut donc cliver le groupement farnésyl lors de la dernière étape de maturation de la lamine A. Ainsi, les modèles murins développés par la suite expriment la progérine de façon ubiquitaire ou tissu-spécifique. Parmi eux, le modèle généré par knock-in (KI) portant la mutation c.1827C>T (p.G609G) est équivalente à la mutation retrouvée chez les patients HGPS c.1824C>T (p.G608G) (Osorio et al., 2011). Ce modèle *Lmna*^{G609G/G609G} exprime la progérine en raison de l'épissage anormal de l'ARNm transcrit à partir du gène *Lmna* muté et récapitule la plupart des caractéristiques observées chez les patients. Les souris présentent en effet un retard de croissance, une diminution du poids, une lipodystrophie, une alopecie, une perte des VSMC, des troubles osseux ainsi qu'une longévité réduite à 14 semaines environ. Les souris *Lmna*^{G609G/+} ont un phénotype atténué par rapport aux *Lmna*^{G609G/G609G}. Bien que ce modèle exprime la progérine et phénocopie les symptômes observés chez les patients HGPS, une différence de mécanisme physiopathologique persiste. En effet, les souris *Lmna*^{G609G/G609G} n'ont pas d'athérosclérose. Pour pallier cette divergence, un modèle de souris déficientes en apolipoprotéines E (*Apoe*^{-/-}) a été croisé avec le modèle *Lmna*^{G609G/G609G} pour former un modèle de souris progéria prédisposé à l'athérosclérose (Hamczyk et al., 2018). Les souris *Apoe*^{-/-} *Lmna*^{G609G/G609G} expriment la progérine de façon ubiquitaire et récapitule les manifestations cliniques des souris *Lmna*^{G609G/G609G} avec de l'athérosclérose ainsi qu'un raccourcissement de la longévité à environ 18 semaines. Différents modèles ont ensuite été générés pour une expression de progérine tissu-spécifique. On retrouve notamment le modèle *Lmna*^{LCS/LCS}*SM22αCre* qui correspond au croisement de souris transgéniques *SM22αCre* (dont l'activité Cre est VSMC/cardiomyocytes-spécifiques) avec des souris *Lmna*^{LCS/LCS} (portant la mutation 1827C>T dans le gène *Lmna*). Ce modèle exprime la progérine principalement dans les VSMCs et les cardiomyocytes conduisant à une atteinte du système cardiovasculaire (Del Campo et al., 2019). Similairement, le modèle *Apoe*^{-/-} *Lmna*^{LCS/LCS}*SM22αCre* présente des atteintes cardiovasculaires ainsi qu'une athérosclérose conduisant à la mort prématurée des souris à 70 semaines environ (Hamczyk et al., 2018). D'autres modèles existent pour l'expression spécifique de la progérine dans les cellules endothéliales tels que le modèle

Prog-Tg et sont décrits dans la revue (Benedicto et al., 2021). Enfin, pour réduire l'écart entre les modèles animaux essentiellement murins et l'Homme, deux nouveaux modèles ont été développés. Premièrement, un modèle de mini-porc a été généré par KI (Dorado et al., 2019). Ces mini-porcs portent la mutation hétérozygote *Lmna* c1824C>T, expriment la progérine de façon ubiquitaire et récapitulent les principaux symptômes des patients HGPS avec notamment des atteintes du système cardiovasculaires. Sachant que le système cardiovasculaire des porcs est fortement similaire à celui des Hommes, le mini-porc est un modèle très pertinent pour la transposabilité des mécanismes décrits. Deuxièmement, un modèle primate porteur de la mutation *Lmna* 1824 C>T (G608G) a été généré via un éditeur de base fusionné aux ciseaux moléculaires CRISPR-Cas9 (pour « Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats ») (Wang et al., 2020). L'éditeur de base permet la conversion du C en T en délivrant un ARNm et un ARN guide ciblant la position 1824 du gène *Lmna* via un virus adéno-associé (AAV pour « Adeno-Associated Virus »). Les singes *Lmna* c.1824 C>T expriment la progérine et miment les altérations cliniques des patients HGPS.

Pour conclure, différents modèles de la progéria existent et présentent plus ou moins de mécanismes communs à ceux retrouvés chez les patients HGPS ([Table 3](#)). En tenant compte des limites de chacun de ces modèles, leur utilisation a permis de comprendre les mécanismes physiopathologiques qui conduisent à l'apparition du phénotype clinique. Ces modèles ont également permis d'identifier des traitements et sont encore utilisés afin d'identifier de nouvelles perspectives thérapeutiques.

Espèce	Modèle	Expression de progérine	Phénotype
<i>Mus musculus</i>	<i>Zmpste24^{-/-}</i>	NON	Vieillessement accéléré
	<i>Lmna^{G609G}</i>	Ubiquitaire	Vieillessement accéléré
	<i>Apo^{-/-}Lmna^{G609G/G609G}</i>	Ubiquitaire	Vieillessement accéléré dont athérosclérose
	<i>Lmna^{LCS/LCS}SMA22aCre</i>	vSMC et Cardiomyocytes	Troubles cardiovasculaires
	<i>Apo^{-/-}Lmna^{LCS/LCS}SMA22aCre</i>	vSMC et Cardiomyocytes	Troubles cardiovasculaires dont athérosclérose
	<i>Lmna^{LCS/LCS}Tie2Cre</i>	Cellules endothéliales et leucocytes	Troubles cardiovasculaires
	<i>Prog-Tg</i>	Cellules endothéliales	Fibrose et dysfonction cardiaque
<i>Sus scrofa</i>	<i>Lmna c.1824C>T Yucatan minipig</i>	Ubiquitaire	Vieillessement accéléré
<i>Macaca fascicularis</i>	<i>Lmna c.1824C>T Cynomolgus monkey</i>	Ubiquitaire	Vieillessement accéléré
<i>Homo sapiens</i>	<i>Lmna c.1824C>T Fibroblastes</i>	OUI	Sénescence prématurée
	<i>Lmna c.1824C>T iPS</i>	NON	Différent selon la reprogrammation

Table 3 : Principaux modèles d'étude de la progéria

Ce tableau résume les principaux modèles d'étude de la progéria *in vivo* (bleu) et *in vitro* (orange) en fonction de l'espèce. L'expression de la progérine ainsi que le phénotype associé sont également mentionnés.

Adaptée de (Benedicto et al., 2021) et réalisée avec Biorender.

1.2.7. Traitements et perspectives thérapeutiques

Bien que les études sur la progéria de Hutchinson-Gilford suscitent un vif intérêt depuis la publication de la mutation en 2003, il n'existe actuellement aucun traitement curatif. Cependant, de nombreuses thérapies potentielles ont émergé dont les mécanismes se basent sur : (A) l'inhibition de l'expression de la progérine ; (B) l'inhibition de la prénylation de la progérine ; (C) l'augmentation de l'élimination de la progérine ; (D) la diminution des effets toxiques de la progérine (Guilbert et al., 2020). Les biomarqueurs couramment évalués pour l'efficacité du traitement sont la longévité, le poids, la fonction cardiovasculaire, l'expression de la progérine ainsi que les anomalies nucléaires.

A. Inhiber l'expression de la progérine

Dans le but d'inhiber l'expression de la progérine, trois mécanismes sont possibles. Tout d'abord, la mutation du gène *LMNA* peut être corrigée via l'utilisation de l'édition génomique CRISPR-Cas9. L'injection d'une unique dose de CRISPR-Cas9 prolonge la durée de vie des souris *Lmna*^{G609G/G609G} (Beyret et al., 2019; Santiago-Fernández et al., 2019). Sachant que cette technologie peut induire des mutations hors cible, les éditeurs de bases d'adénine (ABE) ont été mis au point et sont dérivés de la technologie CRISPR-Cas9 (Koblan et al., 2021). Dans des fibroblastes de patients HGPS, l'ABE est capable de reverser la mutation *LMNA* c.1824 C>T dans 90% des cas. De plus, le traitement de souris *Lmna*^{G609G/G609G} à l'ABE augmente significativement la longévité puisqu'elle passe de 30 jours pour les souris non injectées à 72 jours avec le traitement ABE. À ce stade, cette stratégie nécessite une optimisation car parmi les souris traitées aux ABE, quelques-unes ont développé des tumeurs du foie.

L'expression de la progérine peut également être inhibée en modulant l'épissage alternatif du pré-ARNm *LMNA* à l'aide d'oligonucléotides anti-sens (AONs) (Blondel et al., 2016). Le traitement de souris *Lmna*^{G609G/G609G} avec des AONs a réduit la synthèse d'ARNm et par conséquent, de progérine ce qui permet d'améliorer la longévité. Dans des cellules de patients HGPS, les AONs ont également permis d'améliorer les phénotypes cellulaires caractéristiques de la pathologie (Osorio et al., 2011). La metformine ainsi que le MG132 ont également été décrits comme modulant l'épissage alternatif du pré-ARNm *LMNA* via SRSF (pour « for serine/arginine-rich splicing factor ») (Egesipe et al., 2016; Harhour et al., 2017). Sachant que SRSF est une protéine de liaison au pré-ARNm *LMNA*, capable de moduler l'expression des lamines-A, son inhibition dans des cellules HGPS réduit l'expression de la lamine A et de la progérine améliorant ainsi la morphologie nucléaire.

Enfin, les dernières molécules connues pour diminuer l'expression de la progérine sont des modificateurs de la transcription. L'acide rétinoïque et la vitamine A répriment l'expression des lamines-A et de la progérine en se liant aux récepteurs de réponse de l'acide rétinoïque l'empêchant de se fixer sur le promoteur *LMNA* (Kubben et al., 2016b; Lo Cicero et al., 2016a) (**Figure 18**).

B. Inhiber la prénylation de la progérine

La toxicité de la progérine étant en partie induite par le groupement farnésyl, plusieurs molécules existent afin d'inhiber la prénylation de la progérine.

Parmi les molécules qui ciblent la farnésylation de la prélamine A, on retrouve le lonafarnib, un inhibiteur des farnésyltransférases (FTI pour « farnesyl transferase inhibitor »). Des études *in vitro* à partir de fibroblastes de patients HGPS traités au lonafarnib ont montré des améliorations de la morphologie nucléaire et des altérations associées (Capell et al., 2005). Le lonafarnib a également fait l'objet d'essais cliniques (Gordon et al., 2012). Les patients HGPS ayant ingéré du lonafarnib 3 fois par jour pendant 30 jours ont eu une augmentation de la longévité d'environ 2.2 ans par rapport aux patients non traités (Gordon et al., 2018). Le lonafarnib est donc le premier traitement autorisé par la FDA pour réduire la mortalité dans la HGPS (Dhillon, 2021). Sachant que l'inhibition de la farnésyltransférase est incomplète à la dose maximale de lonafarnib tolérée, un autre essai clinique a permis d'évaluer l'association du lonafarnib avec de la pravastatine et du zoledronate, deux statines inhibitrices des farnésylphosphatases. Cependant, les résultats ont confirmé que la monothérapie au lonafarnib est davantage bénéfique sur la densité minérale osseuse et que la plurithérapie n'apporte aucun bénéfice supplémentaire aux atteintes du système cardiovasculaire (Gordon et al., 2016). Par ailleurs, le criblage de molécules chimiques a permis d'identifier des doubles inhibiteurs pharmacologiques de farnésyltransférases et farnésylphosphatases, deux enzymes clés du processus de farnésylation. Les mono-aminopyrimidines (Mono-APs), améliorent *in vitro* la morphologie nucléaire des cellules HGPS (Blondel et al., 2016). Enfin, GGTI-2147 est un inhibiteur de géranylgeranyltransférase qui diminue la farnésylation, conduisant à l'atténuation des phénotypes du vieillissement accéléré des souris *Zmpste24*^{-/-} (Varela et al., 2008). Cependant, seul le lonafarnib est utilisé cliniquement comme traitement pour les patients progéria.

Une autre cible potentielle pour diminuer la prénylation de la progérine est l'enzyme ICMT. En effet, l'élimination de l'ICMT, via des petits ARNs en épingle à cheveux ciblant ICMT (shICMT pour « short hairpin ICMT ») été évaluée dans des cellules de patients HGPS et a montré des résultats bénéfiques sur la sénescence prématurée (Ibrahim et al., 2013) (**Figure 18**). De futures études précliniques sont nécessaires afin de confirmer ce potentiel traitement contre la progéria.

C. Augmenter l'élimination de la progérine

L'élimination de la progérine peut être augmentée de deux façons : en activant l'autophagie et/ou en inhibant le protéasome pour renforcer l'autophagie. L'autophagie est un mécanisme intracellulaire de recyclage d'organites ou de protéines endommagées sous le contrôle de la voie mTOR (Boutouja et al., 2019). Inhiber la voie mTOR via l'Everolimus, la Rapamycine ou le Temsirolimus dans des fibroblastes de patients HGPS ont induit une augmentation de la dégradation et par conséquent, une diminution des niveaux de progérine conduisant à une amélioration de la morphologie nucléaire ainsi qu'à un retard de la sénescence cellulaire (Cao et al., 2011b; Gabriel et al., 2016). Le neuropeptide Y (NPY) est également un activateur de l'autophagie. Une étude a permis de démontrer que le NPY augmente l'autophagie et la dégradation de la progérine dans des fibroblastes de patients HGPS conduisant à une amélioration des dimorphismes nucléaires et au retard de la sénescence cellulaire (Aveleira et al., 2020). De manière indirecte, l'autophagie peut être stimulée par inhibition du protéasome. Une étude a en effet démontré que le traitement de fibroblastes de patients au MG132 induit la dégradation de la progérine par autophagie, améliorant les phénotypes cellulaires du vieillissement accéléré. Cette observation est également valable lors de l'injection de MG132 dans les muscles squelettiques de souris *Lmna*^{G609G/G609G} (Harhour et al., 2017) ([Figure 18](#)).

D. Diminuer les effets toxiques de la progérine

De vastes stratégies de traitements ciblant les conséquences phénotypiques de l'expression de la progérine existent et ont toutes fait preuve d'amélioration *in vitro* et/ou *in vivo* des phénotypes associés au vieillissement accéléré.

Une de ces stratégies vise à diminuer le stress oxydatif. On y retrouve des activateurs de NRF2 (Kubben et al., 2016a) ; le suppresseur de ROS, N-Acétyl Cystéine (NAC) (Richards et al., 2011) ; des stabilisateurs de la fonction mitochondriale ; du bleu de méthylène (Heyn et al., 2013) et Y-27632 (Kang et al., 2017) ainsi qu'un activateur de SIRT1, le resvératrol (Liu et al., 2012). Cibler la réponse au stress du réticulum endoplasmique est également possible par le biais d'une molécule chaperonne, TUDCA (pour « tauroursodeoxycholic acid ») permet de limiter la perte des VSMCs dans le modèle murin *Apoe*^{-/-}*Lmna*^{LCS/LCS}*SM22αCre* (Hamczyk et al., 2019). La sénescence est également

une cible thérapeutique dans la progéria avec l'utilisation d'un sénolytique, la quercétine (Geng et al., 2019). De même, l'expression d'une sous-unité catalytique de la télomérase (hTERT ARNm) permet l'élongation des télomères pour diminuer la sénescence précoce (Kudlow et al., 2008). D'autres thérapies se concentrent sur les dommages à l'ADN. Parmi elles, il y a la chloroquine, un activateur de la signalisation ATM impliquée dans le recrutement des protéines de réparation des dommages à l'ADN (Qian et al., 2018). Le deuxième outil utilisé pour réduire les dommages à l'ADN dans la progéria correspond aux oligonucléotides anti-sens spécifiques des séquences télomériques (tASO). Dans un modèle murin HGPS, le traitement au tASO améliore significativement la longévité (Aguado et al., 2019). Certaines voies de signalisation peuvent également être les cibles thérapeutiques de certaines molécules telles que le sodium salicylate qui inactive la voie NF- κ B (Osorio et al., 2012), le baricitinib qui inhibe la voie JAK/STAT (Liu et al., 2019) ainsi que la $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamine qui restaure la signalisation du récepteur à la vitamine D et améliore les phénotypes HGPS (Kreienkamp et al., 2016). La dysmorphie nucléaire des cellules HGPS qui engendre divers défauts fonctionnels peut également être un axe thérapeutique. En effet, la remodeline, un inhibiteur de la N-acétyltransférase 10 (NAT10) perturbe le réseau de microtubules et permet de restaurer la forme nucléaire (Larrieu et al., 2014). Similairement, dans des fibroblastes HGPS, l'inhibition de l'interaction entre la progérine et les lamines-A, par le biais d'une molécule appelée JH4, permet de diminuer la dysmorphie nucléaire ainsi que la sénescence. L'administration de JH4 dans des souris *Lmna*^{G609G/G609G} augmente la longévité (Lee et al., 2016b). Enfin, le pyrophosphate inorganique (PPi) est utilisé comme molécule diminuant la calcification vasculaire. Le traitement PPI de souris *Lmna*^{G609G/+} inhibe la calcification aortique constituant ainsi un bon traitement dans la pathologie cardiovasculaire de la progéria (Villa-Bellosta et al., 2013a) (**Figure 18**). Bien que ces différentes molécules présentent toutes un potentiel thérapeutique, elles présentent néanmoins certaines limites dans leur utilisation ou leurs effets. Sachant que ces molécules ciblent les différents effets toxiques de la progérine, l'utilisation combinée de plusieurs thérapies semble davantage prometteuse pour le traitement des patients HGPS dont plusieurs mécanismes moléculaires participent à la physiopathologie.

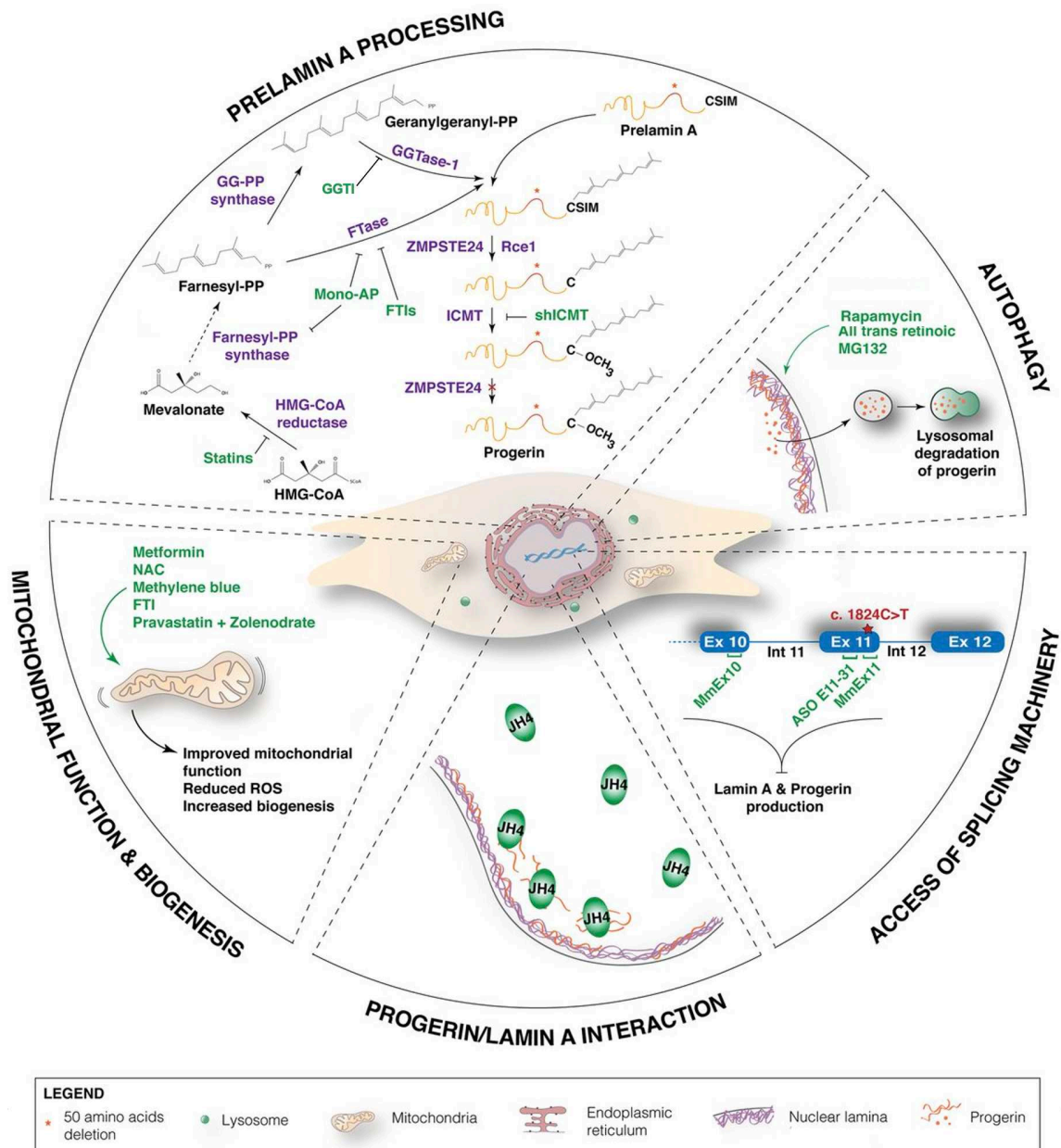


Figure 18 : Mécanismes ciblés par les potentielles stratégies de traitement pour la progéria
Ce schéma illustre les principaux mécanismes d'action des molécules étudiées sur les modèles *in vitro* et/ou *in vivo* dans la HGPS.

FTI : farnesyltransferase inhibitor ; ICMT : isoprenylcysteine carboxyl methyltransferase ; shICMT : short hairpin ICMT ; Mono-AP : mono-aminopyrimidine ; GGTI : geranylgeranyltransferase inhibitor ; ROS : reactive oxygen species ; NAC : N-acetyl cysteine ; Ex : Exon ; MmEx10 and MmEx11 : Morpholinos ; ASO E11-31 : antisense oligonucleotides.

Adaptée de (Strandgren et al., 2017).

Pour conclure, plusieurs études ont permis de mettre en évidence de nombreuses molécules capables d'atténuer les phénotypes associés au vieillissement accéléré voire d'allonger la longévité pour certains (**Table 4**). Bien que l'essai clinique du lonafarnib ait permis d'autoriser cette molécule comme traitement pour les patients HGPS, la longévité

supplémentaire de 2.5 ans pour les patients traités est insuffisante. De futures études sont donc nécessaires afin d'évaluer une méthode de traitement plus efficace. Récemment, un modèle murin HGPS *Lmna*^{HGPSrev/HGPSrev}, qui exprime la progérine mais pas la lamine A, a été conçu pour reverser l'expression de ces deux protéines. Cette réversion, même tardive permet d'empêcher le développement de pathologies cardiovasculaires et d'augmenter la longévité de ces souris (Sánchez-López et al., 2021). Le résultat de cette étude confirme qu'il n'est jamais trop tard pour soigner la HGPS et que l'administration d'un potentiel traitement à des stades avancés de la pathologie pourrait atténuer les phénotypes cliniques.

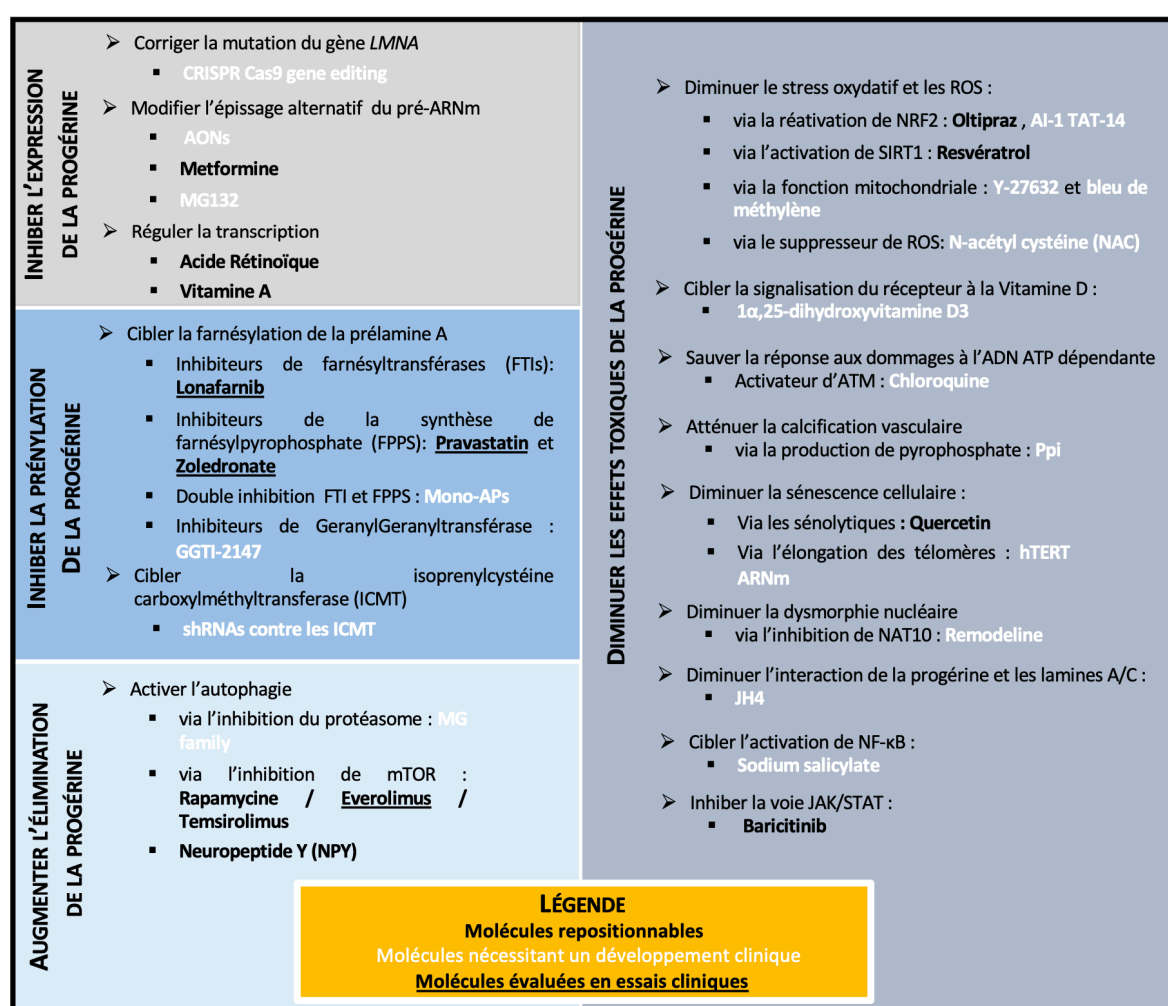


Table 4 : Résumé des molécules thérapeutiques étudiées dans la HGPS

Les stratégies thérapeutiques sont classées en fonction de leur cible d'action. Parmi elles, les molécules repositionnables sont indiquées en gras. Le repositionnement consiste à utiliser des médicaments pharmacologiques existants ou abandonnés pour de nouvelles indications afin de s'affranchir des essais cliniques. Les molécules nécessitant un développement clinique sont représentées en blanc tandis que celles ayant fait l'objet d'essais cliniques sont soulignées.

Adaptée de (Guilbert et al., 2020).

1.3. Système cardiovasculaire : physiopathologie de la paroi aortique et des VSMCs

1.3.1. Généralités

Le système cardiovasculaire assure la distribution de l'oxygène, des nutriments et ainsi que des hormones vers les différents organes et collecte en retour les déchets du métabolisme. Le cœur est le moteur de ce système tandis que les vaisseaux sont les voies de transport. L'ensemble forme un système clos, sous pression, permettant au sang de circuler. En effet, les contractions du cœur élèvent la pression du sang, aussi appelée pression artérielle, pour permettre sa propulsion. Sachant que le sang s'écoule toujours d'une région à haute pression vers une région à basse pression, l'appareil cardiovasculaire est segmenté en deux systèmes. Le système à haute pression comprend le cœur gauche, l'aorte ainsi que les artères systémiques et permet d'assurer un écoulement rapide du sang riche en oxygène vers les organes. En retour, le sang pauvre en oxygène circule dans le système basse pression qui contient les capillaires sanguins, les veines systémiques, et le cœur droit. Située proche du cœur, l'aorte est soumise à une forte pression. Par conséquent, ses propriétés élastiques sont indispensables dans le maintien de la régulation du débit sanguin ainsi que dans le maintien de la fonction cardiaque (Chaudhry et al., 2021). En effet, la rigidité de l'aorte peut évoluer vers de l'athérosclérose, de l'hypertension et *in fine*, vers une insuffisance cardiaque, confirmant son importance dans la physiopathologie vasculaire (Thijssen et al., 2016).

1.3.2. L'aorte

L'aorte est l'artère possédant la plus grosse conductance de l'organisme. Située près du cœur, son épaisse paroi riche en fibres élastiques lui permet de supporter les fluctuations de la pression artérielle lors de la propulsion du sang par le cœur. L'aorte se décompose en plusieurs segments. L'aorte ascendante naît par la racine aortique au

niveau du ventricule gauche, dont elle est séparée par la valve aortique. Par la suite, elle remonte dans l'abdomen, donnant à cette section le nom d'aorte ascendante, jusqu'à former une structure en épingle à cheveux appelée crosse aortique. Puis, l'aorte redescend dans l'abdomen en longeant le rachis lombaire, c'est alors l'aorte descendante. Enfin, elle se termine par sa bifurcation en deux artères plus petites appelées artères iliaques (*Figure 19*). Dans les modèles animaux, la marche quadrupède rend discutable l'utilisation des termes « aorte ascendante/descendante ». Ainsi, on parlera « d'aorte thoracique et/ou abdominale ». La paroi de l'aorte entourant la lumière est constituée de 3 tuniques : l'intima, la media et l'adventice (*Figure 19*).

L'intima ou tunique interne est principalement composée des cellules endothéliales dont l'architecture est conditionnée par les forces du flux sanguin appelées forces de cisaillement. Dans l'aorte ascendante et descendante, où le flux sanguin est laminaire, les cellules endothéliales sont orientées dans le sens du flux circulant tandis que dans la crosse aortique, où le flux est turbulent, les cellules endothéliales ne sont pas alignées mais restent cependant allongées. L'intima forme donc un endothélium recouvrant la lumière de l'aorte et repose sur une lame basale. L'intima crée ainsi une barrière entre le compartiment sanguin et la paroi vasculaire décrite comme hautement sélective. En effet, l'endothélium est métaboliquement actif de par sa capacité à générer divers facteurs impliqués dans la régulation de la vasomotricité, l'adhérence des cellules sanguines circulantes, la prolifération des VSMCs ainsi que dans l'inflammation (Park and Park, 2015).

La média, ou tunique moyenne, est séparée de l'intima par la limitante élastique interne. C'est la couche la plus épaisse de l'aorte mais elle est dépourvue de capillaires. La media est composée principalement de VSMCs, des cellules contractiles conférant à l'aorte une forte capacité de régulation de la pression artérielle. Par ailleurs, les VSMCs produisent la matrice extracellulaire (ECM) faisant donc des VSMCs une composante structurale majeure de l'aorte dont la structure et les fonctions seront détaillées ci-dessous (cf. partie 1.3.3 « Structure et fonctions des VSMCs »). Enfin, les VSMCs sont organisées en unités lamellaires, empilées sur plusieurs couches et bordées par la ECM. (Lacolley et al., 2012).

L'adventice, ou tunique externe, est séparée de la media par la limitante élastique externe. Elle contient principalement un réseau de tissu conjonctif contenant des fibres de

collagène qui protègent et maintiennent structurellement l'aorte. Cette couche contient également des terminaisons nerveuses et différents types cellulaires tels que des fibroblastes et/ou des cellules immunitaires. Cette couche est vascularisée par le *vasa vasorum* qui signifie en latin « vaisseaux des vaisseaux ». En réponse à une lésion vasculaire, les cellules de l'adventice sont rapidement activées afin de répondre au stress (Stenmark et al., 2013).

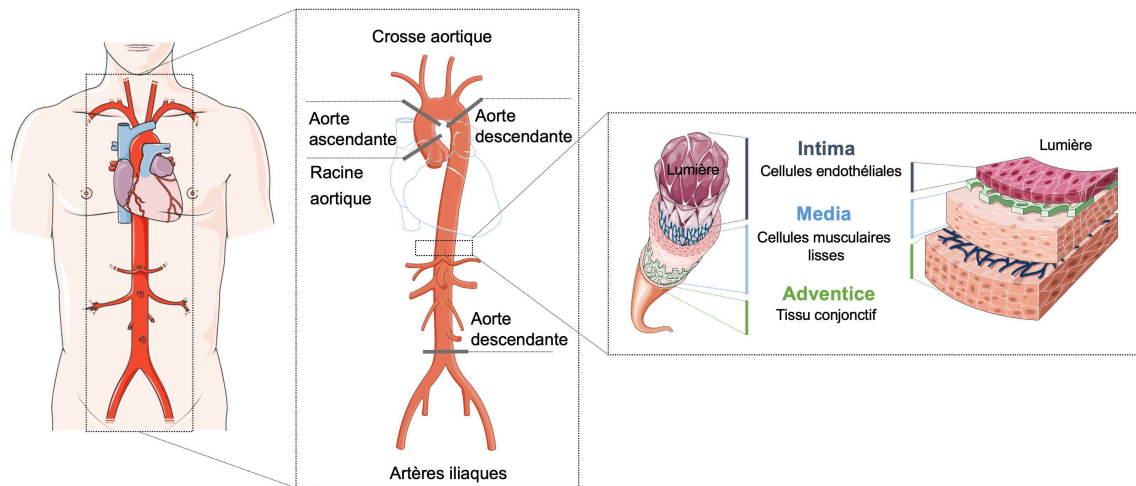


Figure 19 : Physiologie de l'aorte

Représentation schématique des sections de l'aorte ainsi que des trois couches de la paroi artérielle, observables en coupe transversale.

Réalisée à partir de Servier medical Art Gallery (accessible à l'adresse suivante : <https://smart.servier.com/>).

1.3.3. Structure et fonction des cellules VSMCs

Les VSMCs sont des cellules de forme allongée, mononuclées et hautement spécialisées. Les origines embryonnaires sont multiples. En effet, les VSMCs des artères de la tête, du cou et de la crosse aortique sont d'origine ectodermique tandis que les VSMCs des artères du reste de l'organisme sont d'origine mésodermique (Carmeliet, 2000; Armulik et al., 2005). Des mécanismes de transdifférenciation des cellules endothéliales aortiques en VSMCs ont également été décrits (Arciniegas et al., 2000). Cette diversité développementale donne naissance à des VSMCs présentant des différences fonctionnelles et phénotypiques. Bien que la fonction principale des VSMCs soit d'assurer le contrôle de la pression artérielle et la répartition des débits via leur fonction contractile, les VSMCs peuvent également avoir une fonction sécrétrice sous l'influence de signaux

extracellulaires. On parle alors de : (A) phénotype contractile ; (B) phénotype synthétique (Owens et al., 2004).

A. Phénotype contractile

Le phénotype contractile des VSMCs résulte d'un programme de différenciation précis qui permet l'expression de protéines formant l'appareil contractile des VSMCs. Contrairement aux muscles striés qui possèdent un système sarcomérique organisé, les VSMCs possèdent des faisceaux d'actine et de myosine qui s'entrecroisent et forment des points d'ancrage appelés corps denses. Un réseau de FIs constitués principalement de desmine relie les corps denses. Les organites sont regroupés autour du noyau. L'état contractile des VSMCs reflète l'équilibre entre les facteurs vasodilatateurs et vasoconstricteurs. Sous le contrôle du système nerveux autonome, la contraction des VSMCs est stimulée par des agonistes vasoconstricteurs tels que l'angiotensine II ou la noradrénaline, qui permettent une augmentation rapide de calcium (Ca^{2+}) cytosolique provenant du milieu extracellulaire et du reticulum sarcoplasmique. Le Ca^{2+} se lie alors à la calmoduline afin d'activer la kinase des chaînes légères de myosine (MLCK). En présence d'ATP, MLCK phosphoryle les chaînes légères de myosine (MCL) conduisant à la formation d'un pont entre les têtes de myosine et les filaments d'actine générant la contraction. La contraction induit un raccourcissement des VSMCs qui adoptent alors une forme globulaire et dont le noyau est replié sur lui-même en phase de contraction maximale. La relaxation est quant à elle permise par une réduction de la phosphorylation des (MLC) à la suite d'une diminution du calcium, d'une augmentation d'adénosine monophosphate cyclique (AMPC) ou de l'activité d'une phosphatase (Webb, 2003). Les mécanismes de contraction-relaxation des VSMCs permettent de transformer un flux sanguin pulsatile en un flux régulier assurant une distribution optimale des nutriments sanguins aux organes selon les besoins (Lacolley et al., 2017). Les VSMCs contractiles sont hautement différenciées, généralement insensibles aux facteurs mitogènes et possèdent de faibles capacités migratoires et prolifératives (Lacolley et al., 2012).

B. Phénotype synthétique

En réponse à des stimuli intrinsèques ou extrinsèques, les VSMCs sont capables d'adopter un phénotype synthétique. Lors de cette transition phénotypique, les VSMCs perdent leurs propriétés contractiles afin d'acquérir une morphologie de type

fibroblastique. Le réticulum cytoplasmique et leur appareil de Golgi s'étendent, ce qui leur permet de synthétiser des cytokines, des facteurs de croissance ainsi que des composants insolubles de la ECM tels que du collagène et des protéoglycanes. Les VSMCs adoptent alors une fonction de cellules stromales qui synthétisent la ECM, cette dernière ayant un rôle de support de la charge mécanique. Le phénotype synthétique des VSMCs est associé à une forte capacité migratoire et proliférative (Owens et al., 2004).

1.3.4. *Plasticité des VSMCs*

Contrairement aux cellules musculaires striées dont l'état de différenciation est irréversible, les VSMCs sont capables de se dédifférencier sous l'influence de nombreux signaux. Parmi eux figurent les forces mécaniques, certains facteurs humoraux, l'interaction VSMC-VSMC, la matrice extracellulaire, l'influence des cellules endothéliales ainsi que des stimuli associés aux lésions. Ces signaux vont conduire soit à la mort des VSMCs, soit à leur dédifférenciation. Les voies de signalisation de PDGF-BB (pour « platelet-derived growth factor-BB ») et le TGF- β (pour « transforming growth factor- β ») jouent un rôle important dans le contrôle de la dédifférenciation des VSMCs (Tang et al., 2011). En effet, leur activation va permettre de modifier le profil de l'expression génique des VSMCs en induisant notamment des modifications épigénétiques dans le but d'adopter un phénotype synthétique en réponse aux signaux environnementaux. Le changement phénotypique n'est pas définitif et des VSMCs sécrétrices peuvent se dédifférencier en VSMCs contractiles ce qui témoigne de la plasticité des VSMCs (Owens et al., 2004).

Les VSMCs contractiles hautement différenciées expriment des protéines utilisées comme marqueur de la différenciation. L' α -actine ou α SMA (pour « alpha Smooth Muscle Actin ») est un des marqueurs les plus utilisés mais n'est pas suffisant pour discriminer les VSMCs d'autres types cellulaires. En effet, les cellules cardiaques peuvent également exprimer transitoirement l' α SMA. La chaîne lourde de la myosine des muscles lisses (MYH11 pour « myosin heavy chain 11) est un marqueur spécifique des VSMCs contractiles. La transgeline (SM22 α), la smootheline ainsi que la calponine sont des protéines associées au cytosquelette d'actine qui représentent également de bons marqueurs de différenciation musculaire lisse (Duband et al., 1993; Katoh et al., 1994; Shimizu et al., 1995; Niessen et al., 2005). Hormis la smootheline, considérée comme le

seul marqueur permettant de différencier les VSMCs contractiles des autres types cellulaires, toutes les autres protéines sont exprimées par d'autres cellules de manière transitoire pendant le développement ou dans le cadre de pathologies. La dédifférenciation des VSMCs contractiles en VSMCs sécrétrices s'accompagne de leur entrée dans le cycle cellulaire pouvant ainsi proliférer, migrer et sécréter à nouveau les protéines de la ECM (Owens, 1995). Lors de ce changement phénotypique, les VSMCs régulent à la baisse les marqueurs de différenciation en muscles lisses et expriment alors les cyclines, la calmoduline, du collagène I ou des métalloprotéinases (Lacolley et al., 2017; Louis and Zahradka, 2010) (*Figure 20*).

Les VSMCs sont également capables de se transdifférencier en ostéoblastes et en cellules s'apparentant aux chondrocytes. Cette transition phénotypique a été décrite dans deux conditions différentes. Premièrement, les VSMCs sénescents présentent une expression accrue des marqueurs ostéogéniques tels que la phosphatase alcaline (ALP) ou Runx-2, indiquant une susceptibilité accrue à la calcification (Liu et al., 2013c). Les VSMCs adoptent donc un phénotype calcifiant au cours du vieillissement mais les mécanismes conduisant à ce phénotype ne sont pas décrits. Chez les personnes âgées, la transdifférenciation des VSMCs en ostéoblastes se manifeste par une calcification vasculaire, c'est-à-dire au dépôt de cristaux de phosphate de calcium, conduisant à un durcissement des artères (Nakano-Kurimoto et al., 2009). Deuxièmement, la transdifférenciation ostéoblastique des VSMCs peut également être initiée sous des contraintes mécaniques. En effet, en réponse à une contrainte mécanique, les voies Wnt ainsi que les protéines morphogéniques osseuses (BMP) permettent l'ostéogenèse des VSMCs. Cela entraîne la régulation de gènes pro-calcifiant et par conséquent, la calcification de la ECM vasculaire (Tyson et al., 2020).

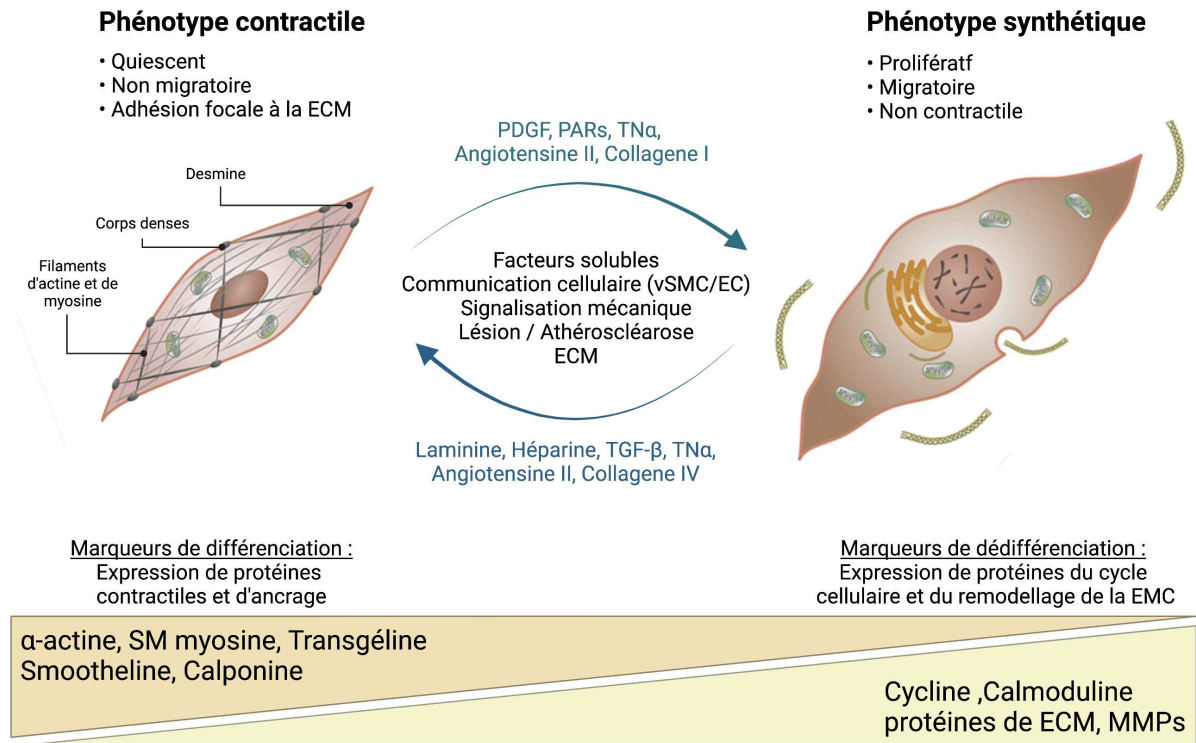


Figure 20 : Plasticité phénotypique des cellules musculaires lisses (VSMCs)

En réponse à une variété de signaux, les VSMCs modifient leur phénotype afin d'assurer soit une fonction contractile soit une fonction synthétique. Le phénotype contractile des VSMCs est associé à l'expression de protéines contractiles et d'ancrage tandis que le phénotype synthétique résulte de l'expression de protéines du cycle cellulaire ainsi que du remodelage de la ECM.

SM : smooth muscle ; ECM : extracellular matrix ; MMP : métalloprotéases matricielles.

Réalisée avec Biorender.

1.3.5. VSMCs dans la progéria de Hutchinson-Gilford

Les VSMCs jouent un rôle majeur dans le développement des troubles cardiovasculaires et suscitent donc un vif intérêt dans la compréhension des mécanismes conduisant à la mort prématurée des patients. L'expression de la progérine dans les VSMCs conduits a été associée à trois phénotypes cliniques : (A) la perte des VSMCs vasculaires ; (B) l'athérosclérose ; (C) la calcification vasculaire.

A. Perte des VSMCs vasculaires

La perte progressive des VSMCs est caractéristique des patients (Stehbens et al., 1999, 2001; Olive et al., 2010) HGPS et des modèles murins (Lee et al., 2016a; Osorio et al., 2011; Varga et al., 2006). La déplétion en VSMCs, qui permet la régulation du tonus vasculaire, est associée à une rigidité vasculaire (Baker et al., 1981). Le stress hémodynamique induit par le flux sanguin est un des mécanismes contribuant à la perte des VSMCs HGPS. En effet, la perte des VSMCs est plus prononcée dans les segments de l'aorte où les forces de cisaillement sont élevées tels que la crosse aortique (Zaghini et al., 2020). De plus, le développement d'une puce microfluidique pour l'étude de VSMCs HGPS différenciées à partir d'iPSCs a confirmé la vulnérabilité des VSMCs HGPS aux forces biomécaniques via une surexpression de la métalloprotéinase 13 (MMP13) (Pitrez et al., 2020). Bien que les cellules endothéliales soient soumises aux mêmes pressions hémodynamiques, leur perte n'est pas observée dans l'aorte des patients ou modèles murins HGPS. Contrairement aux cellules endothéliales, l'expression de la lamine B1 est très faible dans les VSMCs. Une étude a permis de démontrer que la faible expression de la lamine B1 combinée à une expression de la progérine et à un stress mécanique élevé des VSMCs HGPS déclenchait des ruptures de l'enveloppe nucléaire, participant à la perte de ces cellules (Kim et al., 2021). De façon cohérente, perturber le complexe LINC pour réduire les forces transmises aux noyaux, qui sont induites par le stress mécanique, augmente la survie de VSMCs dans le modèle *Lmna*^{G609G/G609G} (Kim et al., 2018). La sensibilité accrue des VSMCs HGPS au stress mécanique peut également s'expliquer par une diminution de l'expression de la vimentine, une protéine du cytosquelette essentielle au maintien de l'intégrité cellulaire, attachée au noyau, au réticulum endoplasmique et aux mitochondries (Song et al., 2014). Par ailleurs, l'étude de VSMCs HGPS différenciées à partir d'iPSCs a permis d'identifier des défauts prolifératifs associés à une altération de l'expression de la poly(ADP-ribose) polymérase-1 (PARP-1) et, par conséquent, pourrait déclencher une mitose prolongée causant une catastrophe mitotique ainsi que la perte des VSMCs HGPS aortiques (Zhang et al., 2014a).

Enfin, l'étude de VSMCs HGPS générées à partir d'iPSCs HGPS a également permis d'identifier une activation anormale de la DNA-PK entraînant l'arrêt de la croissance et la sénescence prématurée des VSMCs. Sachant que les VSMCs sénescents ne sont plus contractiles, la sénescence prématurée des VSMCs HGPS pourrait aussi expliquer la

rigidité vasculaire observée chez les patients (Liu et al., 2011).

B. Athérosclérose

L'athérosclérose observée dans les artères coronaires d'enfants HGPS se développe malgré l'absence des facteurs de prédisposition usuels tels que l'hypercholestérolémie ou le diabète. L'expression de la progérine joue donc un rôle important dans le développement de l'athérosclérose des patients HGPS. Sachant que ce processus pathologique complexe implique plusieurs types cellulaires, un modèle murin HGPS exprimant la progérine spécifiquement dans les VSMCs, *ApoE^{-/-}Lmna^{LCS/LCS}SM22 α Cre*, a été mis au point (Hamczyk et al., 2018). Ces souris développent de l'athérosclérose et meurent prématurément suggérant le rôle des VSMCs dans l'athérosclérose des patients HGPS. Dans cette même étude, il a été montré que la progérine accélère l'athérosclérose en induisant un stress endoplasmique des VSMCs (Hamczyk et al., 2019).

C. Calcification vasculaire

La calcification vasculaire est caractéristique des patients atteints de la progéria. En effet, une calcification de l'aorte, une sténose calcifiée de la valve aortique ainsi qu'une calcification de la valve mitrale ont été décrites (Hanumanthappa et al., 2011; Nair et al., 2004; Salamat et al., 2010). La calcification vasculaire a également été observée chez les modèles de souris HGPS (Varga et al., 2006; Villa-Bellosta et al., 2013a). Des études réalisées à partir de VSMCs issues de souris *Lmna^{G609G/+}* ont permis de mettre en évidence une diminution de la production d'ATP associée à une déplétion en pyrophosphate inorganique extracellulaire (ePPi). Sachant que le ePPi est un inhibiteur majeur de la calcification, sa diminution permet d'expliquer la calcification vasculaire dans des modèles murins HGPS. Par ailleurs, de nombreuses études ont établi un lien entre l'accumulation de prélamine A dans les VSMCs et la calcification vasculaire (Afonso et al., 2016; Liu et al., 2013c; Quirós-González et al., 2016; Ragnauth et al., 2010). Dans l'ensemble, ces études témoignent de l'importance des VSMCs HGPS dans le dysfonctionnement vasculaire des patients et modèles HGPS.

1.4. PARylation

1.4.1. Histoire

La poly(ADP-ribosylation), aussi appelée PARylation, est une modification post-traductionnelle découverte dans les années 1960 (Chambon et al., 1963). Initialement décrite comme une réaction enzymatique formant un polymère semblable à un acide nucléique à partir du nicotinamide adénine dinucléotide (NAD⁺), les polymères ont rapidement été décrits comme de longues chaînes poly(ADP-ribose) (PAR) (Nishizuka et al., 1967; Sugimura et al., 1967). Simultanément, il a été montré que dans les cellules eucaryotes, les groupements PAR se forment spécifiquement sur les acides aminés glutamate, aspartate, lysine, arginine et cystéine des protéines cibles via des enzymes responsables de sa synthèse alors appelées poly(ADP-ribose) polymérase (PARPs) (Hasegawa et al., 1967; Nishizuka et al., 1967; Reeder et al., 1967; Sugimura et al., 1967, 1967). Les enzymes responsables de sa dégradation ont, quant à elles, été identifiées quelques années plus tard et ont été nommées poly(ADP-ribose) glycohydrolases (PARGs) (Miwa and Sugimura, 1971; Miwa et al., 1974). Dans les années 1980, l'identification d'une possible association PARP-histones et PARP-chromatine a permis de déduire le rôle de la PARylation dans les dommages à l'ADN. En effet, il s'est avéré que les cassures de l'ADN induites par les ROS, les espèces réactives du nitrogène (RNS pour « reactive *nitrogen* species ») ainsi que les agents alcalins engendrent la synthèse de groupements PAR (Durkacz et al., 1980). Par la suite, la première génération d'inhibiteurs de PARP a été développée. Parmi eux, le nicotinamide, le benzamide ou le 3-aminobenzamide dont l'utilisation a permis à des cellules en culture d'être plus sensibles aux effets cytotoxiques d'agents alkylants. Les inhibiteurs de PARP ont ainsi rapidement été combinés aux agents cytotoxiques endommageant l'ADN dans la chimiothérapie du cancer dans l'idée de renforcer l'effet cytotoxique des cellules cancéreuses entraînant leur mort (Banasik et al., 1992; Curtin and Szabo, 2020a; Juarez-Salinas et al., 1979; Purnell and Whish, 1980; Yamada et al., 1971). La seconde génération d'inhibiteurs de PARP a été développée dans les années 1990. Les années 2000 voient naître les inhibiteurs de PARP de troisième génération dont l'olaparib sera le premier inhibiteur de PARP approuvé par la FDA dans le traitement du cancer de l'ovaire en 2014 (Curtin and Szabo, 2020a). En plus de la

réparation des dommages à l'ADN, de nouvelles fonctions ont récemment été attribuées à la PARylation dans le métabolisme (Szántó and Bai, 2020), la signalisation cellulaire (Gupte et al., 2017), la transcription des gènes (Jubin et al., 2017), le vieillissement (Vida et al., 2016), la prolifération cellulaire (Cohen-Armon et al., 2007) et, de façon plus surprenante, dans la mort cellulaire (Andrabi et al., 2006). En effet, la PARylation a des fonctions biologiques opposées en tant que mécanisme de survie cellulaire également impliqué dans la mort cellulaire (Bürkle and Virág, 2013). La PARylation a donc des fonctions étendues qui sont vitales pour l'homéostasie cellulaire et est impliquée dans diverses pathologies telles que les atteintes du système cardiovasculaire mais aussi dans certaines laminopathies (Cardoso and Muchir, 2020). Bien que la PARylation ait été identifiée depuis une cinquantaine d'années, ses cibles moléculaires ne sont pas encore toutes connues et certains mécanismes restent à découvrir.

1.4.2. Acteurs de la PARylation

La PARylation est une modification post-traductionnelle catalysée par (A) les poly(ADP-ribose) polymérasés (PARPs). Impliquée dans de nombreuses fonctions biologiques, une fine régulation des PAR est indispensable. Le caractère réversible de la PARylation est assuré par (B) la poly(ADP-Ribose) glycohydrolase (PARG) qui dégrade les groupements PAR.

A. Poly(ADP-ribose) polymérasés (PARPs)

Les PARPs représentent une famille d'enzymes capables de cliver la liaison glycosidique du NAD⁺ entre le nicotinamide (NAM) et le ribose pour former du NAM ainsi que de l'ADP-ribosyl (ADPR). Ce clivage permet aux PARPs d'attacher de façon covalente l'ADPR à une protéine acceptrice, on parle alors de mono(ADP-ribosylation) (MARylation). Les PARPs clivent également d'autres molécules de NAD⁺ afin de constituer des formes linéaires et ramifiées de PAR dont la longueur de la chaîne peut atteindre 200 unités ADPR. On parle alors de PARylation (Cohen and Chang, 2018; Hottiger et al., 2010) (**Figure 21**). La famille des enzymes PARPs est composée de 17 homologues. Parmi les 17 homologues connus, 16 ont une activité d'ADP-ribosyltransférase, ce qui a récemment conduit à suggérer une nouvelle nomenclature pour les PARPs: les ADP-

ribosyltransférases (ARTs) basées sur la réaction catalysée ainsi que des caractéristiques structurelles pour faciliter leur classification (Mangerich and Bürkle, 2012). La première à avoir été décrite est PARP-1, une protéine essentiellement nucléaire d'environ 116kD. Au sein de cellules issues de souris déficientes en PARP-1, la synthèse de PAR a été mise en évidence suggérant la présence d'une nouvelle PARP nucléaire, la PARP-2 (Amé et al., 1999; Shieh et al., 1998). Par ailleurs, les souris PARP-1^{-/-} sont viables mais présentent cependant une hypersensibilité aux radiations ionisantes et aux agents alcalins (Boehler et al., 2011). Seul le double knock-out PARP-1 et PARP-2 est létal confirmant que ces deux PARPs représentent la majeure capacité cellulaire totale de la PARylation (Ménissier de Murcia et al., 2003). PARP-1, qui a été la première ART identifiée, est responsable de la biosynthèse de 90% des PAR d'une cellule et par conséquent, est la mieux décrite fonctionnellement

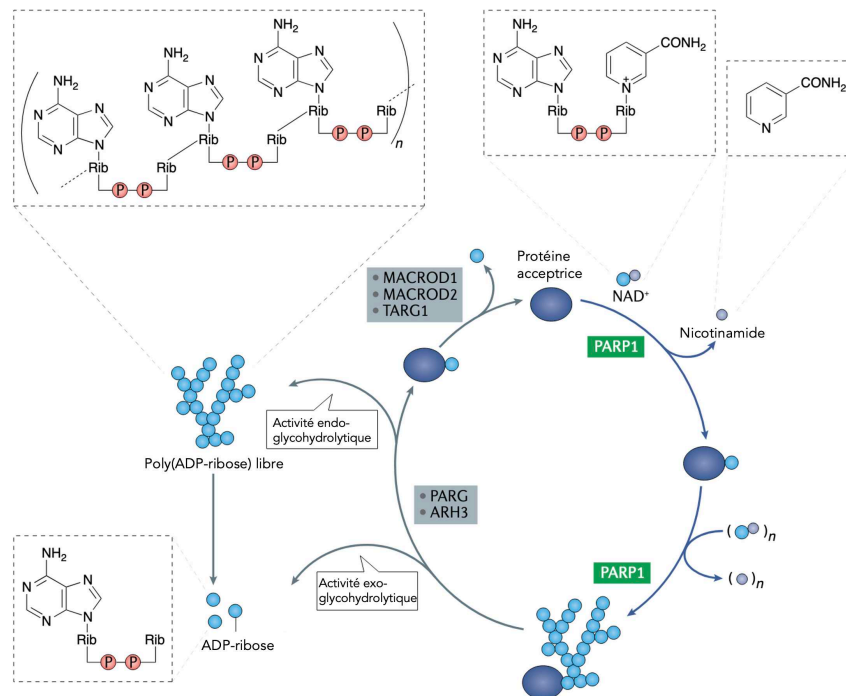


Figure 21 : Poly(ADP-ribose)

La PARylation est une modification post-traductionnelle essentiellement catalysée par les enzymes appelées « Poly(ADP-ribose) polymérase de type-1 » (PARP-1), qui permettent le transfert de multiples groupes ADP-ribose du nicotinamide adénine dinucléotide (NAD⁺) à des protéines acceptrices, générant de longues chaînes de poly(ADP-ribose) (PAR). La poly(ADP-ribose) glycohydrolase (PARG) et l'ADP-ribosylhydrolase 3 (ARH3), permettent la dégradation du PAR via leurs activités exoglycosidiques et endoglycosidiques. Les mono(ADP-ribose) sont quant à eux éliminés par MACROD1, MACROD2 et TARG1. Un groupement PAR libre peut également être dégradé en mono(ADP-ribose).

Adaptée de (Curtin and Szabo, 2020a).

Le gène *PARP-1* chez l'Homme est situé sur le chromosome 1, en région q41-42 (de Murcia et al., 1994). Il code la PARP-1 dont l'expression est ubiquitaire. Cependant, son expression diffère au cours du cycle cellulaire. En effet, PARP-1 est plus fortement exprimée au cours des phases G1 et S que pendant les phases G2 et M (Cesarone et al., 1990; Wein et al., 1993). L'expression de PARP-1 est également variable selon le niveau de stress cellulaire : (1) si le niveau de stress cellulaire est faible, l'expression de PARP-1 est modérée ; (2) si la cellule est soumise à un stress génotoxique induisant des dommages à l'ADN, l'enzyme PARP-1 est fortement exprimée afin de réparer les dommages ; (3) si le stress est très élevé, tout comme les dommages à l'ADN, la PARP-1 est surexprimée et participe à l'enclenchement de la mort cellulaire programmée. Cette modulation de l'expression génique est permise par le facteur Sp1 qui est fixé au promoteur de PARP-1 lorsque la cellule n'est soumise à aucun stress. Par opposition, lorsque PARP-1 est activée par un stress, elle « PARyle » Sp1 afin de bloquer sa liaison au promoteur (Zaniolo et al., 2007). Les facteurs de transcription répondants au stress génotoxique tels que Ets-1, peuvent alors se fixer au promoteur de PARP-1 et induire sa forte expression. En effet, le facteur de transcription Ets-1 est fortement exprimé en présence de ROS telles que le H₂O₂ et le NO confirmant l'activation génique de PARP-1 dans les cellules soumises à un stress (Soldatenkov et al., 1999, 2002).

PARP-1 est une protéine constituée de trois régions : une région de liaison à l'ADN en N-terminal caractérisée par trois domaines en doigts de zinc (ZnF), un domaine catalytique en C-terminal ainsi qu'un domaine central d'automodification. Au sein de sa séquence en acides aminés, des modifications post-traductionnelles permettent de moduler son activité (Ruf et al., 1996). La PARylation de PARP-1 a été la première modification post-traductionnelle identifiée. PARP-1 peut soit s'auto-PARYler, soit être trans-PARYlée par d'autres PARPs. La PARylation de PARP-1 permet d'amorcer son activité catalytique et de faciliter la PARylation d'autres protéines (Luo and Kraus, 2012). Les groupements PAR deviennent ensuite tellement massifs qu'ils inhibent la liaison de cette dernière sur l'ADN, assurant sa dissociation afin de permettre à d'autres protéines d'assurer la réparation des dommages à l'ADN en phase terminale (Kraus, 2008). L'activité de PARP-1 peut également être régulée par phosphorylation via de nombreuses kinases comme ERK-2 ou JNK1/2 qui activent PARP-1 à la suite d'une stimulation à l'H₂O₂ (Zhang et al., 2007). La CDK2, la CaMKII (pour « Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II ») et la CKII (pour « casein kinase II ») sont aussi des kinases activatrices de PARP-1. Par

ailleurs, il existe également des kinases qui répriment l'activité de PARP-1 telles que la PKC, la CDK5 ainsi que la DNA-PK. De plus, l'acétylation de PARP-1 a été identifiée sur les mêmes résidus que ceux qui peuvent être PARylés suggérant deux mécanismes compétitifs garantissant une activité moyenne de PARP-1 (Messner et al., 2010). Enfin, PARP-1 peut aussi être SUMOylée et ubiquitinée, engendrant leur dégradation par le protéasome sous certaines conditions comme un choc thermique ou un stress mitotique (Martin et al., 2009). Par ailleurs, la régulation de l'activité de PARP-1 peut s'observer par des interactions protéine-protéine. Parmi ces protéines figurent les histones H1, H4 et H2B qui permettent l'activation de PARP-1 ainsi que son auto-PARylation tandis que l'histone H2A l'inhibe. Comme décrit précédemment, ERK-2 ainsi que JNK-1/2 sont des protéines qui activent le domaine catalytique de PARP-1 par opposition à KIF4 (pour « kinesin family member 4 ») qui l'inhibe (Doetsch et al., 2012).

Via ses nombreuses interactions, l'activité de PARP-1 et par conséquent la PARylation, est finement régulée, ce qui lui permet d'assurer de nombreuses fonctions opposées (*Figure 22*). En effet, lorsque les niveaux de dommages à l'ADN sont faibles, PARP-1 agit comme un facteur impliqué dans la détection et la réparation des dommages à l'ADN. En revanche, en présence de niveaux élevés de dommages à l'ADN, le niveau d'activation de PARP-1 est maximal et participe au déclenchement de la mort cellulaire. Ce processus étant irréversible, PARP-1 est alors clivée par les caspases afin d'empêcher que la réparation de l'ADN n'interfère avec la mort de la cellule. L'ensemble des fonctions de PARP-1 seront détaillées ultérieurement (cf. partie 1.4.5. « Rôles cytoprotecteurs de la PARylation » et partie 1.4.6 « Rôles cytotoxiques de la PARylation »).

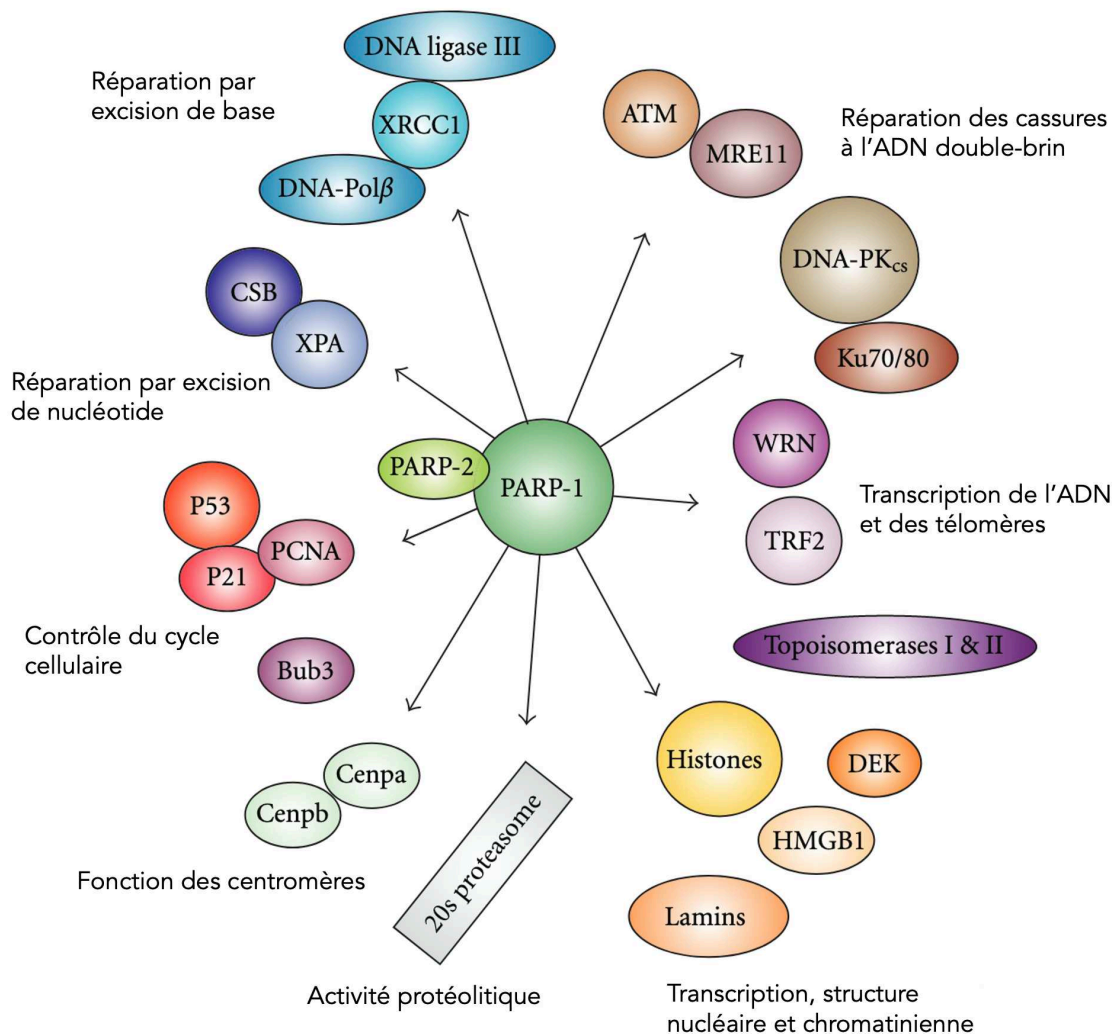


Figure 22 : Principaux partenaires des poly(ADP-ribose) polymérases (PARP) et leur fonction associée

ATM : ataxie télangiectasie mutée ; Bub3 : budding uninhibited by benzimidazoles 3 ; Cenpa/b : protéine centromérique a/b ; CSB : Cockayne syndrome group B ; DEK : oncogène DEK ; DNA-Pol β : DNA polymérase β ; DNA-PK CS : sous-unité catalytique de la protéine kinase activée par l'ADN ; HMGB1 : high mobility group box 1 ; Ku70/80 : Ku 70/80 kDa ; MRE11 : recombinaison méiotique 11 ; p21 : inhibiteur 1A de la kinase dépendante de la cycline ; p53 : protéine suppresseuse de tumeurs p53 ; PCNA : proliferating cell nuclear antigen ; TRF2 : telomeric repeat-binding factor 2 ; WRN : protéine du syndrome de Werner ; XRCC1 : x-ray repair cross-complementing protein 1 ; XPA : xeroderma pigmentosum, complementation group A.

Adaptée de (Mangerich and Bürkle, 2012).

B. Poly(ADP-ribose) glycohydrolases (PARGs)

Sachant que la PARylation possède un rôle central pour deux fonctions biologiques opposées, une fine régulation de cette modification post-traductionnelle est indispensable. En effet, la PARylation est une réaction réversible et par conséquent

transitoire via l'action de la poly(ADP-Ribose) glycohydrolase (PARG) qui est la principale hydrolase impliquée dans la dégradation des PAR (Miwa and Sugimura, 1971; Miwa et al., 1974). PARG possède une activité à la fois endo-glycohydrolytique et exo-glycohydrolytique lui permettant de rompre les liaisons glycosidiques entre les unités d'ADP-riboses des PAR (Brochu et al., 1994). Ces deux modes de catalyse lui permettent de générer soit des ADP-riboses pour la fonction exo-glycohydrolytique, soit des PAR libres pour la fonction endo-glycohydrolytique. Les ADP-riboses libérés peuvent être métabolisés en adénosine monophosphate (AMP) ou en riboses 5'phosphate par les ADP-riboses pyrophosphohydrolases (Mildvan et al., 2005). D'un côté, les AMP permettent la reformation d'ATP (Rodríguez-Vargas et al., 2019) et de l'autre, les riboses 5'phosphate sont les précurseurs de nombreuses molécules comme l'ADN, ARN ou l'ATP (Kowalik et al., 2017). D'autres enzymes ont été décrites pour dégrader les PAR dont les fonctions sont cependant moins caractérisées que celles de la PARG. Par exemple, l'ADP-ribose hydrolase 3 (ARH3) possède une activité PARG associée à la dégradation des PAR dans la mitochondrie (Niere et al., 2012). Enfin, MACROD1, MACROD2 et TARG1 sont des ADP-glycohydrolases permettant de cliver la liaison du groupement MAR (généré par PARG) à sa protéine cible (**Figure 21**) (Curtin and Szabo, 2020a).

Chez l'Homme, le gène *PARG* est situé sur le chromosome 10 en position 10q11.23-21 (Shimokawa et al., 1998). Il existe une multitude d'isoformes de PARG, issues de l'épissage alternatif, qui possèdent différentes localisations sous-cellulaires (Meyer-Ficca et al., 2004). La plus longue isoforme d'environ 111kDa (PARG₁₁₁) est localisée au niveau du noyau tandis que les autres se situent soit dans la mitochondrie soit dans le cytoplasme.

Les PARGs cytoplasmiques peuvent rapidement être relocalisées au niveau du noyau en condition de stress (Haince et al., 2006). Alors que les souris déficientes pour PARP-1 sont viables, le KO de toutes les isoformes de PARG est léthal (Koh et al., 2004). Cependant, les souris KO PARG₁₁₁ présentent une hypersensibilité aux radiations ionisantes et agents alcalins tout comme les souris KO PARP-1 (Cortes et al., 2004). Ainsi, bien que PARP et PARG soient des antagonistes du métabolisme de la PARylation, ils médient des phénomènes biologiques opposés en agissant de façon synergique, plutôt qu'en s'opposant aux effets de chacun.

1.4.3. Fonctions de la PARylation

Différentes fonctions de la PARylation ont été abordées précédemment et seront détaillées dans cette partie. Ses fonctions biologiques étant opposées, les rôles dans la survie cellulaire seront dans un premier temps décrits : (A) rôles cytoprotecteurs de la PARylation. Dans un second temps, les rôles de la PARylation associés à la mort cellulaire seront exposés : (B) rôles cytotoxiques de la PARylation (*Figure 23*).

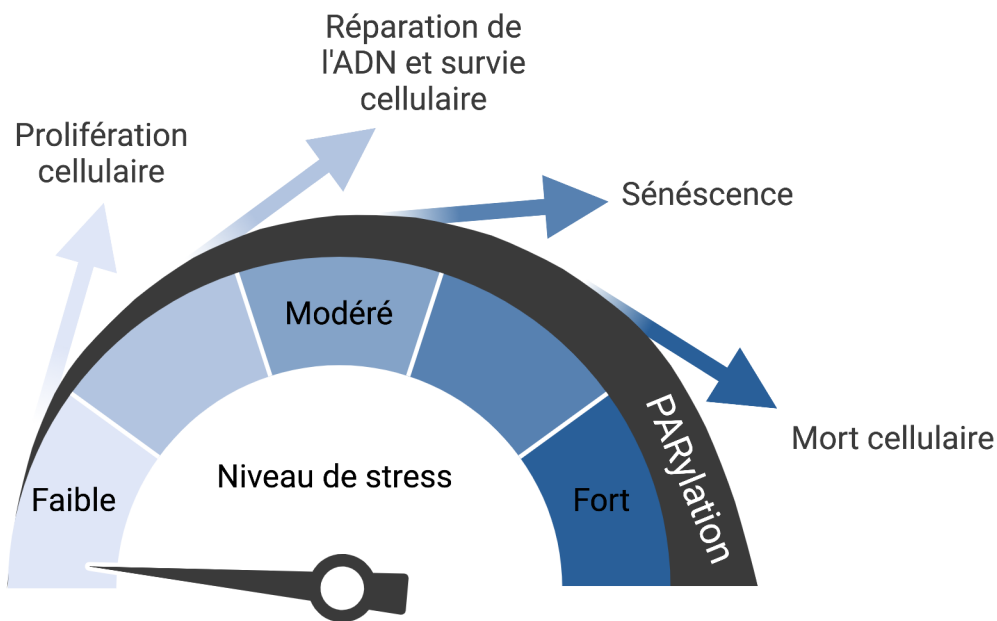


Figure 23 : Fonctions cytoprotectrices et cytotoxiques de la poly(ADP-Ribosylation) (PARylation)

PARP-1 assure différentes réponses cellulaires selon le niveau des signaux de stress. Pour des signaux de stress faibles à modérés, la PARylation favorisera la survie cellulaire tandis que pour des signaux modérés à élevés, la PARylation induira la mort cellulaire.

Adaptée de (Luo and Kraus, 2012) et réalisée avec Biorender.

A. Rôles cytoprotecteurs de la PARylation

Parmi les rôles cytoprotecteurs de la PARylation figure la réparation des dommages à l'ADN. PARP-1 et PARP-2 sont en effet activés en présence de cassures simple-brin (CSB) ou de cassures double-brin (CDB), agissant ainsi comme des détecteurs de dommages à l'ADN causés par des radiations ionisantes ou des agents alcalins. De plus, la PARylation permet la réparation de ces dommages en facilitant le recrutement de protéines vers le site de dommages. Pour cela, le polymère ADP-ribose synthétisé par les PARPs sert d'indicateur au niveau des sites endommagés reconnus par les protéines

effectrices de la réparation de l'ADN. Parmi ces protéines, on retrouve des protéines de la NHEJ, de la HR et de la réparation par excision de bases (BER pour « base excision repair »).

La NHEJ existe sous deux formes. La voie majoritaire chez les eucaryotes, NHEJ « classique » (c-NHEJ), est dépendante de DNA-PKC tandis que la voie alternative (a-NHEJ), dépendant de PARP-1, n'est utilisée qu'en cas de secours à une c-NHEJ défectueuse. En effet, PARP-1 joue un rôle central dans la c-NHEJ en assurant le recrutement des protéines de réparation dont XRCC1 (pour « X-ray Repair Cross Complementing 1 ») (Li et al., 2013) (*Figure 24*). Bien que la c-NHEJ soit dépendante de la DNA-PKC, PARP-1 joue néanmoins un rôle important dans la stabilisation du complexe DNA-PK/Ku et dans l'augmentation de l'activité de la DNA-PK. De plus, les PAR seraient reconnus par la ADN ligase IV lui permettant d'être rapidement recrutée au site de dommage et d'assurer la c-NHEJ (Li et al., 2013; Spagnolo et al., 2012) (*Figure 24*).

PARP-1 ne semble pas être une protéine essentielle à la HR. En effet, la HR se déroule normalement dans des cellules déficientes en PARP-1. PARP-1 jouerait cependant un rôle support à la HR au niveau de la fourche de réplication, au sein de laquelle une CSB peut être transformée en CDB (Schultz et al., 2003). PARP-1 protège les fourches de réplifications bloquées et facilite le recrutement de facteurs tels que RAD51 ou BRCA2 pour promouvoir la réparations de l'ADN et permettre le redémarrage de la fourche de réplication (Bryant et al., 2009; Ying et al., 2012). La BER est quant à elle une voie de réparation réservée à l'altération d'une seule base de l'ADN induite par la toxicité de nombreux processus comme l'oxydation, la méthylation, la désamination, l'alkylation ou encore l'hydroxylation (Ciccina and Elledge, 2010). Dans un premier temps, les bases altérées sont clivées par des ADN-glycolases laissant place à un site abasique. Parmi les ADN-glycolases, OGG1 (pour « 8-oxoguanine glycosylase 1 ») interagit avec PARP-1 afin de la recruter au site de dommage (Noren Hooten et al., 2011). Ces sites sont ensuite réparés par deux voies différentes : (1) la voie de réparation courte dont seul le nucléotide altéré est remplacé par XRCC1. Le recrutement de ce dernier est stimulé par PARP-1 qui se dissocie de l'ADN à la suite d'un encombrement stérique engendré par sa forte auto-PARylation (Dantzer et al., 2000) ; (2) la voie de réparation longue, dont le brin sera resynthétisé sur plusieurs bases autour du site abasique, est favorisée par PCNA (Wei and Yu, 2016) (*Figure 24*).

Du fait de leur fonction de facteurs de réparation des dommages à l'ADN, les PARPs sont considérées comme des protéines cytoprotectrices. Par ailleurs, les PARPs jouent également un rôle dans la régulation de la chromatine et par conséquent, dans la régulation de la transcription, qui sont toutes deux essentielles à l'homéostasie cellulaire. Les PARPs sont effectivement capables d'interagir avec des protéines qui contribuent à l'architecture nucléaire et chromatinienne comme les lamines ou les histones (Mangerich and Bürkle, 2012). Ces derniers sont également des protéines acceptrices de PAR et sont les deuxièmes protéines nucléaires les plus PARylées après PARP-1 (Messner et al., 2010).

La PARylation des histones favorise la décompaction de la chromatine permise par la répulsion entre les groupements PAR et l'ADN ce qui permet de rendre la chromatine accessible aux facteurs de transcription ainsi qu'aux facteurs de réparation de l'ADN (Wacker et al., 2007). De par sa liaison avec TRF2, une protéine impliquée dans la stabilité télomérique, PARP-1 serait également impliquée dans l'homéostasie des télomères. En effet, il a été observé *in vivo* que le KO de PARP-1 dans un modèle murin engendre une diminution de l'ADN télomérique de 30% par rapport aux souris contrôles. Ceci s'explique par la PARylation de TRF2, qui diminue sa liaison à l'ADN télomérique et permet l'accès aux facteurs de réparation des dommages à l'ADN préservant l'intégrité des télomères (Gomez et al., 2006). Par ailleurs, la diminution de longueur des télomères chez les souris KO pour PARP-1 peut aussi s'expliquer par le rôle de PARP-1 dans le recrutement aux télomères de SLX4, une protéine de réparation des dommages à l'ADN (Sadhukhan and Ghosh, 2021). Le rôle de PARP-1 dans l'intégrité génomique a également été confirmé par son interaction fonctionnelle avec l'hélicase WRN (Lebel et al., 2003) (pour « Werner » faisant référence à la maladie associée à sa mutation qui se caractérise par un vieillissement précoce (Lee et al., 2005)). Ainsi, la PARylation en tant que modification post-traductionnelle essentielle dans l'intégrité génomique est associée à la cytoprotection cellulaire. Tout processus biologique nécessitant un juste équilibre, l'hyperactivation de la PARylation représente cependant un signal cytotoxique.

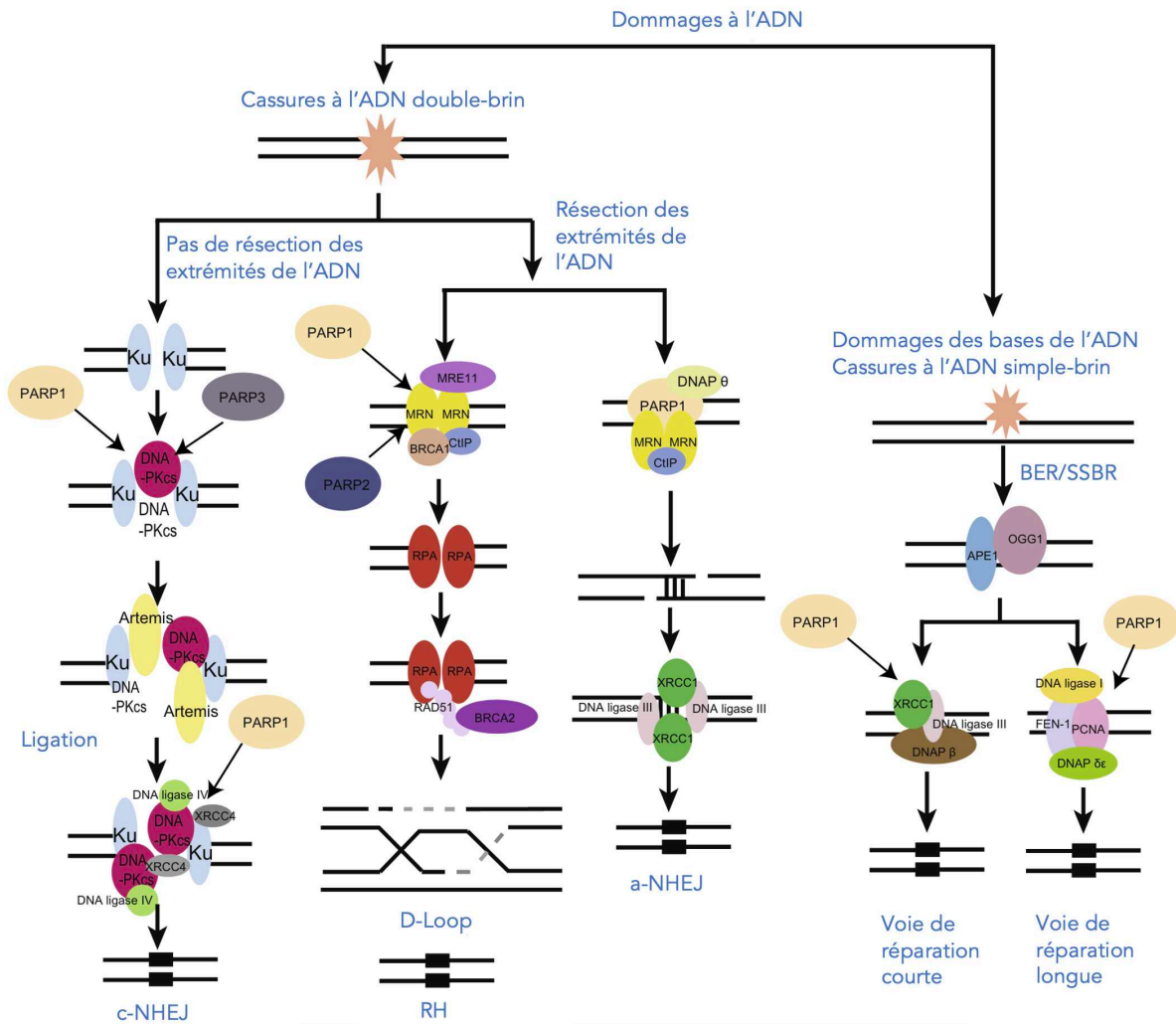


Figure 24 : Poly(ADP-ribose) polymérase et réparation des dommages à l'ADN

Ce schéma résume le rôle de PARP-1 dans l'intégrité génomique via son interaction avec de nombreux facteurs de réparation de dommages à l'ADN simple-brin et double-brin. a-NHEJ : alternative non-homologous end-joining ; APE : apurinic/aprimidinic (AP) endonuclease ; BER : base excision repair ; BRCA1 : breast cancer type 1 susceptibility protein ; BRCA2 : breast cancer type 2 susceptibility protein ; c-NHEJ : classical non-homologous end-joining ; CtIP : C-terminal-binding protein(CtBP)-interacting protein ; DNAP : DNA polymerase ; DNA-PKcs : DNA-dependent protein kinase catalytic subunit ; FEN-1 : flapstructure-specific endonuclease 1 ; HR : homologous recombination ; MRE11 : meiotic recombination 11 homolog 1 ; MRN : Mre11-Rad50-Nbs1 complex ; OGG1 : 8-oxoguanine glycosylase 1 ; PARP : poly(ADP-ribose) polymérase ; PCNA : proliferating cell nuclear antigen ; RPA : replication protein A ; SSBR : single-strand break repair ; XRCC4, X-ray repair cross-complementing protein 4.

Adaptée de (Wei and Yu, 2016).

B. Rôles cytotoxiques de la PARylation

Bien que la PARylation favorise la survie cellulaire en participant aux mécanismes de réparation des cassures de l'ADN, l'excès de PAR peut également être un signal de mort cellulaire.

L'apoptose est un mécanisme de mort cellulaire programmé permettant d'échapper à la cancérisation ou à la nécrose qui génère une inflammation aiguë. Pour être déclenchées, des voies de signalisation spécifiques sont activées et nécessitent une grande quantité d'énergie. En présence d'un nombre important de cassures de l'ADN induites par des stress cytotoxiques, PARP-1 va être hyper-activée et consommer une grande quantité de NAD⁺. Sachant que le NAD⁺ est un précurseur de la synthèse d'ATP ainsi qu'un cofacteur pour différentes enzymes, sa consommation massive par les PARP-1 engendre une diminution de « réserve énergétique ». Afin de maintenir des niveaux de NAD⁺ et d'ATP nécessaires au processus apoptotique, PARP-1 est clivée par les caspases et devient par conséquent inactive (Lazebnik et al., 1994). PARP-1 est également clivée afin d'éviter que la réparation des dommages à l'ADN n'interfère avec l'apoptose dont la fragmentation de l'ADN est un des éléments déclencheurs. L'implication de la PARylation dans l'apoptose dépendante des caspases peut également se confirmer par la PARylation de p53. La PARylation de ce facteur de transcription entraîne son accumulation nucléaire afin de lui permettre d'initier le programme apoptotique (Luo and Kraus, 2012).

La *Parthanatos* est également une mort cellulaire induite par la PARylation. Son nom provient de la contraction de « PAR » et de « *Thanatos* » correspondant au dieu de la mort dans la mythologie grecque, témoignant du rôle central de la PARylation dans ce mécanisme (Wang et al., 2009). La *Parthanatos* décrite comme l'apoptose caspase indépendante médiée par le facteur inducteur d'apoptose (AIF pour « apoptotic induced factor ») (Andrabi et al., 2006; Wang et al., 2009; Yu et al., 2002). Contrairement à son nom, l'AIF est aujourd'hui davantage reconnu comme un médiateur nécrotique plutôt qu'apoptotique (Boujrad et al., 2007). L'hyperactivation de PARP-1, induite par les nombreux dommages à l'ADN, engendre une polymérisation excessive et une accumulation de PAR capable de quitter le noyau (Yu et al., 2006). La fuite nucléaire de PAR déclenche le relargage de l'AIF par les mitochondries et sa translocation au noyau. Cela engendre une condensation et une fragmentation de l'ADN (Wang et al., 2011) (**Figure 25**). Ce mécanisme permet d'aboutir à la mort cellulaire mais est moins coûteux en énergie que l'apoptose. De plus, la *Parthanatos* induit une perte de l'intégrité de la membrane cytoplasmique mais n'induit pas d'inflammation du tissu environnant, ce qui la distingue de la nécrose (Wang et al., 2009).

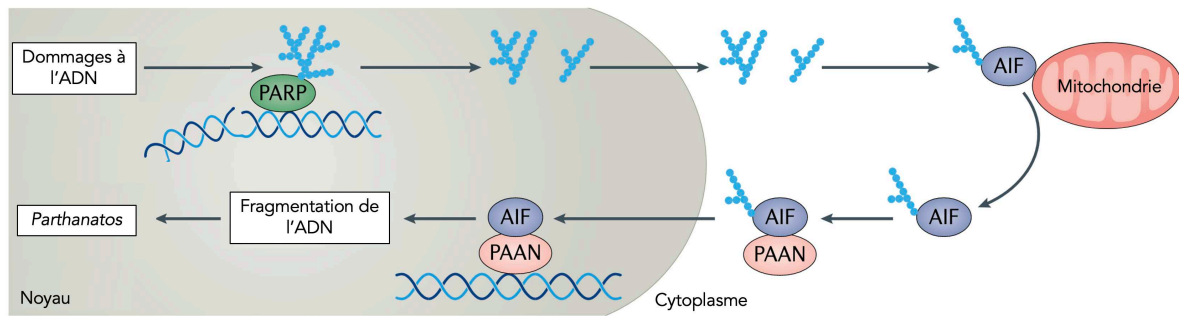


Figure 25 : La Parthanatos

L'activation de la poly(ADP-ribose) polymérase (PARP-1) à la suite de dommages à l'ADN conduit à la génération de groupements poly(ADP-ribose) (PAR) schématisés en bleu. Les PAR sont alors transloqués dans le compartiment cytosolique et peuvent être reconnus par des récepteurs mitochondriaux. Le facteur d'induction apoptotique (AIF) va alors être relargué par les mitochondries puis être associé à PAAN (pour « PARP1 dependent AIF-associated nuclease »). Cette dernière assure la condensation et la fragmentation de l'ADN conduisant à la mort cellulaire appelée « Parthanatos ».

Adaptée de (Curtin and Szabo, 2020a).

Par ailleurs, des études ont également rapporté une association entre la PARP-1 et la nécrose, une mort cellulaire par autodigestion qui induit une inflammation. En réponse à un stress, PARP-1 s'active et diminue les niveaux en ATP cellulaire via une consommation accrue du NAD^+ . La chute brutale des réserves énergétiques représente un stress cytotoxique pour la cellule qui entre alors en nécrose (Weaver and Yang, 2013). Parallèlement, les faibles niveaux cellulaires d'ATP résultent en une activation de la protéine AMPK qui inhibe la voie mTOR en favorisant l'autophagie. L'inhibition de PARP-1 permet ainsi de réduire la mort cellulaire par autophagie (Muñoz-Gómez et al., 2009).

Dans l'ensemble, les mécanismes par lesquels la PARylation conduit à la cytotoxicité cellulaire sont bien identifiés (**Figure 26**). Néanmoins, les signaux qui déclenchent une voie de mort cellulaire spécifiquement par rapport à une autre sont, quant à eux, peu décrits. Plusieurs facteurs ont cependant été supposés déterminants dans le déclenchement du mécanisme de mort cellulaire tels que le type de dommages, le type cellulaire ou encore la gravité des lésions de l'ADN (Virág et al., 2013). Par exemple, de légers dommages déclenchent l'apoptose tandis que de fortes agressions induisent la nécrose (Virág and Szabó, 2002).

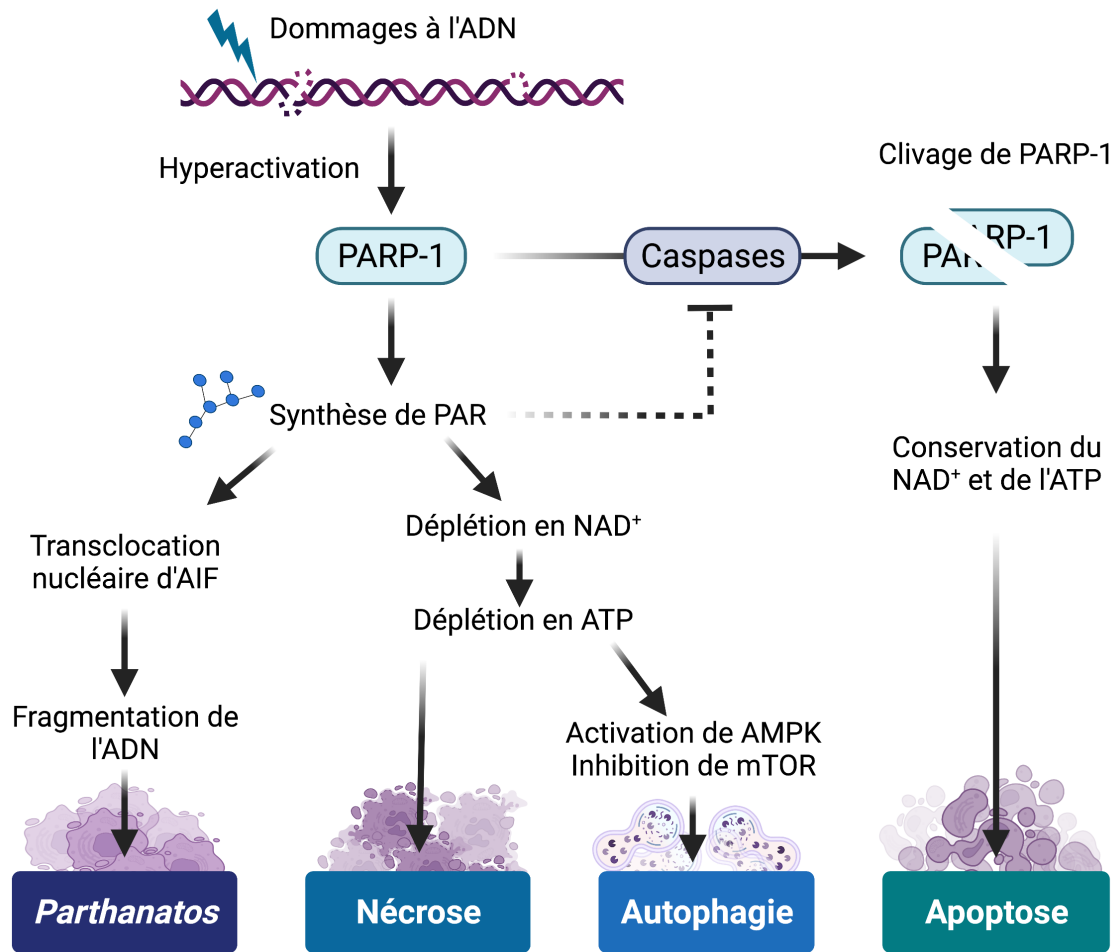


Figure 26 : Rôle de la poly(ADP-ribose) polymérase (PARP-1) dans les voies de mort cellulaire

L'hyperactivation de PARP-1 à la suite de dommages à l'ADN peut engendrer différentes voies de mort cellulaire. Un taux élevé de poly(ADP-ribose) favorise la *Parthanatos* via la translocation du facteur d'induction apoptotique (AIF) mais peut également favoriser une déplétion en nicotinamide adénine dinucléotide (NAD⁺) et d'adénosine triphosphate (ATP) conduisant à la nécrose ou à l'autophagie. L'activation des caspases peut, quant à elle, conduire à l'inactivation de PARP-1 par clivage menant à l'apoptose cellulaire. Les grouments PAR inhibent les caspases et par conséquent, l'apoptose.

Adaptée de (Weaver and Yang, 2013) et réalisée avec Biorender.

1.4.4. Métabolisme du NAD⁺

Le NAD⁺ est un co-substrat pour les PARPs mais aussi pour d'autres enzymes telles que le cluster de différenciation 38 (CD38) et SARM1 (pour « Sterile α and TIR Motif Containing 1) tous deux impliqués dans la signalisation du calcium (Ca²⁺) (Song et al., 2011). Les sirtuines (SIRT) sont des désacétylases qui utilisent également le NAD⁺ comme co-facteur afin de réguler des processus biologiques clés notamment la régulation de la

chromatine, le contrôle du cycle cellulaire, la réparation de l'ADN et la fonction mitochondriale (Dali-Youcef et al., 2007). Parmi ces quatre différentes enzymes, PARP-1 est la principale consommatrice de NAD⁺ cellulaire (Hurtado-Bagès et al., 2020). L'activation de PARP-1 conduit à une consommation accrue en NAD⁺ et nécessite sa resynthèse afin d'être disponible à nouveau. Le maintien de l'équilibre entre la dégradation et la biosynthèse du NAD⁺ est donc essentiel pour l'homéostasie cellulaire. Chez les mammifères, seuls les neurones sont capables d'importer le NAD⁺ (Rajman et al., 2018). Par conséquent, les autres types cellulaires doivent nécessairement le synthétiser via différentes voies (*Figure 27*).

Les voies « *de novo* » et de « Preiss-Handler » conduisent respectivement à la synthèse du NAD⁺ à partir du tryptophane (Trp) et de la vitamine B3 nicotinique, aussi appelée Niacine (NA), tous deux apportés par l'alimentation. La biosynthèse à partir de l'acide aminé Trp est considérée comme un contributeur mineur au pool total de NAD⁺. Au cours d'une réaction en plusieurs étapes appelée « voie de la kynurénine », le Trp est d'abord transformé en α -amino- β -carboxymuconate- ϵ -semialdéhyde (ACMS) puis est ensuite converti en acide quinolinique (QA). La phospho-ribosyl-transférase de l'acide quinolinique (QaPRT) génère le mononucléotide de l'acide nicotinique (NAMN) à partir de l'QA. Parallèlement, l'ACMS peut être converti en α -aminomuconate semialdéhyde (AMS) par l' α -amino- β -carboxy-muconate-semialdéhyde décarboxylase (ACMSD). Cette réaction permet la production d'acétyl-CoA par dégradation du tryptophane, qui est finalement utilisé dans le cycle de l'acide tricarboxylique (TCA). La modulation de l'utilisation du Trp pour le cycle de TCA ou la synthèse du NAD⁺ est régulée par l'accumulation de l'ACMS. En effet, l'hyperactivation de l'ACMSD empêche une synthèse efficace du NAD⁺ alors qu'une faible activité de l'ACMSD permet une synthèse efficace du tryptophane en NAD⁺ (Palzer et al., 2018). La voie de Preiss-Handler consiste en une transformation de la NA en NAMN par l'intermédiaire de la nicotinate phospho-ribosyl-transférase (NAPRT). Les voies *de novo* et de Preiss-Handler se terminent par des enzymes dites nicotinamides mono-nucléotides adénylyl-transférases (NMNAT) qui catalysent la transformation de la NAMN en acide nicotinique adénine dinucléotide (NAAD). Pour terminer, les NAD⁺ synthase (NADS) produisent du NAD⁺ à partir du NAAD (*Figure 27*).

La voie de sauvetage est considérée comme la voie majeure pour le maintien des niveaux de NAD⁺ intracellulaires (Revollo et al., 2004). Elle se base sur le recyclage des produits de dégradation générés par l'activité des enzymes consommatrices de NAD⁺. Tout d'abord, le nicotinamide (NAM) libéré lors des réactions de consommation du NAD⁺ est recyclé en nicotinamide mononucléotide (NMN) par les nicotinamides phospho-ribosyl-transférases (NAMPT). Ces dernières sont les enzymes limitantes de cette voie en convertissant le NMN en NAD⁺ (Bogan and Brenner, 2008; Ummarino et al., 2017). Parallèlement, les nicotinamides riboside kinases (NRK1/2) transforment le nicotinamide riboside (NR) en NMN. Le NMN est ensuite converti en NAD⁺ par les nicotinamides mononucléotides adénylyl-transférases 1, 2 et 3 (NMNAT 1, 2 et 3) qui sont respectivement exprimées dans le noyau, le cytoplasme et les mitochondries (Cantó et al., 2012a) (*Figure 27*).

Le métabolisme du NAD⁺ est un élément central dans l'homéostasie cellulaire notamment de par son rôle de cofacteur pour certaines enzymes telles que les PARPs. En effet, PARP-1 est impliquée à la fois dans la réparation des dommages à l'ADN, dans la fonction des télomères et dans le contrôle du cycle cellulaire. Ainsi, l'altération du métabolisme du NAD⁺ et par conséquent de PARP-1 est associée au vieillissement et à diverses pathologies cardiovasculaires (Mericskay, 2016; Verdin, 2015). En effet, il a été démontré dans un modèle de cardiomyopathie dilatée EDMD, le modèle murin *Lmna*^{H222p/H222p}, que l'altération de la voie de sauvetage du NAD⁺ conduit à une diminution des niveaux cellulaires de NAD⁺. Cette déplétion serait un déterminant essentiel de la fonction cardiaque puisque l'administration orale du NR, un précurseur du NAD⁺, permet de protéger le cœur des souris de la cardiomyopathie (Vignier et al., 2018). De même, le traitement au NR d'un autre modèle de souris de cardiomyopathie dilatée, le modèle *SRF*^{HKO}, préserve la fonction cardiaque de ces souris confirmant le rôle central du NAD⁺ dans la physiopathologie vasculaire (Diguët et al., 2018).

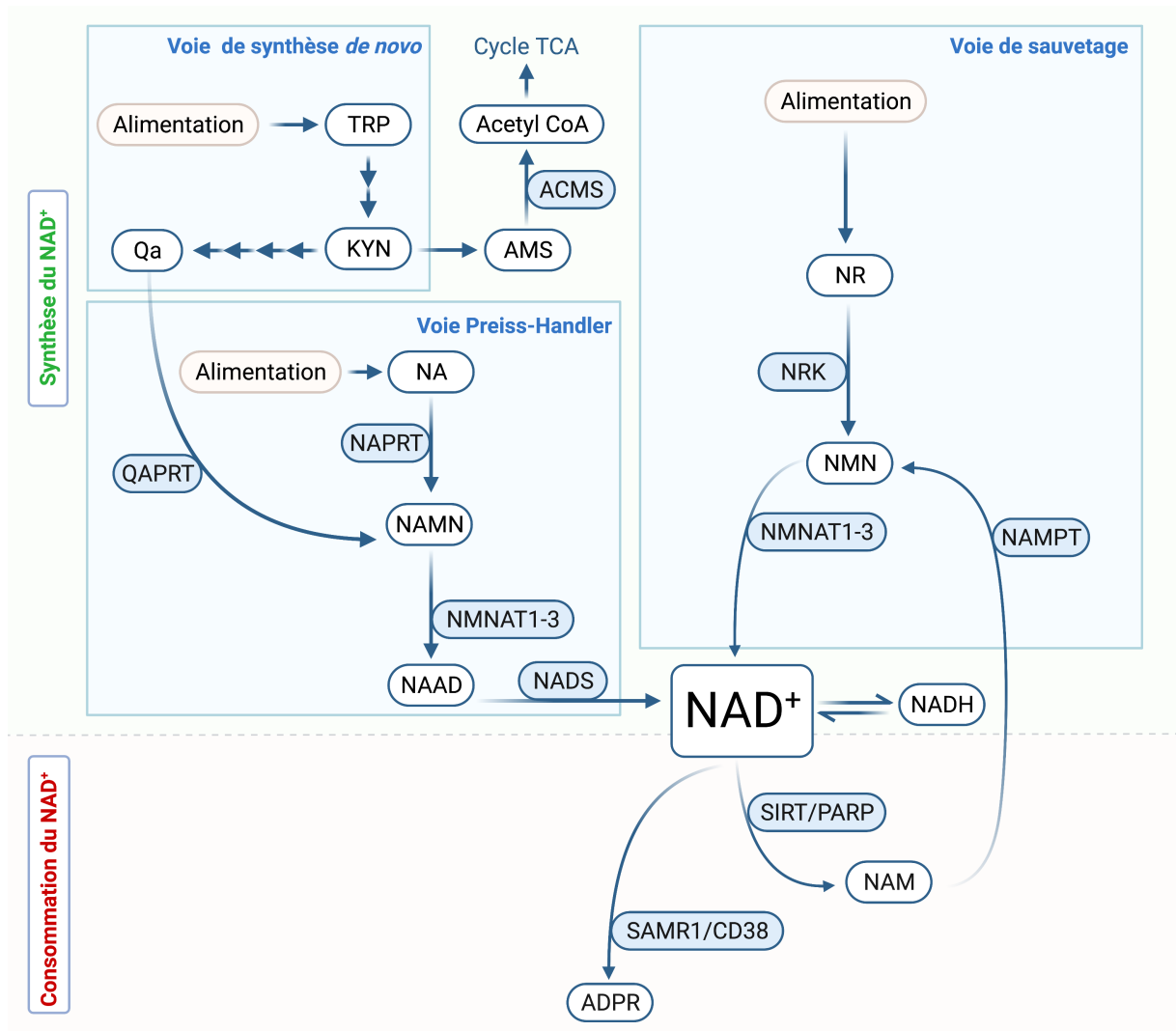


Figure 27 : Métabolisme du nicotinamide adénine dinucléotide (NAD⁺)

Les voies Preiss-Handler et de novo permettent de synthétiser du NAD⁺ à partir de précurseurs apportés par l'alimentation. La voie de sauvetage du NAD⁺ est, quant à elle, basée sur le recyclage des produits de dégradation du NAD⁺ par les consommateurs afin de resynthétiser du NAD⁺.

ADPR : ADP-ribose ; ACMS : α-amino-β-carboxymuconate-ε-semialdéhyde ; AMS : α-aminomuconate semialdéhyde ; CD38 : cluster de différenciation 38 ; KYN : acide kynurénique ; NA : nicotinic acid ; NAAD : nicotinic acid adenine dinucleotide ; NAD⁺ : nicotinamide adénine dinucléotide ; NADH : forme réduite du NAD⁺ ; NADS : NAD⁺ synthase ; NAM : nicotinamide ; NAMN : nicotinic acid mononucleotide ; NAMPT : nicotinamide phospho-ribosyl-transférase ; NAPRT : nicotinic acid phospho-ribosyl-transferase ; NMN : nicotinamide mononucléotide ; NMNAT : nicotinamide mononucléotide adenylyltransférase ; NR : nicotinamide riboside ; NRK : nicotinamide riboside kinase ; PARP : poly(ADP-Ribose)polymérase ; QA : quinolinic acid ; TCA : tricarboxylic acid ; TRP : tryptophane ; QAPRT : quinolinic acid phospho-ribosyl-transferase ; SAMR1 : Sterile Alpha And TIR Motif Containing 1 ; SIRT : sirtuines.

Adaptée de (Cardoso and Muchir, 2020).

Chapitre 2

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Ce deuxième chapitre est dédié aux résultats et discussions associées. Il se compose d'une première partie consacrée à mon projet de thèse principal qui démontre que l'augmentation de la PARylation dans la progéria contrôle la perte des VSMCs : (2.1.) « Altération de la PARylation dans la progéria : impact sur la physiopathologie vasculaire ». Le contexte et les objectifs de cette étude seront d'abord explicités puis un article en préparation illustrera le projet. Les résultats complémentaires à cette étude seront ensuite présentés. Enfin, une discussion générale des résultats de l'article ainsi que des résultats complémentaires exposeront les avancées de ce projet de thèse.

Les connaissances relatives à la PARylation acquises au cours de ce projet de thèse m'ont permis d'étudier cette modification post-traductionnelle dans un autre modèle pathologique. Dans le cadre d'une collaboration avec l'équipe du Dr. Stéphane Blot à l'École Nationale Vétérinaire d'Alfort, j'ai eu l'occasion d'avoir accès à un modèle de Golden Retriever présentant une dystrophie musculaire (GRMD). Avec l'aide du Dr. Inès Barthélémy, j'ai pu démontrer que l'altération de la PARylation joue un rôle sur la fonction musculaire dans la DMD. Cette étude secondaire, annexe à mon projet de thèse, confirme l'importance de la PARylation dans les cellules musculaires pathologiques. J'ai donc choisi de présenter ces résultats au travers d'une seconde partie : (2.2.) Projet annexe : rôle de la PARylation sur la fonction cardiaque et musculaire dans la dystrophie musculaire de Duchenne. Une brève introduction décrira le contexte ainsi que l'objectif de l'étude. L'article en préparation sera intégré afin de présenter les résultats obtenus. En ce sens, il contiendra la discussion ainsi que la conclusion générale de ce projet.

2.1. Altération de la PARylation dans la progéria : impact sur la physiopathologie vasculaire

2.1.1. Contexte et positionnement de l'étude

A. Introduction

Les syndromes progéroïdes sont des maladies génétiques rares qui miment les caractéristiques cliniques et moléculaires du vieillissement. Parmi elles, le syndrome de la progéria de Hutchinson-Gilford est une pathologie qui touche une centaine d'enfants dans le monde et qui se caractérise par un vieillissement accéléré dès la première année post-natale.

C'est une maladie autosomique dominante sporadique, causée dans la majorité des cas par une substitution de novo dans l'exon 11 du gène *LMNA* (c.1824 C>T ; p.G608G) qui code deux protéines nucléaires : les lamines A et C (De Sandre-Giovannoli et al., 2003; Eriksson et al., 2003a). La prélamine A possède un motif CaaX en C-terminal, farnésylé de façon transitoire permettant l'ancrage de la prélamine A au réticulum endoplasmique lors de sa maturation. Le groupement farnésyl est éliminé à la suite de modifications post-traductionnelles pour former la lamine A mature. Dans le cas d'une prélamine A mutée, une délétion de 50 acides aminés empêche le clivage du motif, donnant lieu à l'expression d'une lamine A farnésylée de façon constitutive appelée progérine. Cependant, lorsque la progérine est exprimée, elle s'incorpore dans la lamina nucléaire qui joue un double rôle majeur : (1) structural dans le soutien et la stabilité du noyau, (2) fonctionnel dans l'organisation dynamique du génome.

L'expression de la progérine dans la progéria a donc des effets délétères qui se manifestent chez les patients par des atteintes cutanées (alopécie, sclérose cutanée, etc.), métaboliques (dysmorphie, lipodystrophie, etc.), cardiovasculaires (athérosclérose, hypertension artérielle, etc.) et donc à la mortalité précoce. Parmi toutes ces conséquences cliniques, caractéristiques d'un vieillissement prématuré, les altérations du système cardiovasculaire sont les premières causes de décès des patients à 14,6 ans en

moyenne (Gordon et al., 2014).

B. Objectifs

Il est avéré que les cellules musculaires lisses vasculaires jouent un rôle important dans le maintien de l'intégrité aortique. Lors du vieillissement, l'abondance et la fonctionnalité des VSMCs diminuent à la fois chez les patients HGPS et dans les modèles animaux de la progéria (Villa-Bellosta et al., 2013a). Néanmoins, les mécanismes par lesquels l'expression de la progérine conduit à la perte massive des VSMCs sont inconnus. Ce projet a pour objectif d'améliorer la compréhension de ce processus et de permettre ainsi le développement de nouveaux traitements contre les maladies cardiovasculaires dans la progéria ainsi que dans le vieillissement en général.

C. Hypothèses

De récents travaux ont mis en évidence le rôle de la PARylation dans l'apparition des troubles du système cardiovasculaire dans une laminopathie des muscles striés (Vignier et al., 2018). Cette modification post-traductionnelle est catalysée par les PARPs, qui permettent le transfert de multiples groupes ADP-ribose du NAD⁺ à des protéines acceptrices. Cela génère de longues chaînes de poly(ADP-ribose) nécessaires à la réparation des dommages à l'ADN. Le NAD⁺ est donc un co-substrat essentiel, dont le métabolisme est un élément central dans l'homéostasie cellulaire. La PARylation, tout comme le métabolisme du NAD⁺, sont altérés dans le cœur de souris qui présentent une cardiomyopathie associée aux mutations du gène *LMNA*. Le traitement de ces souris avec du nicotinamide riboside qui est un précurseur naturel du NAD⁺, améliore le contenu cardiaque en NAD⁺ et améliore la fonction du ventricule gauche (Vignier et al., 2018). Nous avons ainsi émis l'hypothèse que l'expression de la progérine pourrait modifier le métabolisme du NAD⁺ et conduire à des cascades d'événements moléculaires à l'origine de la perte des VSMCs dans la progéria.

D. Impact

Des résultats témoignant du rôle de la PARylation sur la perte des VSMCs ouvriront la voie à de nouveaux travaux pour la mise au point de traitements novateurs améliorant la pathologie cardiovasculaire dans la progéria qui est actuellement, une maladie incurable.

2.1.2. Article n°1: Targeting PARylation improves aortic disease in Hutchinson-Gilford progeria syndrome

Targeting PARylation improves aortic disease in Hutchinson-Gilford progeria syndrome

Déborah Cardoso, Solenn Guilbert, Aurélie Carabanola, Cécile Peccate, Catherine Bartoli, Nicolas Levy, Laurence Colleaux, Xavier Nissan, Antoine Muchir

Manuscrit en préparation pour soumission dans le journal Human Molecular Genetics.

Facteur d'impact de Human Molecular Genetics (2021) : 6.2

Targeting PARylation improves aortic disease in Hutchinson-Gilford progeria syndrome

Déborah Cardoso¹, Solenn Guilbert², Aurelie Carabanola³, Cécile Peccate¹, Catherine Bartoli³, Nicolas Levy³, Laurence Colleaux³, Xavier Nissan², Antoine Muchir^{1*}

¹ Sorbonne Université, UPMC Paris 06, INSERM UMRS974, Center of Research in Myology, Institut de Myologie, F-75013 Paris, France

² CECS, I-STEM AFM, Institute for Stem Cell Therapy and Exploration of Monogenic Diseases, 28 rue Henri Desbruères, 91100 Corbeil-Essonnes, France

³ Aix-Marseille Université, UMRS910 : Génétique médicale et Génomique fonctionnelle, Faculté de médecine Timone, Marseille, France

*Correspondence: a.muchir@institut-myologie.org

ABSTRACT

Hutchinson-Gilford progeria syndrome (HGPS) is an extremely rare genetic disorder associated with clinical and molecular features of accelerated aging. HGPS patients appear asymptomatic at birth but within the first year of life begin to display the effects of accelerated aging and suffer from growth retardation, bone and tendon abnormalities, lipodystrophy, alopecia and severe cardiovascular complications including arterial fibrosis, loss of vascular smooth muscle cells (VSMCs) and severe arterial damage. HGPS is a sporadic autosomal dominant disease caused in almost all cases by a *de novo* single-base substitution of *LMNA*, encoding nuclear A-type lamins. This *LMNA* mutation leads to the synthesis of a truncated form of prelamin A called progerin.

Cardiovascular disease leads to premature death of patients. Vascular smooth muscle cells (VSMCs) are important for maintaining aorta integrity. Given that the abundance and functionality of VSMCs decline with aging in progeria, we investigated the mechanisms by which progerin leads to massive VSMCs loss. Using aorta tissue from a mouse model of HGPS, *Lmna*^{G609G/G609G} mice, we showed an increase of VSMCs death associated with an increase in DNA damages. Poly(ADP-Ribosyl)ation (PARylation) is now recognized as a central post-translational protein modification that coordinates the building of repair complexes at damage sites with the timely controlled dissociation of the repair factors. Our results demonstrate for the first time that aberrant PARylation occurs in VSMCs of premature aging mouse model. Increased PARylation in VSMCs from *Lmna*^{G609G/G609G} mice was associated with a decrease in nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺), which is a critical regulator of metabolism and thus, contributes to the pathogenesis. Pharmacological inhibition of PARylation restores NAD⁺ levels and blunts VSMCs loss, suggesting a novel approach towards therapeutics for cardiovascular disease in progeria.

KEYWORDS

Hutchinson-Gilford progeria syndrome ; NAD⁺ ; PARP-1 ; vascular smooth muscle cells

INTRODUCTION

Hutchinson-Gilford progeria syndrome (HGPS) is a rare genetic disorder that mimics clinical and molecular features of ageing. Classical form of HGPS is a sporadic autosomal dominant disease caused by a point mutation in exon 11 of the *LMNA* gene (c.1824 C>T; p.G608G) (De Sandre-Giovannoli et al., 2003; Eriksson et al., 2003b). *LMNA* encodes for nuclear lamins A and C proteins generated by alternative splicing (Lin and Worman, 1993). Lamin A is synthesized as a prelamin A containing a C-terminal farnesylated *CaaX* motif, which is removed by ZMPST24 zinc metallo-protease to form mature lamin A (Nigg et al., 1992). Dominant *LMNA* c.1824 C>T mutation activates a cryptic splice donor site in prelamin A, leading to the deletion of 150 nucleotides from exon 11 and generation of a 50-amino acids truncated pre-lamin A (prelamin A Δ 50; 606-656). The 50-amino acids internal deletion eliminates ZMPSTE24 cleavage site, leading to the synthesis of an incomplete processed prelamin A, which is constitutively farnesylated (e.g. progerin). Progerin retains a farnesyl lipid anchor inside the nuclear lamina resulting in a dose-dependent toxicity that causes various cellular defects which includes misshapen nuclear morphology, alteration of resistance to mechanical stress, chromatin disruption, epigenetic and gene transcription changes, genomic instability, mitochondrial dysfunction leading to premature senescence (Carrero et al., 2016).

Although affected children have no symptoms at birth, they develop various clinical signs of ageing in their first year of life. Clinically, patients suffer from growth retardation, bone and tendon abnormalities, lipodystrophy, alopecia and severe cardiovascular complications including arterial fibrosis, loss of vascular smooth muscle cells (VSMCs) and severe arterial damage. Changes in both vascular architecture and pressure result in myocardial infarction, which often leads to premature death of HGPS patients at a mean age of 14.6 years (Gordon et al., 2014).

While many potential therapies for progeria have emerged based on progerin expression inhibition, progerin farnesylation inhibition, increased progerin clearance and reduction of toxic effects of progerin, there is currently no cure (Guilbert et al., 2020). Given that children with progeria die prematurely from cardiovascular disease, improve our knowledge of the mechanisms through which progerin expression leads to premature cardiac pathology is essential to provide therapies for HGPS patients. Previous studies have shown that progressive loss of aortic VSMCs is characteristic of HGPS patients (Olive et al., 2010; Stehbens et al., 1999, 2001) and mouse models of progeria (Osorio et al., 2011;

Varga et al., 2006). In large arteries such as aorta, VSMCs have a strong capacity to regulate blood pressure and flow distribution through their contractile function. As a result, VSMCs play a key role in the development of cardiovascular disorders and represent therefore a great importance in understanding the mechanisms leading to premature death in patients and in mouse models of progeria. Few studies providing a potential mechanism linking progerin expression and VSMCs loss were focused on mechanical forces. In the *Lmna*^{G608G/+} mouse model of progeria, VSMCs loss is more severe in the aortic arch where the hemodynamic pressure induced by blood flow is very important (Kim et al., 2018; Zaghini et al., 2020). In addition, microfluidic chip study of HGPS VSMCs differentiated from iPSCs confirmed the vulnerability of HGPS VSMCs to biomechanical forces induced by overexpression of metalloproteinase 13 (MMP13) (Pitrez et al., 2020). Although endothelial cells are exposed to the same hemodynamic pressures, their loss is not observed in the aorta of HGPS patients or mouse models. Despite its importance, investigation of VSMC cell death signaling has been extremely limited.

Similar to other muscular cells, VSMCs convert chemical energy from adenosine triphosphate (ATP) into mechanical activity, which is necessary to generate cell contractions. Given that ATP production is dependent on nicotinamide adenine dinucleotide (NAD), this metabolic co-factor emerges as potential new therapeutic target for striated muscle caused by *LMNA* mutations (Cardoso and Muchir, 2020) suggesting as well a potential role of NAD in HGPS VSMCs dysfunction. NAD is found in cells either in its oxidized (NAD⁺) or reduced (NADH) form (Berger et al. 2004). NAD⁺ is a cofactor for various enzymes such as Poly-ADP Ribose Polymerases (PARPs), Sirtuines (SIRTs), and Poly(Adenosine diphospho-ribose) (ADPR) synthases (Magni et al., 1999). Among them, PARPs are major cellular NAD⁺ consumers by the catalysis of Poly(ADP-Ribosyl)ation (PARylation), a post-translational modification that plays an important role in DNA damage detection and repair, chromatin modification, transcription and cell death pathways (Chambon et al., 1963). PARPs allows the transfer of multiple ADP-ribose groups from NAD⁺ to acceptor proteins, generating long poly(ADP-ribose) chains (PAR). NAD⁺ is therefore an essential co-substrate that can be synthesized from various precursors by three independent intracellular pathways. *De novo* and Preiss-Handler pathways lead to NAD⁺ synthesis from tryptophan (Trp) and nicotinic acid (NA) in the diet but the major pathway for maintaining intracellular NAD⁺ levels is the salvage pathway (Revollo et al., 2004). The salvage pathway consists in recycling NAM released during

NAD⁺ consumption reactions into nicotinamide mononucleotide (NMN) then converted in NAD⁺ by Nicotinamide phosphoribosyltransferase (Nampt) that is the limiting enzymes in this pathway. Moreover, nicotinamide riboside (NR) is another NAD⁺ precursor which is transformed in NMN by nicotinamide riboside kinase (NRK2) and enhances NAD⁺ levels through the salvage pathway (Bieganowski and Brenner, 2004). Maintaining balance between NAD⁺ degradation and biosynthesis is therefore critical for cellular homeostasis.

We hypothesized that progerin expression could modify NAD⁺ metabolism leading to cascades of molecular events that cause the loss of VSMCs. Using two models of the pathology, *Lmna*^{G609G/G609G} mice and cultured *Lmna*^{G609G/G609G}-VSMCs, we demonstrated aberrant PARylation associated with a decrease in NAD⁺. Treatment of VSMCs from *Lmna*^{G609G/G609G} with a PARP inhibitor, restores NAD⁺ levels. *In vivo*, Z improves VSMC loss in *Lmna*^{G609G/+} progeria mouse model.

RESULTS

Altered PARylation causes loss of VSMCs in aorta of *Lmna*^{G609G/G609G} mice

To analyze the effect of progerin expression on vascular disease, we studied the knock-in *Lmna*^{G6096G/G6096G} mouse model, carrying the most common mutation found in HGPS patients (Osorio et al., 2011). *Lmna*^{G6096G/G6096G} mice express progerin and recapitulates most of the clinical features observed in patients such as growth retardation, weight loss, lipodystrophy, alopecia as well as a reduced longevity. Immunoblotting in aortic arch and thoracic aorta confirmed progerin expression in several regions of the aorta from *Lmna*^{G6096G/G6096G} mice (**Figure 28A**). Analysis of aortic arch cross section showed a decrease in the thickness of the media layer containing VSMCs in *Lmna*^{G6096G/G6096G} mice compared with control mice (**Figure 28B**), as well as a decreased expression of smooth muscle actin protein in *Lmna*^{G6096G/G6096G} mice (**Figure 28C**), confirming VSMCs loss in aorta in HGPS. An increased TUNEL-positive cells was observed in aorta cross sections of *Lmna*^{G609G/G609G} mice compared with control mice (**Figure 28D**). We also showed an increased expression of both Cytochrome C (Cyt C) and apoptosis-inducing factor (AIF) proteins in aortic arch and thoracic aorta from *Lmna*^{G609G/G609G} mice (**Figure 28E**), suggesting a rise in apoptosis in mutated mice. To determine the leading causes of increased apoptosis, we performed comet assay on VSMCs. Isolation of VSMCs from mice aorta was confirmed by immunoblotting showing SMA expression in both WT-VSMCs and *Lmna*^{G609G/G609G}-VSMCs (**Figure 29A**). As expected, *Lmna*^{G609G/G609G}-VSMCs

showed progerin expression (**Figure 29A**). Progerin expression in *Lmna*^{G609G/G609G}-VSMCs increased cell death (**Figure 29B**). Comet tail length was significantly increased in *Lmna*^{G609G/G609G}-VSMCs compared with WT-VSMCs (**Figure 29C**). Additionally, we studied immunostaining of the phosphorylated form of histone H2Ax (γ H2Ax) which illustrates double-stranded DNA breaks. Staining quantification showed an increased in the mean of γ H2Ax foci per nuclei in *Lmna*^{G609G/G609G}-VSMCs (**Figure 29D**). Enhanced apoptosis was observed *in vitro* by increased AIF, Cyt C and Cleaved caspase 3 (Cleaved Cas 3) protein expression in *Lmna*^{G609G/G609G}-VSMCs (**Figure 29E**). Given that caspase-independent apoptosis is initiated by the release of AIF from the mitochondria to the cytosol, we analyzed AIF cellular localization by immunofluorescence. We showed decreased colocalization of AIF and mitochondria stained by mitotracker in *Lmna*^{G609G/G609G}-VSMCs (**Figure 29F**). We conclude that progerin expression causes increased apoptosis in aorta from HGPS mouse model.

Given that VSMCs from *Lmna*^{G609G/G609G} mice accumulate DNA breaks and show increased apoptosis, we focused on PARylation, a post-translational modification involved in DNA damage repair in the presence of NAD⁺ (**Figure 30A**). Immunoblotting using poly(ADP-ribose) (PAR) antibody showed a significantly increased PARylation in aorta from *Lmna*^{G609G/G609G} mice and VSMCs from *Lmna*^{G609G/G609G} mice compared with control (**Figure 30B**). PARylation is known to be catalyzed by PARPs enzymes, among which PARP-1 is the main isoform that consume NAD⁺. Immunoblotting showed that the increased PARylation was correlated with increased PARP-1 protein expression *in vivo* and *in vitro* in *Lmna*^{G609G/G609G} mice compared with control (**Figure 30C**). In addition, there was a significant decreased expression of Nampt and NRK2 in *Lmna*^{G609G/G609G} mice compared with control (**Figure 30C**). All together, these data show that the presence of progerin in VSMCs is sufficient to increase expression of NAD⁺ consuming enzymes and decrease NAD⁺ salvage pathway proteins. We therefore assessed NAD⁺ level and showed that the NAD⁺ cellular levels were significantly lowered in VSMCs from *Lmna*^{G609G/G609G} mice compared with control (**Figure 30D**). These data suggest that NAD⁺ depletion could participate in increased apoptosis in aorta from HGPS.

Z compound inhibits PARP-1 activity and increases NAD⁺ levels

We then focused on the identification of therapeutic compounds able to improve loss of VSMCs. For that purpose, we performed a drug screening on VSMCs derived from HGPS iPSCs patients (HGPS-VSMCs) or from healthy control (Ctrl-VSMC) (**Figure 31A**).

First, we assess progeria defect in HGPS-VSMCs. Immunofluorescence of VSMCs with lamin A/C staining showed an increase in abnormal nuclear morphology in HGPS-VSMCs and senescence was increased compared to Ctrl-VSMCs (**Figure 31B et 31C**). The level of NAD⁺ was significantly decreased in HGPS-VSMCs, consistently with our results in VSMCs from *Lmna*^{G609G/G609G} mice (**Figure 31D**). We next performed a high-throughput screening on HGPS-VSMCs after three days of culture with the goal to identify compounds able to increase NAD/NADH levels in HGPS-VSMCs. Quantification of total cellular NAD/NADH was performed by spectrophotometry using NAD/NADH-Glo™ Assay kit (Promega). Cell viability was measured by counting Hoechst stained cells using an automated imaging system. DMSO 0.1% and FK866 (1 μM) were used as negative and positive controls, respectively. Libraries compounds were considered as potential candidates when their effect was greater than 3 standard deviations from the mean of all tested compounds without affecting cell viability to an extent of greater than 30%. This led to a first list of 48 hits, which were only 9 after retest experiment. By dose-response experiments, 3 compounds were validated with an efficiency of greater than 50%, without more than 50% of cell toxicity (**Figure 31E**). Among these 3 compounds, only the Z molecule was able to significantly increase NAD⁺ by decreasing PARP-1 activity (**Figure 31F**).

Z treatment restores NAD⁺ levels and improves aortic disease

To confirm the beneficial effect of Z on NAD⁺ levels in VSMCs from *Lmna*^{G609G/G609G} mice, we quantified NAD⁺ levels after 48h treatment of Z (5 μM). Z treatment was sufficient to increase NAD⁺ compared with DMSO-treated VSMCs (**Figure 32A**). Also, Z treatment is able to restore NAD⁺ content at a level comparable with control VSMCs (**Figure 32A**). We next treated *Lmna*^{G609G/+} mice with Z starting at 4 weeks, for a 4 weeks duration treatment. *Lmna*^{G609G/+} mice developed accelerated aging associated phenotypes with a later onset and slowly disease progression compared with *Lmna*^{G609G/G609G} mice (Zaghini et al., 2020). We showed a significant increase in the media thickness of the aorta from *Lmna*^{G609G/+} mice treated with Z (**Figure 32B et 32C**). This was correlated with an increased number of VSMCs in media layer of Z-treated *Lmna*^{G609G/+} mice (**Figure 32D**).

DISCUSSION

Decreased VSMCs abundance and functionality is a hallmark of HGPS (Villa-Bellosta et al., 2013b). Because VSMCs play an important role in maintaining aortic

integrity, our current work provides insight into the mechanisms by which progerin expression leads to massive loss of VSMCs in HGPS.

Using *Lmna*^{G609G/G609G} knock-in mice that express progerin and recapitulates main clinical features of HGPS patients, we have reported for the first time an alteration of NAD⁺ content in VSMCs. NAD⁺ is known to play a major role in the regulation of many biological processes (Ansari and Raghava, 2010). It is now well-recognized that NAD⁺ levels progressively decrease during aging process in many study models such as yeast, mice as well as humans (Lin et al., 2002; Massudi et al., 2012; Zhang et al., 2016), contributing to altered homeostasis and increased disease vulnerability (Covarrubias et al., 2021). The decrease of NAD⁺ content in mice has been associated with hallmarks of aging such as mitochondrial defect, inflammation, DNA damage, signaling alterations, chromatin and epigenetics changes (Rajman et al., 2018). NAD⁺ has therefore emerged as a potential treatment targeting age-related disease (Covarrubias et al., 2021).

We speculated that NAD⁺ depletion in VSMCs from *Lmna*^{G609G/G609G} mice may play a similar role to NAD⁺ in physiological aging. It has been previously been shown in VSMCs differentiated from iPSCs derived from HGPS fibroblasts, that a decrease in PARP-1 activity leads to aberrant activation of non-homologous end-joining repair resulting in mitotic catastrophe and ultimately, cell death (Zhang et al., 2014b). These results are important since it allowed us to identify, increased PARylation through increased PARP-1 expression as the mechanism underlying the NAD⁺ depletion in VSMCs in *Lmna*^{G609G/G609G} mice.

Aortic wall degeneration in *Nampt* knock-out mice was associated to decreased VSMCs NAD⁺ levels and increased DNA damage (Watson et al., 2017). We have also identified a decreased *Nampt* expression and NAD⁺ drop in VSMCs from *Lmna*^{G609G/G609G} mice with aortic pathology suggesting an increase in DNA damages as described before. Increased DNA breaks was confirmed in VSMCs *Lmna*^{G609G/G609G} mice. This results is supported by a recent study in which VSMCs of elderly people, prelamin A expression may also increase DNA damage response through alteration of the nuclear import of the damage repair protein 53BP1 (Cobb et al., 2016). Moreover, persistent DNA damage response has been associated with prelamin A expression in VSMCs. Indeed, the accumulation of prelamin A leads to persistent DNA damage response induced by increased activity of ataxia-telangiectasia mutated (ATM) and ataxia-telangiectasia Rad3 (ATR) signaling (Liu et al., 2013c). These results support that progerin expression in

VSMCs leads to DNA damages inducing persistent DNA damage response by PARylation in order to repair this damage.

It is now well-recognized that cells with high genotoxic stress induced by DNA damage, has PARP-1 overactivation in order to repair DNA damage. As a result, decreased NAD⁺ levels leads to cell apoptosis (Curtin and Szabo, 2020b) which we showed increased in VSMCs from *Lmna*^{G609G/G609G} mice. The rescue of NAD⁺ cellular content by targeting PARP-1 activity in *Lmna* mutated VSMCs could be an interesting approach to normalize homeostasis. Recent studies showed that inhibition of NAD⁺ consumption by PARP inhibitors can significantly improve mouse health and lifespan. In a mouse model of Cockayne syndrome which is a premature aging syndrome, treatment with PARP-1 inhibitors promoted lifespan and decreased aging associated phenotypes (Scheibye-Knudsen et al., 2014). Collectively, these data suggests that PARP-1 could be a relevant target for the treatment of progeria. In this context, we used high-throughput screening in order to identify a potential compound for the treatment of *Lmna*^{G609G/G609G} mice. We identified Z as a molecule able to restore NAD⁺ levels through decrease of PARP-1 activity in VSMCs from *Lmna*^{G609G/G609G}. Moreover, the treatment of *Lmna*^{G609G/+} mice with Z was able to decreased loss of VSMCs confirming the direct link between PARylation and vascular pathology in progeria.

Currently, many potential therapeutical strategies for progeria have emerged (Guilbert et al., 2020). Also, genome and base editing approaches have been successfully developed *in vivo* (Kleinstiver et al., 2016; Beyret et al., 2019; Santiago-Fernández et al., 2019; Koblan et al., 2021). Given that progerin toxicity is induced by the farnesyl group, several molecules exist to inhibit the prenylation of progerin. Among them, lonafarnib, a farnesyl transferase inhibitor, is the first FDA-approved treatment to reduce mortality in HGPS (Dhillon, 2021; Gordon et al., 2018). Although many therapeutic strategies are still under investigation, it is now well-recognized that combination of therapies can have beneficial potentiating effects. Our study shows that compound Z, targeting PARylation, could be a treatment to improve vascular pathology in progeria. NAD⁺ boosting strategies have emerged to treat cardiovascular diseases (Heilbronn, 2017; Trammell et al., 2016). Moreover PARP-1 inhibitors such as olaparib, are commonly used in cancer treatment (Curtin and Szabo, 2020) confirming that PARP-1 inhibitors are good candidate for the treatment of pathologies. To confirm this, treatment of *Lmna*^{G609G/G609G} mice is required. In addition, survival studies of treated mice and body weight are also necessary. Positive

results after *Lmna*^{G609G/G609G} treated mice with Z, will allow development of treatments to reduce cardiovascular pathology in progeria or in aging in general.

In conclusion, this work aimed to address important issues that severely limit the understanding of premature ageing syndromes. We highlighted the role of PARylation in loss of VSMCs in the aorta of a mouse model of HGPS, resulting in development of the cardiovascular pathology. Our results show that *Lmna* mutation causing HGPS increased PARylation in VSMCs and inhibition of PARP-1 activity ameliorates vascular pathology. We identified a novel compound, Z, which counteracts the decreased of PARylation and allows the maintenance of VSMCs in aorta. Therefore, PARylation has emerged as an important target for the development of treatment to impede the cardiovascular pathology in HGPS patients.

MATERIELS AND METHODS

Mouse model. Knock-in mice model *Lmna*^{G609G/G609G} and *Lmna*^{G609G/+} carrying the *Lmna* c.1827C>T (p.Gly609Gly) mutation have been previously described (Osorio et al., 2011). Mice were fed chow and housed in a disease-free barrier facility with 12h light/12h dark cycles. Organs were isolated from mice at 4 or 5 months. All animal studies were approved by the French Ministry of Health at the Marseille medical genetics institute for the Care and Use of Experimental Animals.

In vivo Z treatment. 100mg/kg or 150mg/kg of Z (Selleckchem) were orally administrated to *Lmna*^{G609G/+} mice once a day in a piece of palatable food. The treatment duration was 1 month starting from 4 weeks of age, the day after, organs were isolated from mice.

VSMCs isolation and culture. Primary VSMCs were prepared from aorta of 4 weeks WT and *Lmna*^{G609G/G609G} mice following a protocol adapted from (Shimizu et al., 1995). After asphyxiate mouse with CO₂ for 2 minutes, heart was perfused through the apex with 1ml 1X sterile HBSS (Gibco). 2 aortas were pooled into the HBSS (Gibco) in 15ml conical in a cool place. Aortas were incubated at 37°C for 8-10 minutes with enzyme solution containing collagenase (1mg/ml) (Gibco), soybean trypsin inhibitor (1 mg/ml) (Gibco), elastase (0.744units/ml) (Gibco), 1% pen/strep (Gibco) and HBSS. Aortas were washed with DMEM/F12 (Gibco) media before removing endothelial cell layer. Aortas were incubated at 37°C in 5% CO₂ in the incubator for about an hour within enzyme solution. After centrifugation, cells were seeded on 3 wells of a 48 well dish DMEM/F12 (Gibco)

media. VSMCs were then cultured in DMEM/F12 (Gibco) media containing 10% fetal bovine serum (Gibco) and 1% pen/strep.

Fibroblast culture and reprogramming. HGPS Fibroblasts (8243) used in this study were isolated from a patient biopsy taken in the Assistance Publique Hôpitaux de Marseille during diagnostic procedures (referred as HGPS-VSMCs in this study) as previously described in (Lo Cicero et al., 2016b). Informed consents were obtained from the parents of the patient included in this study, complying with the ethical guidelines of the institutions involved and with the legislation requirements of the French ministry. The HGPS cell line explored in this study have been prepared and stored according to the French regulation by the labeled Biological Resource Center of Tissues, DNA, Cells (CRB TAC), Department of Medical Genetics, la Timone Hospital Marseille (Dr A De Sandre-Giovannoli and Mrs K. Bertaux). The fibroblast cell line used belong to a biological sample collection declared to the French ministry of Health whose use for research purposes was authorized by the French ministry of Health. Control cell line were used in this study. Cell line (4603) was provided by Coriell Cell Repository (Camden, USA) (referred as Ctrl-VSMCs in this study). Cells were obtained from the NINDS Human Genetics Resource Center DNA and Cell Line Repository. NINDS Repository sample numbers corresponding to the samples used are DM4603. Cultures were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium + GlutaMAX II + 4500mg/L D-Glucose (Gibco), supplemented with 20% fetal bovine serum (research grade, Sigma) and 1% sodium pyruvate 100mM (Life technologies). Cell cultures were maintained at 37 °C, in 5% CO₂ in a humidified atmosphere, with the media changed every 2 days. Fibroblasts from the two cell lines were reprogrammed into iPS cells using Yamanaka's original method (Takahashi and Yamanaka, 2006) with OCT4, KLF4, SOX2, c-myc, and transferred using retroviral vectors.

Differentiation of iPSCs on VSMCs. Control and HGPS iPSCs were grown in colonies seeded at 30,000 cells/cm² and grown as previously described (Lo Cicero et al., 2016b). VSMCs differentiation of iPSCs was performed using embryoid body (EB) formation. EBs were cultured for 10 days at 37°C, in 5% CO₂ in a humidified atmosphere, with changing the media every 2 days. CD34⁺ cells were isolated from EBs on day 10. The percentage of CD34⁺ cells in EBs was between 0.4% and 1.5%. Isolated cells were grown on 24-well plates (~30,000 cells/cm²) coated with 0.1% gelatin, in the presence of endothelial growth medium-2 (EGM-2, Lonza) supplemented with PDGFBB (50ng/mL, Preprotech).

After 4 passages, the medium was replaced with Smooth Muscle Growth Medium-2 (SmGM-2) (Lonza CC-3182) for 4 additional passages. Cell cultures were maintained at 37 °C, in 5% CO₂ in a humidified atmosphere, with the media changed every 2 days.

Immunoblotting. For protein extraction, tissues were isolated at 4-5 months or whole-cell lysates were added in FastPrep tubes (MP Biomedicals) with 300µl of lysis buffer (Cell Signalling). After 5 FastPrep cycles, samples were centrifuged and the supernatant were then collected. The lysates were separated by 10% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and transferred to 0.45µm nitrocellulose membranes (Invitrogen). Blotted membranes being were blocked in 5% bovine serum albumin (BSA) in Tris-buffered saline containing 1% Tween 20 (TBS-T) for 1 h at room temperature followed by incubation overnight at 4°C with the appropriate primary antibody ([Table 5](#)). After washing with TBS-T, membranes were for 1h at room temperature incubated with secondary anti-rabbit or anti-mouse antibodies conjugated to a fluorescent dye ([Table 5](#)). Subsequent to being washed with TBS-T the signal was revealed using ChemiDoc MP Imaging System (Biorad). Bands were quantified using Image J software.

Immunofluorescence and histology. Tissues were isolated at 4-5 months and were embedded in Tragacanth (Sigma) before being frozen and sectioned (10µm) with cryostat (Leica) for staining. Sections or cells were fixed in 4% formaldehyde (Electron Microscopy Sciences) stained with H&E (Biogents). For immunostaining, samples were incubated in blocking solution containing (5% Goat Serum + 1%BSA + 0.2% Triton). Primary antibodies ([Table 6](#)) were incubated overnight at 4°C in blocking solution. After washing with PBS (Gibco), samples were incubated with secondary antibodies ([Table 6](#)) and Hoechst (Invitrogen) for 1h at room temperature. Slices were mounted in Fluorescence Mounting Medium (Dako). Immunostained slices were scanned with confocal microscope (Prime95 camera). Data, quantification of bands analysis was performed by ImageJ software.

TUNEL assay. TUNEL staining were performed using a TUNEL cell detection kit (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany) according to the manufacturer's protocol. Tissues were isolated at 4-5 months and were embedded in Tragacanth (Sigma) before being frozen and sectioned (10µm) with cryostat (Leica) for staining. Aorta cross sections were exposed to a medium containing 125µM neomycin and 500µM sodium selenite for 1 h. Slices were then washed with PBS and fixed in 4% paraformaldehyde before being

incubated with 50µL of TUNEL reaction mixture (TdT and fluorescein-dUTP) at 37°C for 60 minutes in a humid atmosphere. The TUNEL intensity within aorta cross sections was examined with confocal microscope (Prime95 camera).

NAD⁺ concentration quantification. VSMCs were homogenized and processed according to previous report (Sander et al., 1976). The concentration of NAD⁺ was determined using a spectrophotometric assay as described previously (Bernofsky and Swan, 1973). Absorption measurements were carried out in 96-well plates by spectrophotometry (Tecan).

Comet assay. Comet assay were performed according to instructions provided with the OxiSelect Comet Assay Kit (Cell Biolabs). Cells were lysed for 30 minutes at 4°C, immersed in 1x TBE buffer for 15 minutes, and electrophoresis was performed at neutral pH at 1V/cm (measured electrode to electrode) for 30 minutes. Slides were immersed in H₂O for 5 minutes, 70% ethanol for 5 minutes, and dried at room temperature overnight. Samples were then stained with SYBR Green and imaged with a confocal microscope. DNA damage was assessed by measuring comet tail length using OpenComet software (v1.3.1).

Measure of PARP1 activity. Measure of PARP1 was performed following the PARP1 Chemiluminescent Assay Kit (Trevigen). According to the manufacturer's protocol, 50µl of histone solution were added to each well of a 96-well plate and incubate at room temperature for 30 minutes. After 3 PBST buffer washes, the liquid excess was removed onto clean paper towel. Each well was blocked at room temperature for 60-90 minutes with blocking buffer to every well. After 3 PBST buffer washes, the liquid excess was removed onto clean paper towel. The diluted PARP enzyme was prepared according to the manufacturer's protocol and 0.5 Unit were added to every well. 5µl of Inhibitor solution were added for "test Inhibitor" and 5µl of the same solution without inhibitor were added for the "positive control" in triplicates. Reaction was initiated by adding 25µl of diluted PARP1 enzyme to the wells designated and incubated at room temperature for 1 hour after adding X, Y and Z molecules designated well. Reaction mixture after 1 hour was discarded and plate was three times washed with PBST. 50µl of diluted Streptavidin-HRP were added to each well for 30 minutes at room temperature. After 3 washes with PBST, 100µl of the colorimetric HRP substrate were added to each well and the plate was incubated at the room temperature until blue color is developed in the positive control

well (about 15~20 minutes) to fully develop the color. The chemiluminescence was measured using microplate reader (BMG Lab - Clariostar).

β -galactosidase staining. β -galactosidase staining was performed following the Senescence Detection Kit protocol (Sigma-Aldrich). The assay is based on a histochemical stain for senescence-associated β -galactosidase (β -gal) activity at pH 6. VSMCs were washed in 1 \times PBS and incubated with fixation buffer 7 minutes at room temperature. Staining solution was prepared with stock X-gal solution according to the manufacturer's protocol and added to each sample. Samples were incubated during 20 hours at 37 °C without CO₂. Cells were then rinsed with PBS and counterstained with Eosin (Sigma-Aldrich) during 8 minutes. Cells were viewed under a light confocal microscope and cells stained with blue were counted as senescent.

High throughput screening. High-throughput screening was conducted using CLARIOstar Plate Reader (BMG Labtech). VSMCs-HGPS were seeded in 38 μ l of culture medium in duplicate into white 384-well plates and black 384-well clear bottom plates. Before treatment and then each days, images of each plate were done in order to control cell seeding and viability. One day after seeding, 5 μ M of compounds from chemical libraries were transferred in monoplicate into cell assay plates. In each plate, negative control (0.1% DMSO) and positive control (1 μ M FK 866) were added in columns 1–23 and 2–24, respectively. Plates were then incubated for 2 days and processed for NAD⁺+NADH quantification with NAD/NADH-Glo assayTM from Promega. To prevent the discovery of toxic molecules, the cell number was quantified in parallel by counting Hoechst-stained cells per well and candidates showing mortality superior to 55% were excluded.

Statistical analyses Average, s.e.m and statistical significance were calculated by unpaired Student's *t*-test, Mann-Whitney-Wilcoxon Test, one-way ANOVA or Kruskal-Wallis one-way ANOVA using GraphPad Prism. *P*-values are indicated above columns.

BIBLIOGRAPHY

- Anderson, R.M., Bitterman, K.J., Wood, J.G., Medvedik, O., and Sinclair, D.A. (2003). Nicotinamide and PNC1 govern lifespan extension by calorie restriction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* 423, 181–185.
- Ansari, H.R., and Raghava, G.P.S. (2010). Identification of NAD interacting residues in proteins. *BMC Bioinformatics* 11, 160.

- Beyret, E., Liao, H.-K., Yamamoto, M., Hernandez-Benitez, R., Fu, Y., Erikson, G., Reddy, P., and Izpisua Belmonte, J.C. (2019). Single-dose CRISPR-Cas9 therapy extends lifespan of mice with Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Nat Med* 25, 419–422.
- Bieganowski, P., and Brenner, C. (2004). Discoveries of nicotinamide riboside as a nutrient and conserved NRK genes establish a Preiss-Handler independent route to NAD⁺ in fungi and humans. *Cell* 117, 495–502.
- Cardoso, D., and Muchir, A. (2020). Need for NAD⁺: Focus on Striated Muscle Laminopathies. *Cells* 9, E2248.
- Carrero, D., Soria-Valles, C., and López-Otín, C. (2016). Hallmarks of progeroid syndromes: lessons from mice and reprogrammed cells. *Dis Model Mech* 9, 719–735.
- Chambon, P., Weill, J.D., and Mandel, P. (1963). Nicotinamide mononucleotide activation of new DNA-dependent polyadenylic acid synthesizing nuclear enzyme. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 11, 39–43.
- Cobb, A.M., Larrieu, D., Warren, D.T., Liu, Y., Srivastava, S., Smith, A.J.O., Bowater, R.P., Jackson, S.P., and Shanahan, C.M. (2016). Prelamin A impairs 53BP1 nuclear entry by mislocalizing NUP153 and disrupting the Ran gradient. *Aging Cell* 15, 1039–1050.
- Covarrubias, A.J., Perrone, R., Grozio, A., and Verdin, E. (2021). NAD⁺ metabolism and its roles in cellular processes during ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 22, 119–141.
- Curtin, N.J., and Szabo, C. (2020). Poly(ADP-ribose) polymerase inhibition: past, present and future. *Nat Rev Drug Discov* 19, 711–736.
- De Sandre-Giovannoli, A., Bernard, R., Cau, P., Navarro, C., Amiel, J., Boccaccio, I., Lyonnet, S., Stewart, C.L., Munnich, A., Le Merrer, M., et al. (2003). Lamin a truncation in Hutchinson-Gilford progeria. *Science* 300, 2055.
- Dhillon, S. (2021). Lonafarnib: First Approval. *Drugs* 81, 283–289.
- 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.
- Gordon, L.B., Massaro, J., D’Agostino, R.B., Campbell, S.E., Brazier, J., Brown, W.T., Kleinman, M.E., Kieran, M.W., and Progeria Clinical Trials Collaborative (2014). Impact of farnesylation inhibitors on survival in Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Circulation* 130, 27–34.
- Gordon, L.B., Shappell, H., Massaro, J., D’Agostino, R.B., Brazier, J., Campbell, S.E., Kleinman, M.E., and Kieran, M.W. (2018). Association of Lonafarnib Treatment vs No Treatment With Mortality Rate in Patients With Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome. *JAMA* 319, 1687–1695.
- Guilbert, S.M., Cardoso, D., Lévy, N., Muchir, A., and Nissan, X. (2020). Hutchinson-Gilford progeria syndrome: Rejuvenating old drugs to fight accelerated ageing. *Methods*.
- Heilbronn, L.K. (2017). Clinical Trials Corner. *Nutr Healthy Aging* 4, 193–194.
- Kim, P.H., Luu, J., Heizer, P., Tu, Y., Weston, T.A., Chen, N., Lim, C., Li, R.L., Lin, P.-Y., Dunn, J.C.Y., et al. (2018). Disrupting the LINC complex in smooth muscle cells reduces aortic disease in a mouse model of Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Sci Transl Med* 10, eaat7163.

- Kleinstiver, B.P., Pattanayak, V., Prew, M.S., Tsai, S.Q., Nguyen, N.T., Zheng, Z., and Joung, J.K. (2016). High-fidelity CRISPR-Cas9 nucleases with no detectable genome-wide off-target effects. *Nature* 529, 490–495.
- Koblan, L.W., Erdos, M.R., Wilson, C., Cabral, W.A., Levy, J.M., Xiong, Z.-M., Tavares, U.L., Davison, L.M., Gete, Y.G., Mao, X., et al. (2021). In vivo base editing rescues Hutchinson-Gilford progeria syndrome in mice. *Nature* 589, 608–614.
- Lin, F., and Worman, H.J. (1993). Structural organization of the human gene encoding nuclear lamin A and nuclear lamin C. *J Biol Chem* 268, 16321–16326.
- Lin, S.-J., Kaeberlein, M., Andalis, A.A., Sturtz, L.A., Defossez, P.-A., Culotta, V.C., Fink, G.R., and Guarente, L. (2002). Calorie restriction extends *Saccharomyces cerevisiae* lifespan by increasing respiration. *Nature* 418, 344–348.
- Liu, Y., Drozdov, I., Shroff, R., Beltran, L.E., and Shanahan, C.M. (2013). Prelamin A accelerates vascular calcification via activation of the DNA damage response and senescence-associated secretory phenotype in vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 112, e99-109.
- Lo Cicero, A., Jaskowiak, A.-L., Egesipe, A.-L., Tournois, J., Brinon, B., Pitrez, P.R., Ferreira, L., de Sandre-Giovannoli, A., Levy, N., and Nissan, X. (2016). A High Throughput Phenotypic Screening reveals compounds that counteract premature osteogenic differentiation of HGPS iPS-derived mesenchymal stem cells. *Sci Rep* 6, 34798.
- Magni, G., Amici, A., Emanuelli, M., Raffaelli, N., and Ruggieri, S. (1999). Enzymology of NAD⁺ synthesis. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 73, 135–182, xi.
- Massudi, H., Grant, R., Braidy, N., Guest, J., Farnsworth, B., and Guillemin, G.J. (2012). Age-associated changes in oxidative stress and NAD⁺ metabolism in human tissue. *PLoS One* 7, e42357.
- Nigg, E.A., Kitten, G.T., and Vorburger, K. (1992). Targeting lamin proteins to the nuclear envelope: the role of CaaX box modifications. *Biochem Soc Trans* 20, 500–504.
- Olive, M., Harten, I., Mitchell, R., Beers, J.K., Djabali, K., Cao, K., Erdos, M.R., Blair, C., Funke, B., Smoot, L., et al. (2010). Cardiovascular pathology in Hutchinson-Gilford progeria: correlation with the vascular pathology of aging. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 30, 2301–2309.
- Osorio, F.G., Navarro, C.L., Cadiñanos, J., López-Mejía, I.C., Quirós, P.M., Bartoli, C., Rivera, J., Tazi, J., Guzmán, G., Varela, I., et al. (2011). Splicing-directed therapy in a new mouse model of human accelerated aging. *Sci Transl Med* 3, 106ra107.
- Pitrez, P.R., Estronca, L., Monteiro, L.M., Colell, G., Vazão, H., Santinha, D., Harhour, K., Thornton, D., Navarro, C., Egesipe, A.-L., et al. (2020). Vulnerability of progeroid smooth muscle cells to biomechanical forces is mediated by MMP13. *Nat Commun* 11, 4110.
- Rajman, L., Chwalek, K., and Sinclair, D.A. (2018). Therapeutic Potential of NAD-Boosting Molecules: The In Vivo Evidence. *Cell Metab* 27, 529–547.
- Revollo, J.R., Grimm, A.A., and Imai, S. (2004). The NAD biosynthesis pathway mediated by nicotinamide phosphoribosyltransferase regulates Sir2 activity in mammalian cells. *J Biol Chem* 279, 50754–50763.
- Santiago-Fernández, O., Osorio, F.G., Quesada, V., Rodríguez, F., Basso, S., Maeso, D., Rolas, L., Barkaway, A., Nourshargh, S., Folgueras, A.R., et al. (2019). Development of a

- CRISPR/Cas9-based therapy for Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Nat Med* 25, 423–426.
- Scheibye-Knudsen, M., Mitchell, S.J., Fang, E.F., Iyama, T., Ward, T., Wang, J., Dunn, C.A., Singh, N., Veith, S., Hasan-Olive, M.M., et al. (2014). A high-fat diet and NAD(+) activate Sirt1 to rescue premature aging in cockayne syndrome. *Cell Metab* 20, 840–855.
- Shimizu, R.T., Blank, R.S., Jervis, R., Lawrenz-Smith, S.C., and Owens, G.K. (1995). The smooth muscle alpha-actin gene promoter is differentially regulated in smooth muscle versus non-smooth muscle cells. *J Biol Chem* 270, 7631–7643.
- Stehbens, W.E., Wakefield, S.J., Gilbert-Barnes, E., Olson, R.E., and Ackerman, J. (1999). Histological and ultrastructural features of atherosclerosis in progeria. *Cardiovasc Pathol* 8, 29–39.
- Stehbens, W.E., Delahunt, B., Shozawa, T., and Gilbert-Barnes, E. (2001). Smooth muscle cell depletion and collagen types in progeric arteries. *Cardiovasc Pathol* 10, 133–136.
- 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.
- Trammell, S.A.J., Schmidt, M.S., Weidemann, B.J., Redpath, P., Jaksch, F., Dellinger, R.W., Li, Z., Abel, E.D., Migaud, M.E., and Brenner, C. (2016). Nicotinamide riboside is uniquely and orally bioavailable in mice and humans. *Nat Commun* 7, 12948.
- Varga, R., Eriksson, M., Erdos, M.R., Olive, M., Harten, I., Kolodgie, F., Capell, B.C., Cheng, J., Faddah, D., Perkins, S., et al. (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.
- Villa-Bellosta, R., Rivera-Torres, J., Osorio, F.G., Acín-Pérez, R., Enriquez, J.A., López-Otín, C., and Andrés, 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.
- Watson, A., Nong, Z., Yin, H., O’Neil, C., Fox, S., Balint, B., Guo, L., Leo, O., Chu, M.W.A., Gros, R., et al. (2017). Nicotinamide Phosphoribosyltransferase in Smooth Muscle Cells Maintains Genome Integrity, Resists Aortic Medial Degeneration, and Is Suppressed in Human Thoracic Aortic Aneurysm Disease. *Circ Res* 120, 1889–1902.
- Zaghini, A., Sarli, G., Barboni, C., Sanapo, M., Pellegrino, V., Diana, A., Linta, N., Rambaldi, J., D’Apice, M.R., Murdocca, M., et al. (2020). Long term breeding of the Lmna G609G progeric mouse: Characterization of homozygous and heterozygous models. *Exp Gerontol* 130, 110784.
- Zhang, H., Xiong, Z.-M., and Cao, K. (2014). Mechanisms controlling the smooth muscle cell death in progeria via down-regulation of poly(ADP-ribose) polymerase 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111, E2261–2270.
- Zhang, H., Ryu, D., Wu, Y., Gariani, K., Wang, X., Luan, P., D’Amico, D., Ropelle, E.R., Lutolf, M.P., Aebersold, R., et al. (2016). NAD+ repletion improves mitochondrial and stem cell function and enhances life span in mice. *Science* 352, 1436–1443.

FIGURES

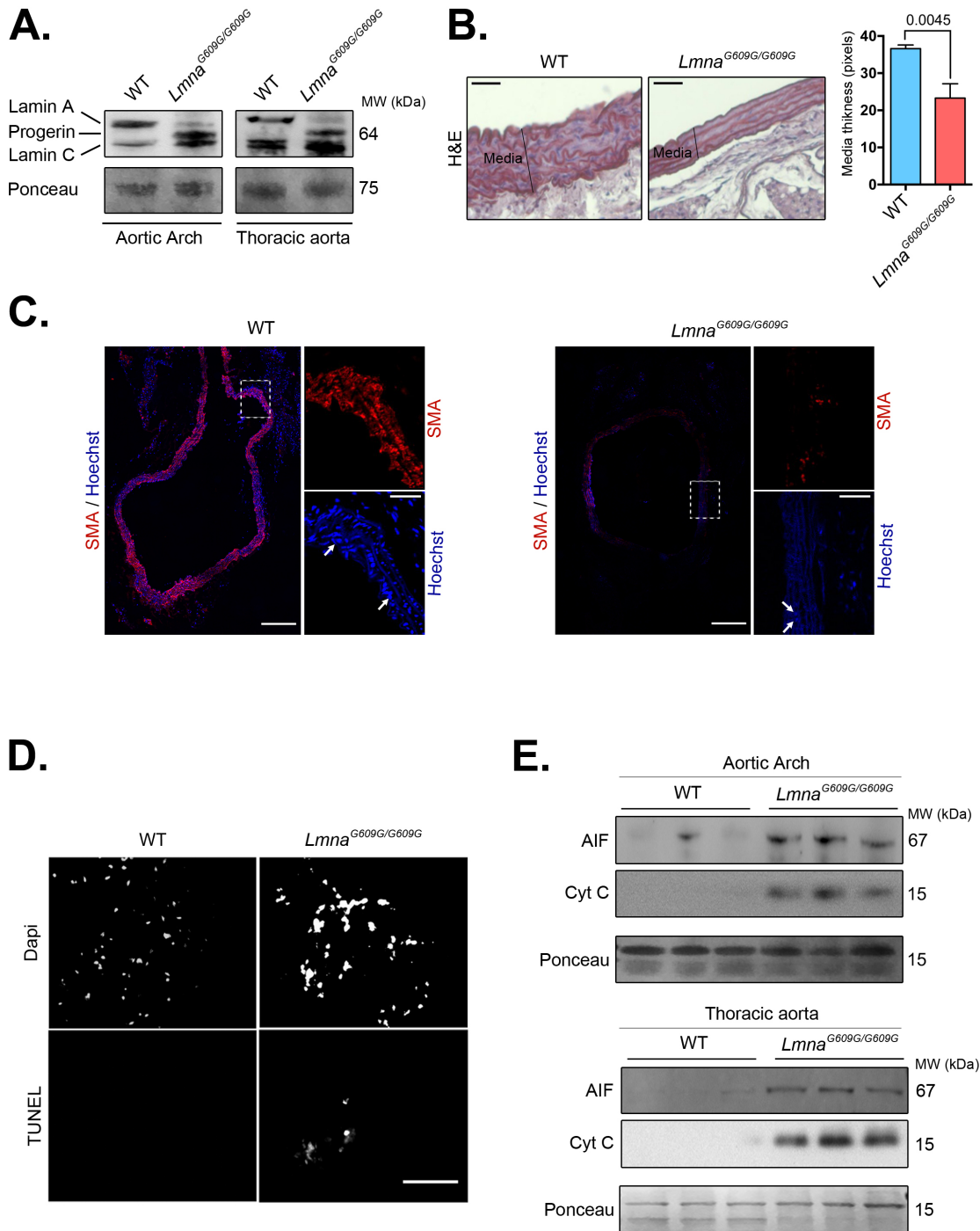


Figure 28 : Increased aortic cell death in *Lmna*^{G609G/G609G} mice

(A) Immunoblots showing lamin A, progerin and lamin C protein levels in aortic arch and thoracic aorta from *Lmna*^{G609G/G609G} and WT mice. Ponceau was used for normalization. (B) Representative aorta cross sections from *Lmna*^{G609G/G609G} and WT mice stained with hematoxylin & eosin (H&E). Scale bar, 20µm. Graph show media thickness quantification in *Lmna*^{G609G/G609G} (n = 3) and WT (n = 3) mice. Bars indicate mean ± standard error of mean and numbers above columns indicate P-values. Differences were analyzed by unpaired t-test. (C) Immunostaining of aorta cross sections from *Lmna*^{G609G/G609G} and WT mice showing SMA (Red) and Nuclei stained with Hoechst (Blue). The white arrows point

to VSMCs nuclei. Left scale bars, 200 μ m and right scale bars, 40 μ m. **(D)** TUNEL staining of aorta cross sections from *Lmna*^{G609G/G609G} and WT mice showing apoptotic cells (white). Scale bar, 20 μ m. **(E)** Immunoblots showing AIF and CytC protein levels in aortic arch and thoracic aorta from *Lmna*^{G609G/G609G} and WT mice. Ponceau was used for normalization.

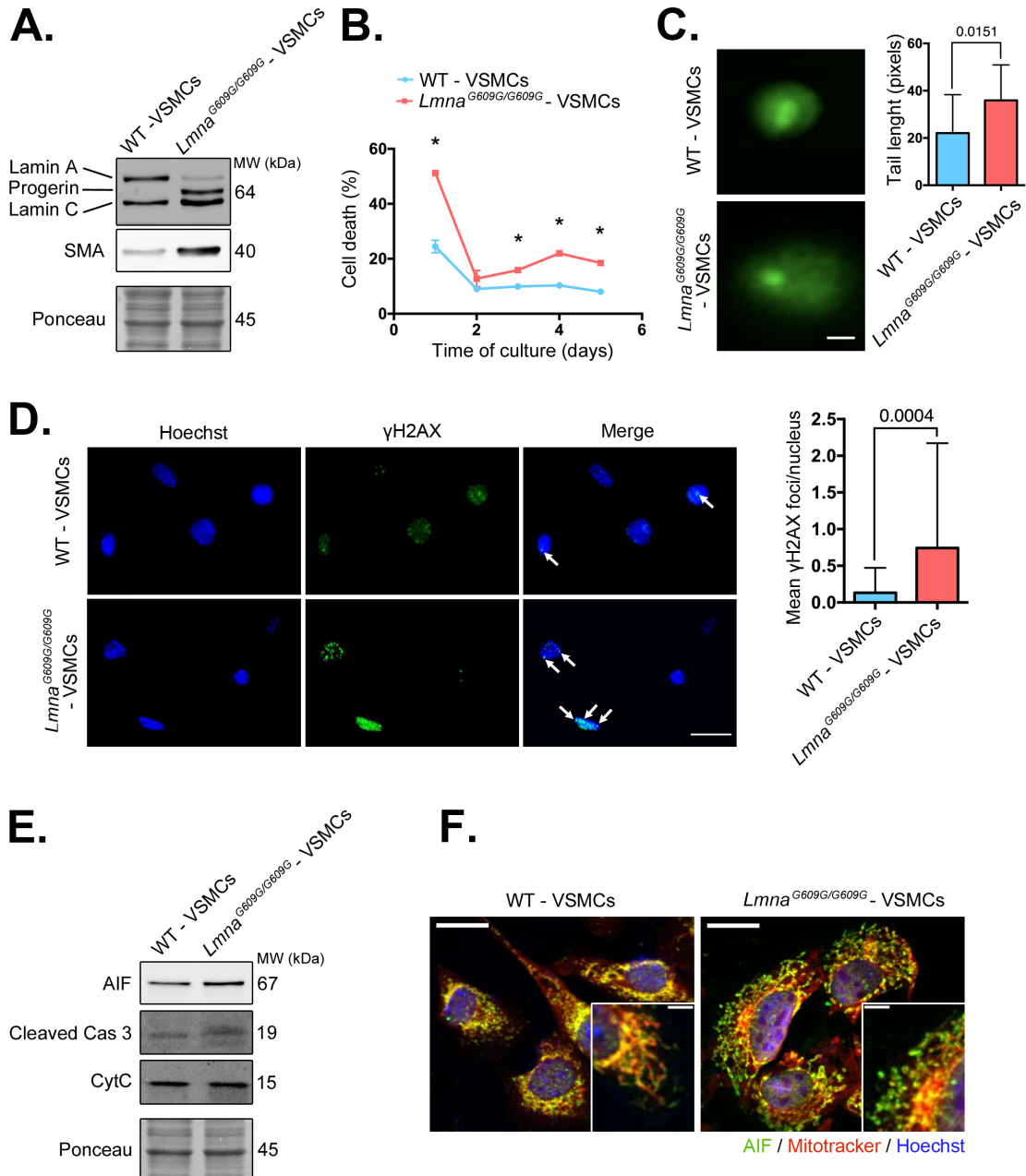


Figure 29 : Increased apoptosis of cultured VSMCs from *Lmna*^{G609G/G609G}

(A) Immunoblots showing lamin A, progerin, lamin C and SMA protein levels in isolated VSMCs from *Lmna*^{G609G/G609G} (*Lmna*^{G609G/G609G}-VSMCs) and WT mice (WT-VSMCs). Ponceau was used for normalization. **(B)** Percentage of cell death curves of *Lmna*^{G609G/G609G}-VSMCs (n=2) (Red) and WT-VSMCs (n=2) (Blue). Differences were analyzed by Kruskal-Wallis test, **P*<0.02. **(C)** Images of comets assay for *Lmna*^{G609G/G609G}-VSMCs and WT mice WT-VSMCs. Scale bars, 40 μ m. Graph shows tail length quantification in *Lmna*^{G609G/G609G}-VSMCs (n=2) and WT-VSMCs (n=2). Bars indicate mean \pm standard error of mean and numbers

above columns indicate P-values. Differences were analyzed by Wilcoxon-Mann-Whitney. **(D)** Immunostaining of *Lmna*^{G609G/G609G}-VSMCs and WT-VSMCs showing γ H2Ax foci (Green) and Nuclei were stained with Hoechst (Blue). Scale bars, 40 μ m). Graph shows mean of γ H2Ax foci per nucleus in *Lmna*^{G609G/G609G}-VSMCs (n=2) and WT-VSMCs (n=2). Bars indicate mean \pm standard error of mean and numbers above columns indicate P-values. Differences were analyzed by Wilcoxon-Mann-Whitney. **(E)** Immunoblots showing AIF, Cleaved Cas 3 and Cyt C protein levels in *Lmna*^{G609G/G609G}-VSMCs and WT-VSMCs. Ponceau was used for normalization. **(F)** Immunostaining of *Lmna*^{G609G/G609G}-VSMCs and WT-VSMCs showing AIF (Green), Mitochondria and Nuclei were stained with Mitotracker (Red) and Hoechst (Blue) respectively. Upper scale bars, 40 μ m and down scale bars, 10 μ m.

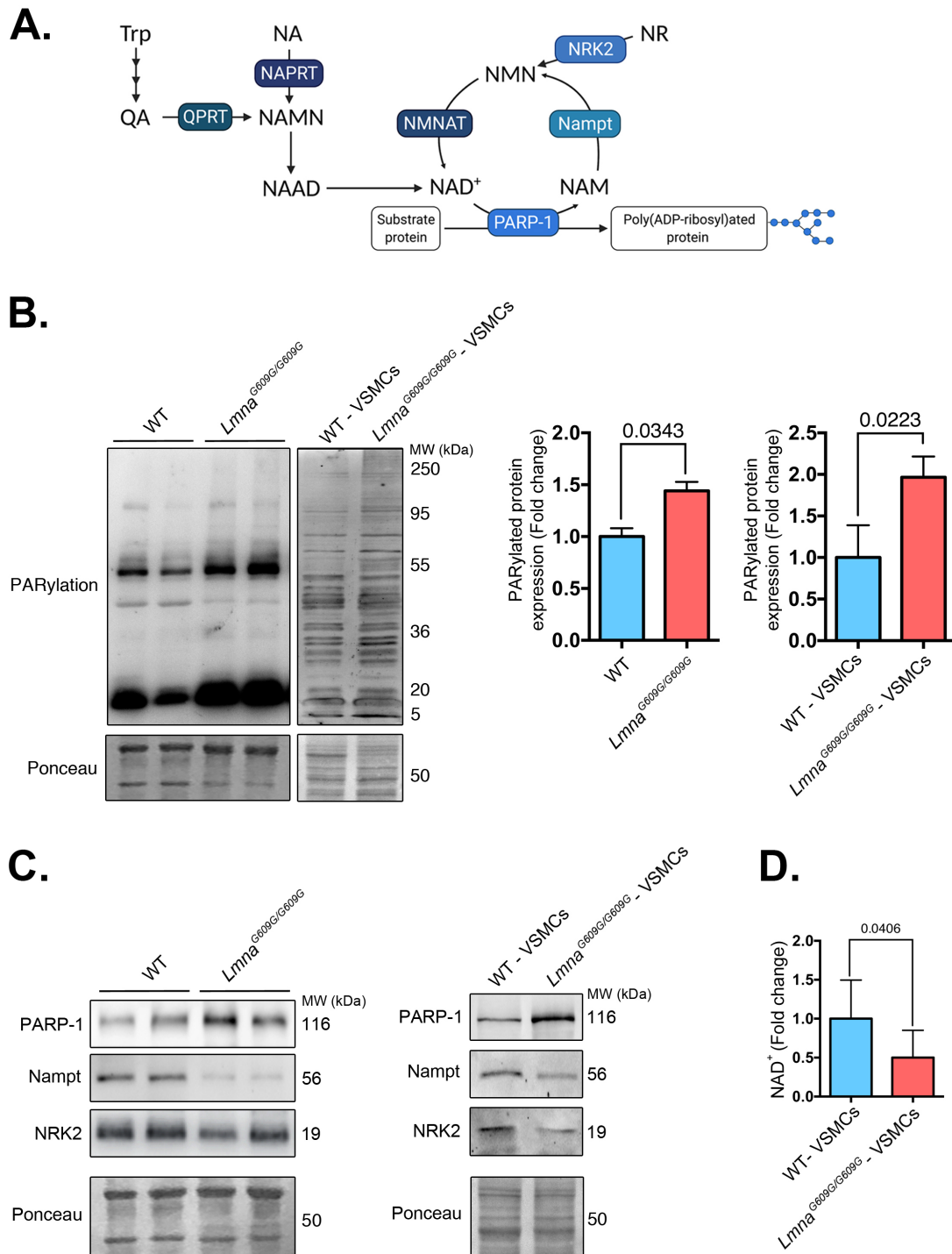


Figure 30 : Increased Global Poly(ADP-ribosylation) participates in altered NAD⁺ metabolism in *Lmna*^{G609G/G609G} models

(A) schematic representation of the NAD⁺ biosynthesis. (B) Immunoblots showing total PARylated protein level expression with PAR antibody (Fold change) in aorta from *Lmna*^{G609G/G609G} mice (n=3), WT mice (n=3), *Lmna*^{G609G/G609G}-VSMCs (n=3) and WT-VSMCs (n=3). Ponceau was shown as loading control. The bar graphs represent PARylated protein relative expression (mean ± standard error of means and numbers above columns indicate P-values) (relative to ponceau). Differences were analyzed by unpaired t-test. (C) Immunoblots showing PARP-1, Nampt and NRK2 protein level in aorta from *Lmna*^{G609G/G609G} mice (n=3), WT mice (n=3), *Lmna*^{G609G/G609G}-VSMCs (n=3) and WT-VSMCs

2.1 Altération de la PARYlation dans la progéria : impact sur la physiopathologie vasculaire

(n=3). Ponceau was shown as loading control. **(D)** Quantification of NAD⁺ content (fold change) in *Lmna*^{G609G/G609G}-VSMCs (n=3) and WT-VSMCs (n=3). Bars indicate mean ± standard error of mean and numbers above columns indicate P-values. Differences were analyzed by unpaired t-test.

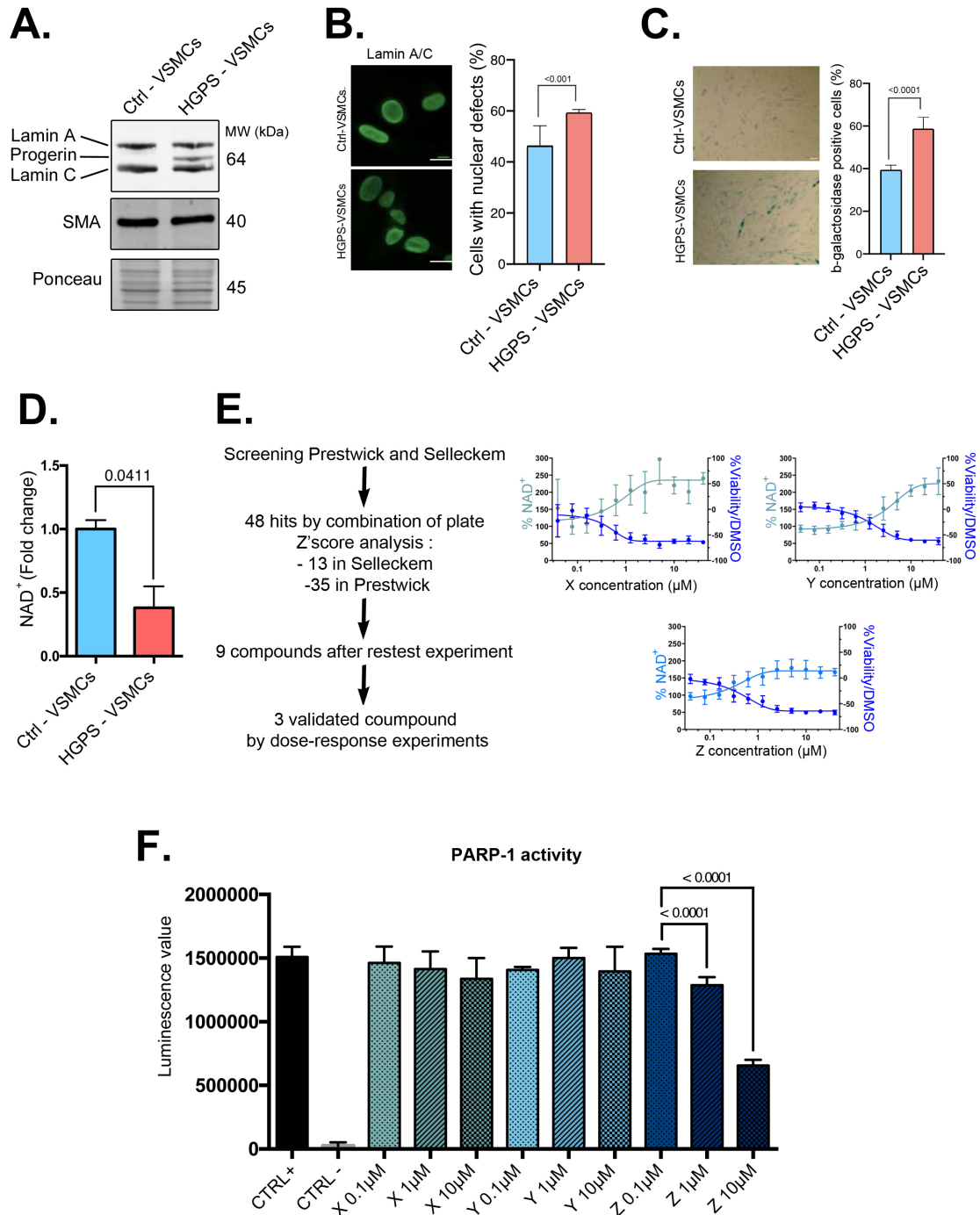


Figure 31 : High-throughput screening of on HGPS-VSMCs allows Z identification for treatment *Lmna*^{G609G/G609G} models

(A) Immunoblots showing lamin A, progerin, lamin C and SMA protein levels in VSMCs derived from HGPS iPSCs patients. Ponceau was used for normalization. **(B)** Immunostaining of HGPS-VSMCs and Ctrl-VSMCs showing lamin A/C (Green). Scale bars, 10µm. Graph shows percentage of cells with nuclear defects in HGPS-VSMCs (n=3) and

Ctrl-VSMCs (n=3). Bars indicate mean \pm standard error of mean and numbers above columns indicate P-values. Differences were analyzed by unpaired t-test. **(C)** β -galactosidase staining of HGPS-VSMCs and Ctrl-VSMCs showing senescent cells. Scale bars, 40 μ m. Graph shows percentage of β -galactosidase positive HGPS-VSMCs (n=3) and Ctrl-VSMCs (n=3). Bars indicate mean \pm standard error of mean and numbers above columns indicate P-values. Differences were analyzed by unpaired t-test. **(D)** Quantification of NAD⁺ content (fold change) in HGPS-VSMCs (n=3) and Ctrl-VSMCs (n=3). Bars indicate mean \pm standard error of mean and numbers above columns indicate P-values. Differences were analyzed by unpaired t-test. **(E)** Primary screen cell-based assay. Dot plot representation of the effects of the library compounds on NAD⁺ quantification, normalized to negative control and cell viability. **(F)** PARP-1 activity after different concentrations of X, Y or Z treatment (n=3 for each condition). Bars indicate mean \pm standard error of mean and numbers above columns indicate P-values. Differences were analyzed by one-way ANOVA.

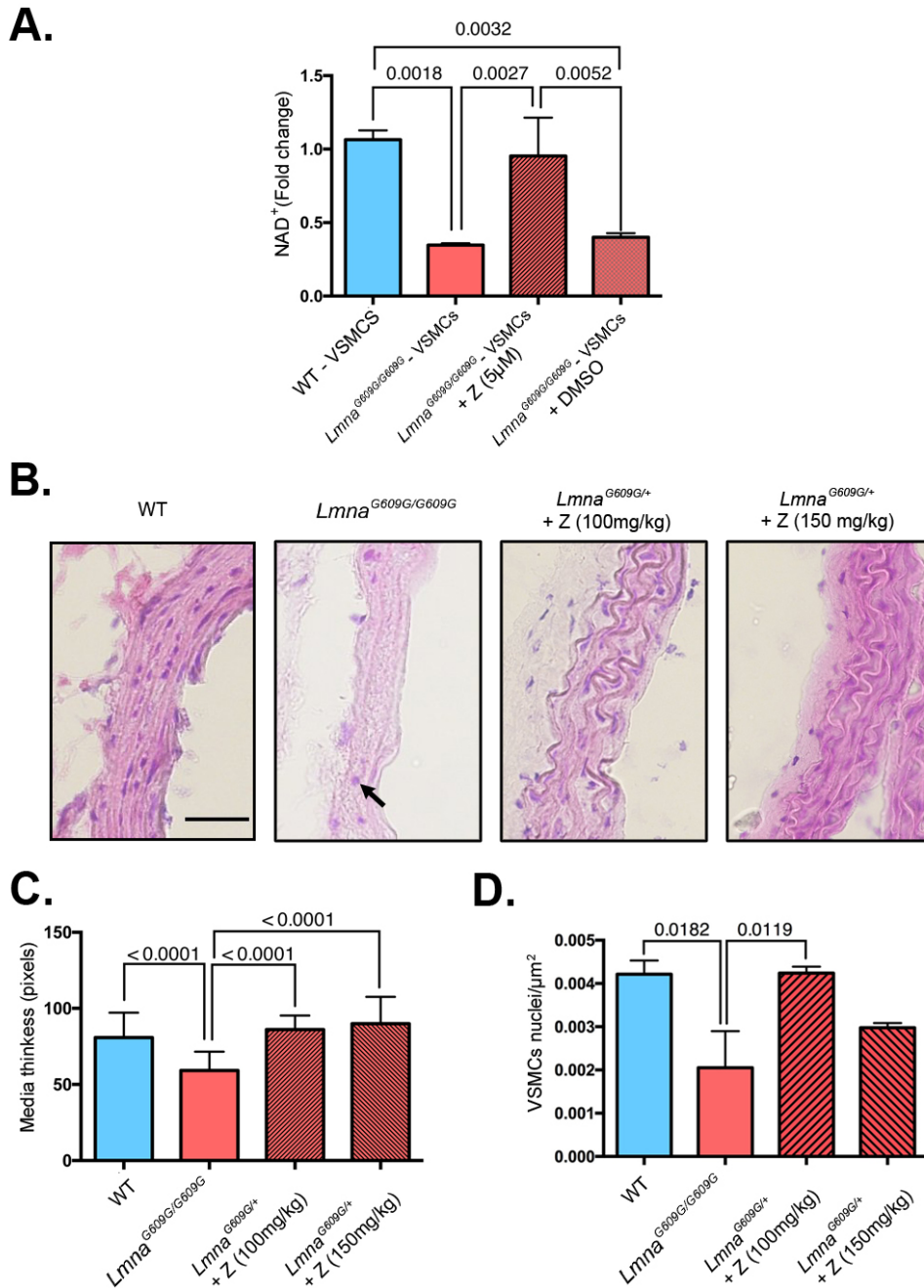


Figure 32 : Z treatment restores NAD⁺ levels and improves aortic disease

(A) Quantification of NAD⁺ content (fold change) in WT-VSMC (n=2), *Lmna*^{G609G/G609G} - VSMCs (n=2) and *Lmna*^{G609G/G609G} -VSMCs treated with either Z (5μM) (n=2) or DMSO (n=2). Bars indicate mean ± standard error of mean and numbers above columns indicate P-values. Differences were analyzed by Kruskal–Wallis test. (B) Representative aorta cross sections from *Lmna*^{G609G/G609G}, WT and *Lmna*^{G609G/+} mice treated with either 100mg/kg or 150mg/kg of Z. Scale bar, 40μm. Black arrows point to VSMCs nuclei. (C) Media thickness quantification in *Lmna*^{G609G/G609G} (n = 3), WT (n = 3) and *Lmna*^{G609G/+} mice treated with either 100mg/kg (n = 2) or 150mg/kg of Z (n = 2). Bars indicate mean ± standard error of mean and numbers above columns indicate P-values. Differences were analyzed by ANOVA multiple comparison. (D) VSMCs nuclei quantification in *Lmna*^{G609G/G609G} (n = 3), WT (n = 3) and *Lmna*^{G609G/+} mice treated with either 100mg/kg (n = 2) or 150mg/kg of Z (n = 2) . Bars indicate mean ± standard error of mean and numbers

above columns indicate P-values. Differences were analyzed by ANOVA multiple comparison.

SUPPLEMENTARY

Supplementary Materials and Methods

Antibody	Provider	Reference	Dilution
AIF (Rabbit)	Abcam	ab32516	1/1000
Cytochrome C (Mouse)	Abcam	Ab13575	1/1000
Nampt (Rabbit)	Abcam	#ab4580	1/1000
Nrk2 (Rabbit)	US Biological	#037146	1/1000
PAR (Mouse)	EM Millipore	AM80	1/1000
PARP-1(Rabbit)	Santa Cruz Biotechnology	#sc-8007	1/1000
SMA (Rabbit)	GenTex	GTX100034	1/1000
Goat Anti-Mouse IgG StarBright Blue 520	Bio-Rad	#12005866	1/1000
Goat Anti-Rabbit IgG StarBright Blue 520	Bio-Rad	#12004161	1/1000

Table 5 : Antibodies used for western blotting

Antibody	Provider	Reference	Dilution
P-Histone H2AX S139 (γ H2AX)(Rabbit)	Cell Signaling	2577S	1/500
Lamin A/C (E-1) (Mouse)	Santa Cruz Biotechnology	SC-376248	1/500
Mitotracker Red CMXRos	Invitrogen	M7512	300nM
SMA (Mouse)	Sigma	A5228	1/500
Alexa Fluro 488 goat anti-rabbit IgG (H+L)	Invitrogen	A11008	1/1000
Alexa Fluro 546 goat anti-mouse IgG (H+L)	Invitrogen	A11003	1/1000
Alexa Fluro 546 goat anti-mouse IgG2a (γ 2a)	Invitrogen	A21133	1/1000

Table 6 : Antibodies used for immunofluorescence

2.1.3. Données complémentaires

Cette partie a pour objectif de présenter les résultats obtenus au cours de mon projet de thèse qui n'ont pas été intégrés à l'article n°1 (cf. page 109) : (A) Résultats complémentaires. Tout d'abord, les données supplémentaires concernant la caractérisation du modèle VSMCs WT ou *Lmna*^{G609G/G609G} seront présentées. Des travaux sur la fonction mitochondriale ainsi que sur les modifications épigénétiques compléteront alors les données de l'article n°1. Cet article démontre une augmentation de l'expression de PARP-1 et de la PARylation dans les VSMCs de souris *Lmna*^{G609G/G609G} qui conduisent à une altération des niveaux de NAD⁺ ainsi qu'à l'apparition d'une pathologie vasculaire. Avant de réaliser un criblage à haut débit afin d'identifier une molécule permettant d'augmenter les niveaux de NAD⁺, nous avons évalué l'effet d'un inhibiteur de PARP-1, l'olaparib, couramment utilisé comme anticancéreux, dont les résultats seront alors présentés. Cette partie sera suivie par l'étude d'un modèle de VSMCs qui expriment une lamine A tronquée via l'utilisation d'un oligomorpholino phosphorodiamidate (PMO pour « phosphorodiamidate morpholino oligomers »). Pour terminer, les matériels et méthodes utilisés dans le cadre de ces études complémentaires seront détaillés : (B) Matériels et méthodes complémentaires.

A. Résultats complémentaires

Défauts de structure et fonction mitochondriale dans les VSMCs *Lmna*^{G609G/G609G}

Dans le modèle de VSMCs isolées à partir d'aorte de souris *Lmna*^{G609G/G609G} (*Lmna*^{G609G/G609G}-VSMCs), nous avons mis en évidence une diminution des taux de NAD⁺ par rapport aux VSMCs isolées d'aorte de souris WT (WT-VSMCs). Sachant que le NAD⁺ est un facteur clé de la survie cellulaire du fait de son rôle important dans la production d'énergie par les mitochondries, nous avons étudié la fonction mitochondriale des VSMCs. La phosphorylation oxydative mitochondriale est une des principales voies de production d'énergie cellulaire. Elle est basée sur le transfert des électrons du FADH₂ et du NADH (forme oxydée du NAD⁺) vers l'oxygène par les différents complexes de la chaîne respiratoire permettant la synthèse d'ATP, via un gradient de proton (**Figure 33A**). Les chutes de NAD⁺ pourraient, par conséquent, être associées à une altération de la fonction mitochondriale. Dans un premier temps, nous avons donc étudié l'expression des complexes de la chaîne respiratoire. Les immunoblots obtenus à partir des VSMCs mettent

en évidence une expression normale des complexes I, II et III tandis que l'expression du complexe IV est diminuée dans les VSMCs *Lmna*^{G609G/G609G} par rapport aux WT (**Figure 33B**). Afin de mesurer l'activité de la chaîne respiratoire mitochondriale reflétée par la consommation cellulaire en oxygène au cours du temps (**Figure 33C**), nous avons réalisé dans un deuxième temps une étude en « Seahorse Analyzer » avec l'aide de la plateforme d'étude du Métabolisme de l'hôpital Necker (Inserm UMR_S024). La respiration basale, qui est mesurée avant l'ajout de l'oligomycine, est normale dans les VSMCs *Lmna*^{G609G/G609G}. La respiration maximale qui est calculée après l'ajout de FCCP et qui correspond au taux maximal de respiration que la cellule peut atteindre pour répondre à un défi métabolique, est significativement diminuée dans les VSMCs *Lmna*^{G609G/G609G} par rapport aux WT (**Figure 33C**). Dans les VSMCs *Lmna*^{G609G/G609G}, la production d'ATP présente une tendance à la diminution. Elle est mesurée à la suite de l'ajout d'oligomycine qui bloque l'ATP synthase et par conséquent, reflète la consommation d'oxygène requise pour la production d'ATP. Cependant, on remarque que les VSMCs *Lmna*^{G609G/G609G} ne répondent pas véritablement à l'oligomycine. Des mises au point supplémentaires de la technique Seahorse seront donc nécessaires afin de confirmer ces résultats préliminaires. Enfin, une légère diminution est également observée pour la fuite de protons, cette dernière correspondant à la consommation d'oxygène qui n'aboutit pas à la production d'ATP (**Figure 33C**). Dans l'ensemble, ces résultats témoignent d'une altération de la fonction mitochondriale dans les VSMCs *Lmna*^{G609G/G609G}.

2.1 Altération de la PARYlation dans la progéria : impact sur la physiopathologie vasculaire

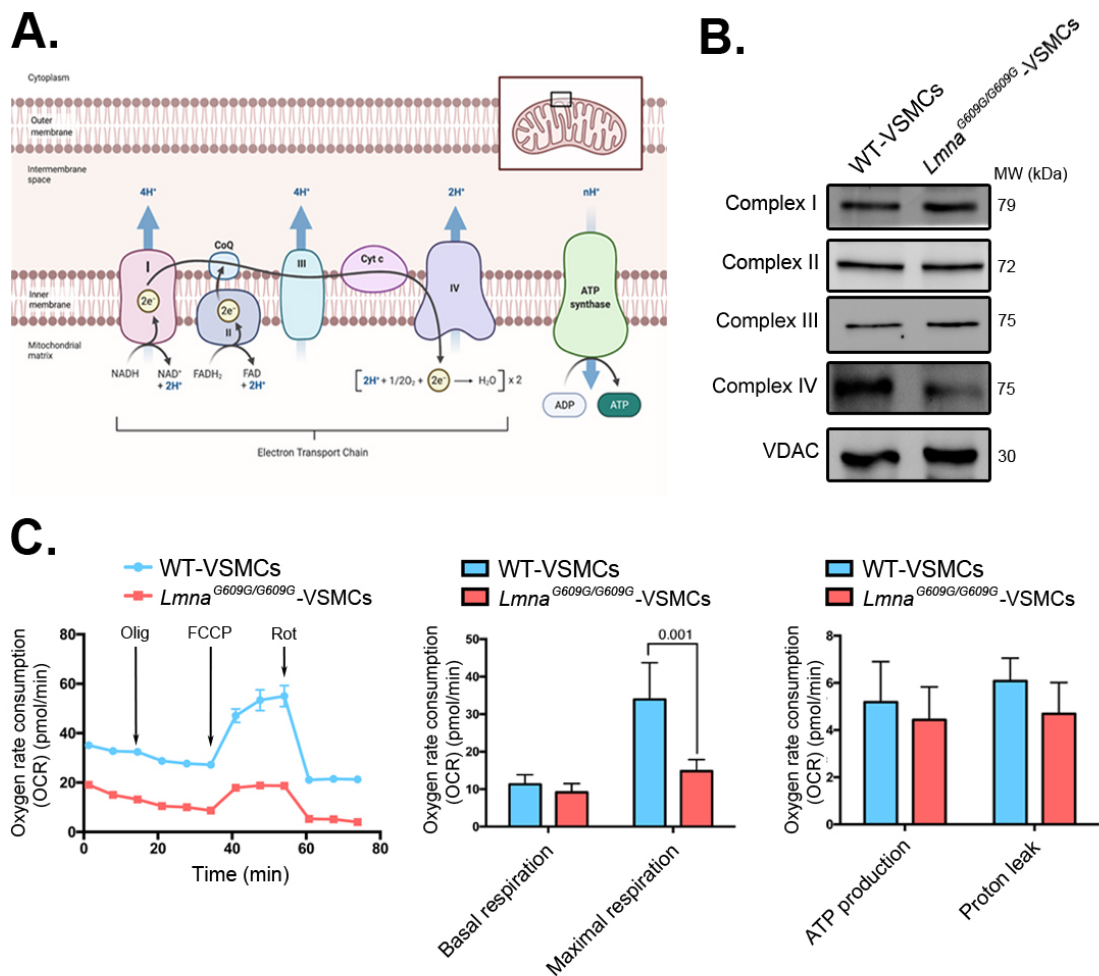


Figure 33 : Altération de la fonction mitochondriale des VSMCs *Lmna*^{G609G/G609G}

(A) Schéma représentatif des complexes de transport d'électrons de la chaîne respiratoire mitochondriale générant un gradient essentiel à la synthèse d'ATP. (B) Immunoblots montrant les niveaux protéiques des complexes I, II, III et IV de la chaîne respiratoire mitochondriale dans des VSMCs WT et *Lmna*^{G609G/G609G}. VDAC, pour « Voltage-dependent anion channel », reflète directement la charge mitochondriale et a été par conséquent utilisé pour la normalisation. (C) Consommation d'oxygène en fonction du temps (min) dans des VSMCs WT et *Lmna*^{G609G/G609G}. Après avoir défini l'état basal, l'oligomycine (Olig), le FCCP et la roténone (Rot) ont été successivement ajoutés. Les graphiques représentent les moyennes et les écarts types de la respiration basale, la respiration maximale, la production d'ATP ainsi que la fuite de protons dans les VSMCs *Lmna*^{G609G/G609G} (n=2) et les WT (n=2). Les différences ont été analysées par la méthode de Wilcoxon-Mann-Whitney et les P-value sont indiquées au-dessus des colonnes.

Du fait de l'importance du rapport structure/fonction, l'altération de la fonction mitochondriale des VSMCs *Lmna*^{G609G/G609G} suggère une altération morphologique des mitochondries. De plus, l'immunofluorescence réalisée pour l'étude de la localisation sous-cellulaire d'AIF avec un co-marquage AIF/mitochondries (Figure 29 de l'article n°1, cf. page 128), témoigne d'une différence d'organisation du réseau mitochondrial entre les VSMCs *Lmna*^{G609G/G609G} et les WT. Cette différence a pu être confirmée par des

immunofluorescences via l'utilisation d'un mitotracker qui met en évidence les mitochondries. Les résultats démontrent une fragmentation du réseau mitochondrial des VSMCs *Lmna*^{G609G/G609G} avec d'importants agrégats de mitochondries, contrairement aux WT qui présentent un réseau possédant de longues branches mitochondriales réparties dans l'ensemble de la cellule (**Figure 34A**). La fragmentation du réseau mitochondrial dans les VSMCs *Lmna*^{G609G/G609G} peut s'expliquer par une diminution de l'expression des mitofusines 1 et 2 (MFN1 et MFN2), deux protéines essentielles à la fusion des mitochondries observées par immunoblots (**Figure 34B**).

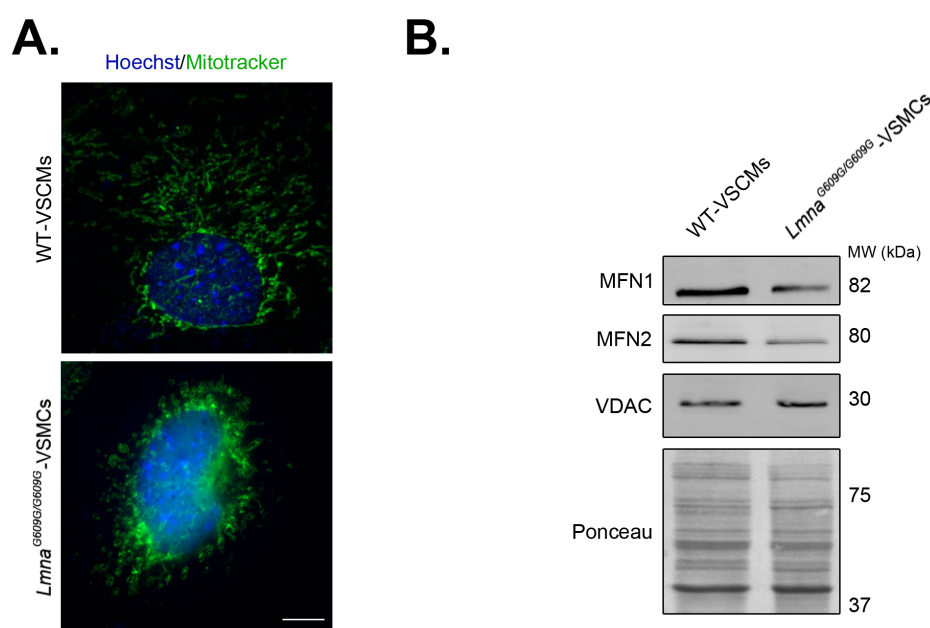


Figure 34 : Fragmentation du réseau mitochondriale des VSMCs *Lmna*^{G609G/G609G}

(A) Immunofluorescences à partir de VSMCs *Lmna*^{G609G/G609G} et WT montrant les noyaux colorés au Hoechst (bleu) ainsi que les mitochondries identifiables par un marquage mitotracker (vert) dans les VSMCs WT et *Lmna*^{G609G/G609G}. Barre d'échelle : 20µm. (B) Immunoblots montrant les niveaux protéiques des complexes des mitofusines 1 et 2 (MFN1 et MFN2) dans les VSMCs WT et *Lmna*^{G609G/G609G}. VDAC, pour « Voltage-dependent anion channel », reflète directement la charge mitochondriale et a été par conséquent utilisé pour la normalisation.

Changements épigénétiques des VSMCs *Lmna*^{G609G/G609G}

Pour terminer la caractérisation du modèle VSMCs *Lmna*^{G609G/G609G}, nous avons étudié les modifications épigénétiques. En effet, sachant que les fibroblastes HGPS présentent des changements épigénétiques (cf. partie 1.2.5 A. « Désorganisation de la chromatine et changements épigénétiques »), des résultats similaires étaient attendus dans les VSMCs *Lmna*^{G609G/G609G}. Nous avons ainsi étudié l'acétylation et la méthylation de

l'histone 3 (H3), une histone majoritairement impactée par les changements épigénétiques. Par immunoblots, nous avons confirmé une diminution de l'acétylation de l'histone au niveau des lysines 9, 14 et 27 nommés respectivement H3K9, H3K14 et H3K27 (**Figure 35A**). L'acétylation générale de l'histone 3 est donc diminuée tandis que la triméthylation de l'histone 3 au niveau de la lysine 9 (H3K9me3), un marqueur de la sénescence, est augmentée dans les VSMCs *Lmna*^{G609G/G609G} par rapport aux WT (**Figure 35A**).

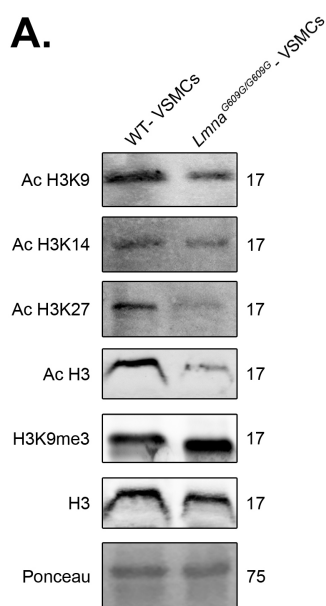


Figure 35 : Modifications épigénétiques des VSMCs *Lmna*^{G609G/G609G}

(A) Immunoblots montrant les niveaux d'acétylation de l'histone 3 sur les lysines K9, K14 et K27 (Ac H3K9, Ac H3K17, et Ac H3K17) dans les VSMCs WT et *Lmna*^{G609G/G609G}. Les niveaux de triméthylation de l'histone 3 (H3K9me3) sont également présentés dans les VSMC WT et *Lmna*^{G609G/G609G}. Le ponceau a été utilisé pour la normalisation.

Le traitement des VSMCs *Lmna*^{G609G/G609G} à l'olaparib n'est pas suffisant pour restaurer les niveaux de NAD⁺

Nous avons montré dans l'article n°1 (cf. page 109) que l'augmentation de l'expression de PARP-1 ainsi que de la PARylation conduit à une déplétion en NAD⁺ des VSMCs *Lmna*^{G609G/G609G} et à l'apparition d'une pathologie vasculaire. Afin de reverser ce mécanisme physiopathologique, nous avons testé l'efficacité de l'olaparib, un inhibiteur de PARP-1 utilisé en thérapie anticancéreuse. L'immunoblot montre une diminution de la PARylation dans les VSMCs *Lmna*^{G609G/G609G} proportionnelle à l'augmentation de la dose d'olaparib confirmant la diminution de l'activité de PARP-1 après traitement des VSMCs

Lmna^{G609G/G609G} (**Figure 36A**). Sachant que la dose d'olaparib couramment utilisée est de 5µM et que cette dose permet de diminuer l'activité de PARP-1 dans le modèle VSMCs *Lmna*^{G609G/G609G}, nous avons retenu cette concentration pour l'ensemble des expériences suivantes. Nous avons quantifié le NAD⁺ des VSMCs *Lmna*^{G609G/G609G} après traitement à l'olaparib ce qui a permis de mettre une évidence une augmentation du NAD⁺ à un niveau proche de celui des WT (**Figure 36B**). Sachant que PARP-1 est impliquée dans les mécanismes de réparation des dommages à l'ADN, nous avons également étudié l'effet de son inhibition sur les cassures de l'ADN. L'immunofluorescence réalisée à partir de VSMCs confirme l'augmentation des foci γH2AX dans les VSMCs *Lmna*^{G609G/G609G} par rapport aux WT traduisant une augmentation des cassures double-brin de l'ADN. Cependant, le traitement des VSMCs *Lmna*^{G609G/G609G} à l'olaparib n'a pas eu d'effet sur les foci γH2AX et par conséquent, sur les cassures double-brin de l'ADN (**Figure 36C**).

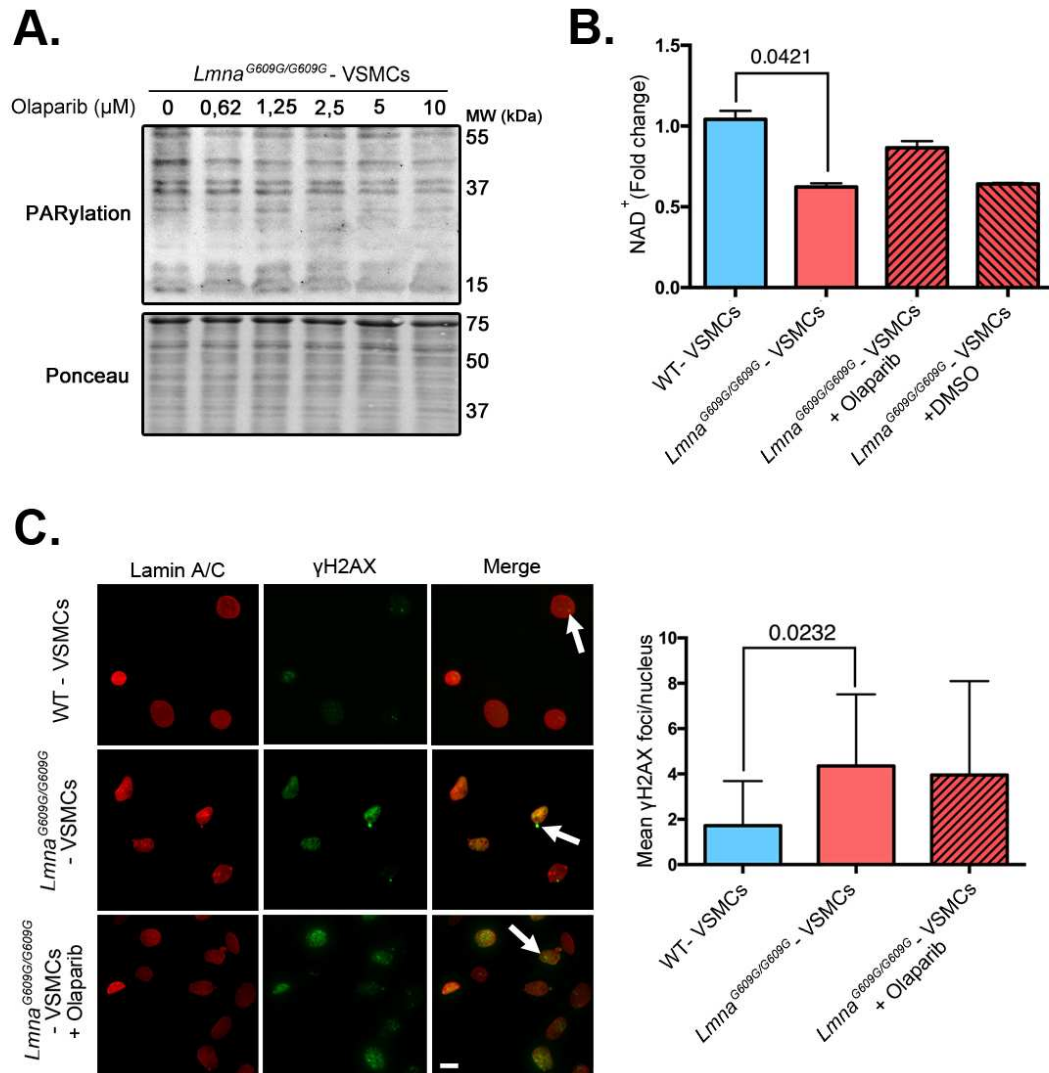


Figure 36 : Traitement *in vitro* des VSMCs à l'olaparib

(A) Immunoblots montrant les niveaux d'expression des protéines PARylées avec un anticorps dirigé contre les groupements Poly(ADP-ribose) (PAR) dans des VSMCs *Lmna*^{G609G/G609G} non traitées ou traitées à l'olaparib. Le ponceau a été utilisé pour la normalisation. (B) Quantification des niveaux cellulaires en NAD⁺ (fold change) dans des VSMCs WT (n=2), *Lmna*^{G609G/G609G} (n=2), *Lmna*^{G609G/G609G} traitées à l'olaparib (n=2) et *Lmna*^{G609G/G609G} traitées au DMSO (n=2) comme contrôle négatif. Les graphiques représentent les moyennes et les écarts types. Les différences ont été analysées par la méthode ANOVA et les *P*-value sont indiquées au-dessus des colonnes. (C) Immunofluorescences montrant les lamines A/C (rouge) ainsi que les foci γH2AX (vert) pointés par des flèches blanches dans des VSMCs WT, *Lmna*^{G609G/G609G} et *Lmna*^{G609G/G609G} traitées à l'olaparib. Barre d'échelle : 20μm. Les graphiques représentent les moyennes et les écarts types de la moyenne des foci γH2AX par noyaux de VSMCs WT, *Lmna*^{G609G/G609G} et *Lmna*^{G609G/G609G} traitées à l'olaparib. Les différences ont été analysées par la méthode ANOVA et les *P*-value sont indiquées au-dessus des colonnes.

L'expression d'une forme tronquée de la lamines A dans les VSMCs *Lmna*^{G609G/G609G} n'induit pas d'augmentation de la PARylation

Dans le but de valider le lien direct entre l'expression de la progérine et l'augmentation de la PARylation dans les VSMCs, nous avons choisi d'utiliser un outil capable d'induire l'expression de la progérine, les PMO. Ces séquences d'oligonucléotides morpholinos sont capables de se fixer aux pré-ARNm d'intérêt afin de modifier son épissage et d'induire l'expression d'une protéine tronquée. Le HLMna11D est un PMO connu pour permettre l'expression de la progérine (Luo et al., 2014). Nous avons donc traité les VSMCs avec les PMO HLMna11D et de façon surprenante, l'immunoblot obtenu à partir de VSMCs ou de VSMCs traitées au PMO montre l'expression de la forme tronquée de la lamine A dont la bande n'est pas au poids moléculaire attendu (**Figure 37A**). En effet, la masse moléculaire de la progérine est de 70kDa tandis que nous détectons une protéine d'environ 67kDa. L'immunoblot obtenu à partir de VSMCs, VSMCs traitées au PMO ou VSMCs *Lmna*^{G609G/G609G} confirme une expression de la progérine uniquement dans les VSMCs *Lmna*^{G609G/G609G} (**Figure 37B**). L'étude de la morphologie nucléaire des cellules traitées au PMO en immunofluorescence montre que l'expression d'une lamine A tronquée induit une déformation nucléaire avec des bourgeonnements de l'enveloppe nucléaire caractéristiques de l'expression d'une lamine A mutée (**Figure 37C**). Cependant, l'immunoblot obtenu à partir de VSMCs, VSMCs traité au PMO ou VSMCs *Lmna*^{G609G/G609G} montre que l'expression de la forme tronquée de la lamine A n'induit pas d'augmentation de l'expression de PARP-1 ni de la PARylation, ce qui suggère une spécificité de la progérine dans l'augmentation de la PARylation (**Figure 37D**).

2.1 Altération de la PARylation dans la progéria : impact sur la physiopathologie vasculaire

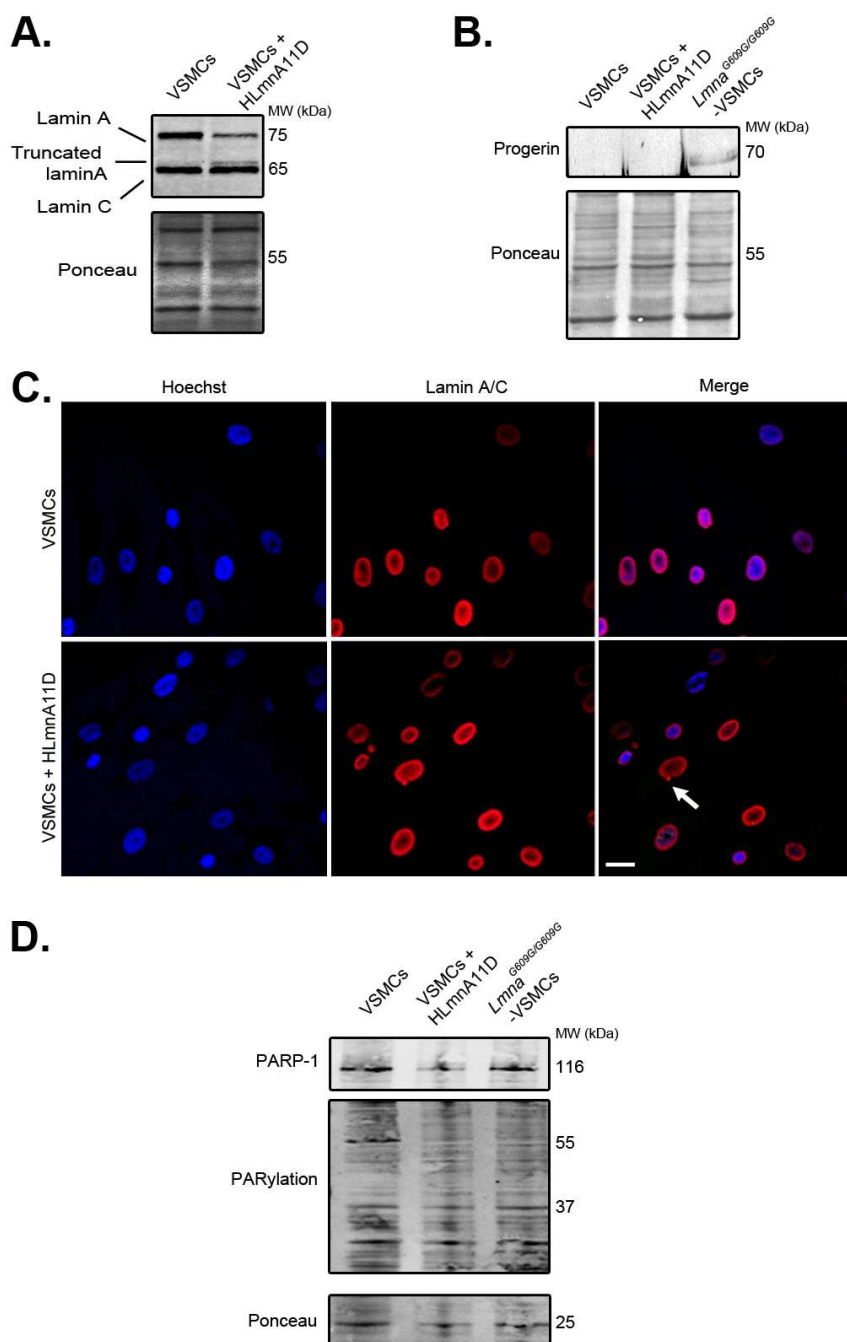


Figure 37 : Expression d'une lamines A tronquée induite par un PMO dans les VSMCs

(A) Immunoblots montrant les niveaux d'expression des lamines A/C et d'une forme tronquée de la lamine A dans les VSMCs non traitées ou traitées au PMO. Le ponceau a été utilisé pour la normalisation. (B) Immunoblots montrant les niveaux d'expression des progerine dans les VSMCs non traitées ou traitées au PMO et dans les VSMCs *Lmna*^{G609G/G609G}. Le ponceau a été utilisé pour la normalisation. (C) Immunofluorescences montrant les lamines A/C (rouge) ainsi que les noyaux marqués à l'Hoechst (bleu) dans les VSMCs non traitées ou traitées au PMO et dans les VSMCs *Lmna*^{G609G/G609G}. Les flèches blanches pointent les déformations de l'enveloppe nucléaire. Barre d'échelle : 20 μm. (D) Immunoblots montrant les niveaux d'expression de PARP-1 ainsi que des protéines PARylées avec un anticorps dirigé contre les groupements (PAR) dans les VSMCs non traitées ou traitées au PMO et dans les VSMCs *Lmna*^{G609G/G609G}. Le ponceau a été utilisé pour la normalisation.

B. Matériels et méthodes complémentaires

Isolation et culture des VSMCs. Les VSMCs primaires ont été isolées à partir d'aortes de souris WT et *Lmna*^{G609G/G609G} de 4 semaines en suivant un protocole adapté de (Shimizu et al., 1995). Après avoir asphyxié les souris avec du CO₂ pendant 2 minutes, le cœur a été perfusé à travers l'apex avec 1ml de HBSS stérile 1X (Gibco). Deux aortes ont été regroupées dans un Falcon conique de 15ml avec du HBSS dans un endroit frais. Les aortes ont été incubées à 37°C pendant 8-10 minutes avec une solution enzymatique contenant de la collagénase (1 mg/ml) (Gibco), un inhibiteur de trypsine (1 mg/ml) (Gibco), de l'élastase (0,744 unités/ml) (Gibco), du stylo/strep à 1% (Gibco) et du HBSS. Les aortes ont été lavées avec du milieu DMEM/F12 (Gibco) avant de retirer la couche de cellules endothéliales avec des pinces. Les aortes ont été incubées à 37°C avec 5% de CO₂ pendant environ une heure dans la solution enzymatique. Après centrifugation, les cellules ont étéensemencées dans 3 puits d'une boîte de 48 puits avec du milieu DMEM/F12. Les VSMCs ont ensuite été cultivées avec du milieu DMEM/F12 contenant 10% de sérum bovin foetal (Gibco) et 1% de pen/strep.

Traitement des VSMCs à l'olaparib. Les VSMCs ont étéensemencées et traitées 12 heures après l'ensemencement par l'ajout au DMEM/F12 (Gibco) de 0,1 % de diméthylsulfoxyde et 5µM d'olaparib (AZD2281 ; Selleckchem). Le traitement à l'olaparib a été renouvelé 24 heures après le traitement initial. Les cellules ont été analysées après 48 heures de traitement.

Traitement des VSMCs au PMO H11Lmna11D. Les PMOs ont été obtenus par Gene Tools, LLC (Philomath, OR, USA). Les PMOs ont été transfectées selon les instructions du fabricant. Les VSMCs humaines (354-05A ; Cell applications) ont été cultivées avec le milieu Smooth Muscle Cell Growth Medium (311-500 ; Cell applications). À une densité élevée (80 % de confluence), les PMOs ont été ajoutés aux cellules à la concentration finale de 10µM, en présence d'endoporteurs à 6µM. La séquence utilisée pour induire l'expression de la progérine dans cette étude était la suivante : HLmna11D (+2 -23) = (5'-GAGACAAAGCAGAGACAACCTCACCT-3').

Mesure du taux de consommation d'oxygène (OCR) par Seahorse analyzer. Le taux de consommation d'oxygène (RCO) a été mesuré dans des VSMCs WT (n=2) et *Lmna*^{G609G/G609G} (n=2) à l'aide de l'analyseur Seahorse XFp (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Les cellules ont étéensemencées dans une miniplaque XFp de 96 puits

(70000 cellules/puits). Après 24 heures d'ensemencement, les cellules ont été lavées et remplacées par 180 μ L/puits de milieu de base XF (#103335-100) complété par 25mM de D-glucose, 1mM de pyruvate, 2mM de L-glutamine ajustée à un pH de 7,4. La mesure de l'OCR a été effectuée après avoir équilibré les cellules dans un milieu adapté et ajouté successivement de l'oligomycine (1.5 μ M), le FCCP (0.5 μ M) et de la roténone (0.5 μ M) par la plateforme d'étude du Métabolisme de l'hôpital Necker (Inserm UMR_S024). Les données ont été normalisées par rapport aux protéines totales dans chaque puits. L'analyse des données a été réalisée par le logiciel Wave (version 2.4.0, Agilent Technologies).

Immunoblot. Pour l'extraction des protéines, les lysats de cellules entières ont été ajoutés dans des tubes FastPrep (MP Biomedicals) avec 300 μ l de tampon de lyse (Cell Signalling). Après 5 cycles FastPrep, les échantillons ont été centrifugés et le surnageant a été collecté. Les lysats ont été séparés par électrophorèse sur gel de SDS-polyacrylamide à 10% et transférés sur des membranes de nitrocellulose (Invitrogen). Les membranes ont été bloquées dans 5% d'albumine de sérum bovin (BSA) avec du tampon tris-salin contenant 1% de Tween 20 (TBS-T) pendant 1 heure à température ambiante, puis incubées pendant une nuit à 4°C avec l'anticorps primaire approprié ([Table 7](#)). Après lavage au TBS-T, les membranes ont été incubées pendant 1 heure à température ambiante avec des anticorps secondaires conjugués à un fluorochrome ([Table 7](#)). Après avoir été lavées avec du TBS-T, le signal a été révélé en utilisant le système d'imagerie ChemiDoc MP (Biorad). Les bandes ont été quantifiées à l'aide du logiciel ImageJ (version bundled with Java 1.8.0_172).

Immunofluorescence et histologie. Les cellules ont été cultivées sur des lamelles en verre, fixées dans du formaldéhyde à 4% (Electron Microscopy Sciences) puis incubées dans une solution de blocage contenant (5% de sérum de chèvre + 1% de BSA + 0,2% de Triton). Les anticorps primaires ([Table 7](#)) ont été incubés pendant une nuit à 4°C dans une solution de blocage. Après lavage avec du PBS (Gibco), les échantillons ont été incubés avec des anticorps secondaires ([Table 7](#)) et du Hoechst (Invitrogen) pendant 1 heure à température ambiante. Les lamelles ont été montées sur lame avec du Fluorescence Mounting Medium (Dako). Les cellules immunocolorées ont été scannées avec un microscope confocal.

Quantification du NAD⁺. Les cellules ont été homogénéisées et traitées selon le rapport précédent (Sander et al., 1976a). La concentration de NAD⁺ a été déterminée à l'aide d'un test spectrophotométrique comme décrit précédemment (Bernofsky and Swan, 1973a). Les mesures d'absorption ont été effectuées dans des plaques à 96 puits par spectrophotométrie (Tecan).

Anticorps	Fabricant	Référence	Dilution
AC H3 (Rabbit)	Cell signaling	9677	1/1000
Ac H3K9 (Rabbit)	Cell signaling	9649S	1/1000
Ac H3K14 (Rabbit)	Cell signaling	7627S	1/1000
AC H3K27 (Rabbit)	Cell signaling	8173S	1/1000
Complex I (Mouse)	Invitrogen	459100	1/1000
Complex II (Mouse)	Invitrogen	459200	1/1000
Complex III (Mouse)	Invitrogen	43-9400	1/1000
Complex IV (Mouse)	Invitrogen	A21348	1/1000
P-Histone H2AX S139 (γ H2AX)(Rabbit)	Cell Signaling	2577S	1/500
H3 (Rabbit)	Abcam	Ab1791	1/1000
H3K9me3 (Rabbit)	Abcam	Ab8898	1/1000
Lamin A/C (E-1) (Mouse)	Santa Cruz Biotechnology	SC-376248	1/500-1000
MFN1 (Rabbit)	Abcam	ab104274	1/1000
MFN2(Rabbit)	Cell signaling	9482S	1/1000
Mitotracker Red CMXRos	Invitrogen	M7512	300nM
PAR (Mouse)	EM Millipore	AM80	1/1000
PARP-1(Rabbit)	Santa Cruz Biotechnology	sc-8007	1/1000
Progerin (Rabbit)	Abcam	ab171944	1/1000
VDAC (Mouse)	Abcam	ab 14734	1/1000
Alexa Fluro 488 goat anti-rabbit IgG (H+L)	Invitrogen	A11008	1/1000
Alexa Fluro 546 goat anti-mouse IgG (H+L)	Invitrogen	A11003	1/1000
Goat Anti-Mouse IgG StarBright Blue 520	Bio-Rad	#12005866	1/1000
Goat Anti-Rabbit IgG StarBright Blue 520	Bio-Rad	#12004161	1/1000

Table 7 : Liste des anticorps utilisés pour les immunoblots et les immunofluorescences

2.1.4. Discussion et perspectives

La progéria de Hutchison-Gilford est une maladie rare du vieillissement accéléré causée par une mutation autosomique dominante du gène *LMNA* qui induit l'expression d'une prélamine A tronquée et toxique appelée progérine. Les patients décèdent prématurément à la suite d'atteintes sévères du système cardiovasculaire dont la principale caractéristique observée, à la fois chez les patients et les modèles animaux, est la perte des VSMCs aortiques. Bien que différentes études se soient intéressées à cette perte dans la progéria, la compréhension du processus physiopathologique reste limitée.

L'objectif de ce projet de thèse était d'améliorer les connaissances relatives aux mécanismes moléculaires qui contribuent à la perte massive des VSMCs dans la progéria. Les expériences réalisées à partir de l'aorte d'un modèle murin de la progéria, les souris *Lmna*^{G609G/G609G}, confirment la perte des VSMCs qui se traduit par une diminution de l'épaisseur de la media ainsi que par une diminution de l'abondance de l'actine des muscles lisses dans l'aorte des souris qui expriment la progérine (**Figures 28A-C**). De plus, nos résultats suggèrent que la perte des VSMCs est causée par une augmentation de l'apoptose (**Figure 28D**). De façon cohérente, nous montrons une augmentation de l'expression des facteurs pro-apoptotiques AIF et Cytochrome C dans l'aorte thoracique ainsi que dans la crosse aortique des souris *Lmna*^{G609G/G609G} (**Figure 28E**). La distinction de ces deux segments aortiques a été effectuée afin de valider nos observations dans des régions soumises à différentes pressions mécaniques. En effet, il est avéré que la pathologie vasculaire n'est pas uniforme dans l'aorte des modèles HGPS. Il a été démontré que les VSMCs sont très sensibles au stress hémodynamique induit par la pression sanguine qui est très élevée dans la crosse aortique et moyenne dans l'aorte thoracique (Zaghini et al., 2020). Par ailleurs une étude a proposé que l'étirement du vaisseau au niveau de la crosse aortique participerait également à une plus grande perte des VSMCs dans la crosse aortique que dans l'aorte thoracique des souris *Lmna*^{G609G/G609G} (Kim et al., 2018). Nos résultats montrent une augmentation de l'apoptose à la fois dans la crosse aortique mais également dans l'aorte thoracique des souris *Lmna*^{G609G/G609G} via l'augmentation de l'expression du Cytochrome C et de l'AIF. Ces deux facteurs sont capables d'induire deux mécanismes apoptotiques différents. D'une part, le Cytochrome C peut activer l'apoptose caspases-dépendante tandis que l'AIF peut induire l'apoptose caspase-indépendante (Bröker et al., 2005). Sachant que nous démontrons une

augmentation de l'expression de ces deux facteurs pro-apoptotiques dans l'aorte thoracique et la crosse aortique, nos résultats démontrent dans leur ensemble que la perte des VSMCs chez les souris *Lmna*^{G609G/G609G} est causée par une augmentation de l'apoptose de façon indépendante au stress mécanique induit par leur position aortique.

L'étude du tissu aortique dans son entièreté nous empêche de discriminer les mécanismes spécifiquement dérégulés dans les VSMCs par rapport aux autres types cellulaires de l'aorte tels que les cellules endothéliales. Par ailleurs, différentes études se sont intéressées à l'implication de chaque sous-type cellulaire dans l'apparition de la pathologie vasculaire. En effet, sachant que les cellules endothéliales sont métaboliquement actives et capables de générer divers facteurs impliqués dans la régulation de la vasomotricité, un modèle murin de souris *Lmna*^{G609G} exprimant la progérine spécifiquement dans les cellules endothéliales a été généré. L'étude de ce modèle démontre la présence d'une pathologie vasculaire ainsi que le raccourcissement de la longévité témoignant de l'importance des cellules endothéliales sur les atteintes vasculaires dans la progéria (Osmanagic-Myers et al., 2019). Cependant les cellules endothéliales ne sont pas les seules cellules effectrices critiques de la progéria dans la paroi vasculaire. Par opposition au précédent modèle, l'étude d'un modèle *Lmna*^{G609G} surexprimant la progérine uniquement dans les VSMCs témoigne d'un phénotype vasculaire proche de celui observé chez les patients HGPS avec notamment une perte des VSMCs, ce qui confirme le rôle central des VSMCs dans la progéria (Hamczyk et al., 2018). Nous avons donc isolé les VSMCs issues de souris WT ou *Lmna*^{G609G/G609G}. *In vitro*, nous confirmons une augmentation de la mortalité cellulaire induite par une augmentation de l'apoptose caspase dépendante et indépendante dans les cellules qui expriment la progérine (**Figures 29B et 29E**). Plus précisément, l'apoptose caspase-indépendante est médiée par le relargage d'AIF des mitochondries que nous avons mis en évidence dans les VSMCs qui expriment la progérine (**Figure 29F**). Dans l'ensemble, ces données soutiennent l'idée que les VSMCs de souris *Lmna*^{G609G/G609G} entrent en apoptose prématurément en dépit de tout stress environnemental.

L'apoptose étant associée à une augmentation des cassures de l'ADN, nous avons étudié ces défauts dans les VSMCs de souris *Lmna*^{G609G/G609G}. Nos résultats montrent une augmentation des dommages à l'ADN dans les VSMCs qui expriment la progérine de façon cohérente à ce qui avait été observé dans les fibroblastes HGPS (Richards et al., 2011).

Plus précisément, nous montrons une augmentation des cassures double-brin de l'ADN illustrées par l'augmentation des foci γ H2Ax ainsi qu'une augmentation des cassures simple et double-brin observées par le test des comètes (**Figures 29C et 29D**). Une étude réalisée à partir de VSMCs humaines montre que l'expression de la progérine induite par la transfection d'un vecteur viral perturbe la réparation des dommages à l'ADN car contrairement à la lamine A, la progérine ne peut se lier au facteur de réparation des dommages à l'ADN DNA-PK (Kinoshita et al., 2017). De plus, nos résultats mettent en évidence des changements épigénétiques dans les VSMCs *Lmna*^{G609G/G609G}. L'étude de l'acétylation de l'histone H3 s'est révélée être diminuée dans les VSMCs exprimant la progérine tandis que la triméthylation de l'histone H3 sur la lysine 9 est augmentée (**Figure 35A**). Dans l'ensemble, ces résultats obtenus à partir VSMCs exprimant la progérine témoignent d'altérations chromosomiques parmi lesquelles, un nombre important de cassures de l'ADN expliquerait l'augmentation accrue de l'apoptose de ces cellules conduisant à leur déplétion dans la media de l'aorte des souris *Lmna*^{G609G/G609G}.

Par ailleurs, l'étude qui avait pour objectif de déterminer si la localisation cellulaire d'AIF était mitochondriale ou cytoplasmique dans les VSMCs nous a permis de mettre en évidence un défaut de structure mitochondriale des VSMCs *Lmna*^{G609G/G609G}. En effet, nous avons observé une fragmentation du réseau mitochondrial de ces cellules qui pourrait s'expliquer par une diminution de l'expression des mitofusines 1 et 2, deux protéines essentielles dans la fusion mitochondriale (**Figures 34A et 34B**). Pour le confirmer, il serait intéressant d'étudier l'expression d'OPA1, une protéine qui induit la fission mitochondriale. Cela permettrait de confirmer si des altérations de fissions contribuent également aux modifications architecturales des mitochondries dans les VSMCs *Lmna*^{G609G/G609G} ou si, seuls les défauts de fusion en sont responsables. L'étude de la dynamique du réseau mitochondrial par imagerie en temps réel n'a cependant pas révélé de différences significatives entre les VSMCs WT et *Lmna*^{G609G/G609G} (données non présentées). Ce résultat ne reposant que sur des observations, il serait pertinent de développer un outil permettant de quantifier certains paramètres de la dynamique telles que la vitesse de déplacement mitochondriale afin de confirmer une dynamique mitochondriale normale des VSMCs *Lmna*^{G609G/G609G}. Collectivement, ces données montrent une altération de la structure mitochondriale des VSMCs *Lmna*^{G609G/G609G} de façon cohérente à une précédente étude qui montrait des anomalies de morphologie mitochondriale dans les fibroblastes HGPS (Xiong et al., 2016). Du fait de la relation

structure/fonction, les altérations d'architectures mitochondriales suggèrent un défaut de production énergétique. Nos résultats obtenus par Seahorse analyzer, outil permettant d'étudier la fonction mitochondriale, montrent un défaut de respiration maximale et une tendance à la diminution de production d'ATP des VSMCs *Lmna*^{G609G/G609G} comparés aux WT (**Figure 33C**). De futures analyses de la fonction mitochondriale sont nécessaires afin de confirmer la diminution de synthèse d'ATP dans les VSMCs *Lmna*^{G609G/G609G} comme cela a été montré dans des fibroblastes de souris *Lmna*^{G609G/G609G} par rapport aux WT (Rivera-Torres et al., 2013). De plus, l'étude de l'expression des complexes de la chaîne respiratoire montre une diminution de l'expression du complexe IV tandis que les complexes I, II et III sont exprimés de façon similaire dans les VSMCs *Lmna*^{G609G/G609G} par rapport aux WT (**Figure 33B**). Dans l'ensemble, ces résultats démontrent une altération de la structure et de la fonction mitochondriale des VSMCs qui expriment la progérine.

Au carrefour des dysfonctions mitochondriales, des modifications épigénétiques, des dommages à l'ADN, de la senescence ou encore du raccourcissement des télomères, le NAD⁺ est apparu comme une potentielle stratégie thérapeutique pour contrer les pathologies associées au vieillissement (Rajman et al., 2018). Nos résultats montrent que les VSMCs *Lmna*^{G609G/G609G} se caractérisent par des défauts de dommages à l'ADN, des modifications épigénétiques ainsi que des altérations de la fonction mitochondriale ce qui confirme des similitudes entre la progéria et les marques associées à la déficience en NAD⁺ au cours du vieillissement. Nos résultats montrent une diminution des niveaux de NAD⁺ dans les VSMCs *Lmna*^{G609G/G609G} par rapport aux WT (**Figure 30D**). Nous souhaitons par ailleurs confirmer la diminution de NAD⁺ dans l'aorte des souris WT *Lmna*^{G609G/G609G}. Pour cela, le dosage de composés de la famille des nicotinamides par chromatographie en phase liquide à haute performance est en cours avec l'aide de la plateforme CriBioM (Criblage Biologique Marseille) qui est spécialisée dans la caractérisation de métabolites ainsi que dans l'étude de l'activité et de la biodisponibilité de substances bioactives. Il serait également intéressant de doser le NAD⁺ circulant à partir du sérum des souris *Lmna*^{G609G/G609G} et WT afin de confirmer une diminution globale du NAD⁺. Cela pourrait potentiellement être utilisé comme biomarqueur de l'atteinte vasculaire comme cela a été démontré dans le vieillissement physiologique ainsi que dans certaines pathologies (Jayasena et al., 2020).

2.1 Altération de la PARylation dans la progéria : impact sur la physiopathologie vasculaire

Pour comprendre l'origine de la diminution des niveaux de NAD⁺ dans les VSMCs *Lmna*^{G609G/G609G}, nous avons étudié la PARylation, une modification post-traductionnelle catalysée par les PARP-1 qui sont les principales enzymes consommatrices du NAD⁺ cellulaire. En effet, il a été démontré que l'expression et l'activité de PARP-1 sont dépendants du niveau de dommages à l'ADN cellulaire (Zaniolo et al., 2007). Nos résultats montrent une augmentation de la PARylation ainsi que de l'expression de PARP-1 dans les VSMCs et dans l'aorte de souris *Lmna*^{G609G/G609G} par rapport aux WT (**Figure 30B et 30C**). En parallèle, nous montrons une diminution de l'expression des protéines de la voie de sauvetage du NAD⁺ dans les VSMCs et dans l'aorte de souris *Lmna*^{G609G/G609G} comparé aux WT. Plus précisément, sachant que Nampt est l'enzyme limitante de la voie de sauvetage du NAD⁺, la diminution de son expression pourrait également contribuer à la diminution des niveaux de NAD⁺ dans les VSMCs qui expriment la progérine (**Figure 30C**). Dans l'ensemble, ces résultats démontrent que l'expression de la progérine dans les VSMCs est associée à une augmentation des dommages à l'ADN induisant une augmentation de la PARylation afin de réparer ces dommages. Sachant que la PARylation consomme du NAD⁺, l'augmentation de la PARylation dans les VSMCs *Lmna*^{G609G/G609G} est responsable d'une utilisation accrue de NAD⁺ qui, en parallèle, est moins produit par la voie de sauvetage. Ces changements provoquent donc une chute des niveaux de NAD⁺ représentant un stress cytotoxique pour les cellules musculaires qui requièrent une grande quantité d'énergie afin d'assurer leur fonction contractile. Cela conduirait ainsi à l'apoptose des VSMCs *Lmna*^{G609G/G609G} et à l'apparition de troubles cardiovasculaires chez les souris *Lmna*^{G609G/G609G}.

Dans le but de confirmer le rôle de la PARylation dans la physiopathologie vasculaire, nous nous sommes intéressés aux effets de l'inhibition de PARP-1 sur les niveaux de NAD⁺ qui dans le cas de résultats positifs, constituerait un potentiel traitement pour la progéria. En effet, plusieurs études ont permis de mettre en évidence l'effet positif de la restauration des taux de NAD⁺ sur des cardiomyopathies (Diguët et al., 2018; Vignier et al., 2018). La stratégie de ces deux études consistait à restaurer les taux de NAD⁺ par l'utilisation du NR, un précurseur du NAD⁺ métabolisé par l'enzyme NRK2. Cependant, sachant que l'expression de NRK2 est diminuée dans notre modèle (**Figure 30C**) et que la PARylation est augmentée dans les VSMCs *Lmna*^{G609G/G609G} (**Figure 30B**), il était préférable de cibler PARP-1 dans le but d'augmenter les niveaux de NAD⁺. Pour commencer cette étude, nous avons par conséquent utilisé l'olaparib, un inhibiteur des PARPs couramment

utilisé dans la thérapie anticancéreuse. Bien que les VSMCs *Lmna*^{G609G/G609G} traitées à l'olaparib présentent une diminution de la PARylation et une augmentation des niveaux de NAD⁺, l'augmentation de NAD⁺ n'est pas suffisante pour restaurer des niveaux comparables à ceux observés dans les VSMCs WT (**Figures 36A et 36B**). Par ailleurs, nous montrons que le traitement des VSMCs *Lmna*^{G609G/G609G} à l'olaparib n'induit pas d'augmentation des foci γ H2Ax ce qui signifie que l'inhibition de PARP-1 n'impacte pas la réparation des dommages à l'ADN (**Figure 36C**). Dans l'ensemble, ces résultats confirment que l'inhibition de PARP-1 est une bonne stratégie pour augmenter les niveaux de NAD⁺ sans affecter la réparation des dommages à l'ADN. L'olaparib n'étant cependant pas suffisant pour restaurer les niveaux de NAD⁺, l'identification d'une autre molécule a été nécessaire.

Pour cela, nous avons réalisé un criblage à haut débit afin d'identifier, à partir de deux banques de molécules, un composé capable d'inhiber PARP-1 tout en restaurant les niveaux de NAD⁺. Le criblage à haut débit nécessite une grande quantité de cellules ce qui nous a obligé à utiliser des VSMCs différenciées à partir d'iPSc dérivées de patients HGPS ou de témoins. Comme attendu, l'étude des VSMCs HGPS confirme une expression de la progérine et de la SMA. De plus, une augmentation du pourcentage de noyaux déformés ainsi que de la sénescence est caractéristique des VSMCs HGPS (**Figures 31A-C**). Nous avons également confirmé la diminution des niveaux de NAD⁺ dans les VSMCs HGPS par rapport aux VSMCs WT (**Figure 31D**). De façon surprenante, une étude obtenue à partir de VSMCs HGPS générées à partir d'iPSCs a mis en évidence des défauts prolifératifs associés à une diminution de l'expression de PARP-1 (Zhang et al., 2014a). Dans notre étude, les VSMCs HGPS constituent néanmoins un bon modèle pour le criblage à haut débit puisque nous observons une augmentation de l'activité de PARP-1 ainsi que de la PARylation et enfin, une diminution des niveaux de NAD⁺ de même que les précédents résultats obtenus à partir de VSMCs *Lmna*^{G609G/G609G}.

Les résultats du criblage à haut débit ont permis d'identifier 3 molécules qui seront appelées X, Y, Z et qui permettent de restaurer le NAD⁺ des VSMCs HGPS à des niveaux similaires à ceux des VSMCs WT (**Figure 31E**). L'étude de l'activité de PARP-1 dans des VSMCs HGPS traitées avec différentes doses de ces 3 composés a permis de déterminer qu'une molécule Z est capable d'inhiber significativement PARP-1 (**Figure 31F**). Le traitement des VSMCs *Lmna*^{G609G/G609G} avec la molécule Z confirme l'augmentation du NAD⁺

2.1 Altération de la PARylation dans la progéria : impact sur la physiopathologie vasculaire

a des niveaux comparables aux VSMCs WT (**Figure 32A**). Nous avons donc choisi de traiter les souris *Lmna*^{G609G/+} avec le composé Z. Les souris *Lmna*^{G609G/+} et *Lmna*^{G609G/G609G} développent toutes les 2 des phénotypes associés au vieillissement prématuré, mais les phénotypes de la maladie apparaissent plus tôt et progressent plus rapidement chez les souris *Lmna*^{G609G/G609G}. Le traitement pendant 4 semaines des souris *Lmna*^{G609G/+} avec 100mg/kg ou 150mg/kg du composé Z révèle que l'épaisseur de la media ainsi que le nombre de noyaux de la media sont proches de ceux des souris WT. L'inhibition de PARP-1 et l'augmentation des niveaux de NAD⁺ ont donc des effets bénéfiques sur la perte des VSMCs et par conséquent, sur la pathologie vasculaire (**Figure 32B et 32C**). Il serait intéressant de confirmer cette donnée sur des souris *Lmna*^{G609G/G609G} et d'étudier la survie de ces souris par rapport à des souris *Lmna*^{G609G/G609G} non traitées. Ces traitements sont actuellement en cours à l'Institut Clinique de la Souris. Par ailleurs, il serait également intéressant d'étudier l'effet du traitement Z sur les autres tissus impactés par le vieillissement tels que les muscles squelettiques, le cœur ou la peau des souris *Lmna*^{G609G/G609G} (Osorio et al., 2011). Des résultats positifs après traitement des *Lmna*^{G609G/G609G} avec la molécule Z, qui confirmeraient ceux obtenus sur des souris *Lmna*^{G609G/+}, ouvriront la voie à de nouveaux travaux pour la mise au point de traitements permettant de diminuer la pathologie cardiovasculaire dans la progéria.

Notre étude permet donc d'illustrer le rôle de la PARylation dans la perte des VSMCs. Nous montrons que l'expression de la progérine qui active la PARylation via les dommages à l'ADN et diminue les niveaux de NAD⁺, combinée au besoin énergétique important des VSMCs pour assurer leur fonction contractile, explique la physiopathologie de ces cellules. En effet, une diminution des taux de NAD⁺ à la suite de l'augmentation de la PARylation dans d'autres cellules musculaires a également été associée à des pathologies (cf. partie 2.2 « Projet annexe : Rôle de la PARylation sur la fonction cardiaque et musculaire dans la dystrophie musculaire de Duchenne »). Aussi, il serait pertinent d'étudier la PARylation et les niveaux de NAD⁺ dans les cellules cardiaques et musculaires squelettiques des souris *Lmna*^{G609G/G609G} afin de confirmer cette hypothèse. Par ailleurs, l'étude de souris *Zmpste24*^{-/-} qui n'expriment pas la progérine mais qui récapitulent néanmoins les caractéristiques de la progéria (Bergo et al., 2002). L'étude de souris *Zmpste24*^{-/-} qui présentent une augmentation des cassures de l'ADN et de l'apoptose à la suite de l'expression de prélamine A (Butala et al., 2012), permettrait de comprendre s'il existe un lien direct entre progérine et PARylation. Notre étude, menée à partir de VSMCs

qui expriment via un PMO, une forme tronquée de la lamine A qui n'est pas la progérine, conduit à des déformations de l'enveloppe nucléaire mais n'induit pas d'augmentation de la PARylation (**Figure 37A-D**). Ce résultat suggère une spécificité de la progérine sur l'augmentation de la PARylation mais de futures expériences sont nécessaires afin de le confirmer. En effet, il serait intéressant d'induire l'expression de la progérine dans les VSMCs afin de confirmer son lien direct avec l'augmentation de la PARylation et de la mort cellulaire par apoptose. Nous supposons que l'ancienneté du PMO que nous avons utilisé pourrait participer à l'expression de la forme tronquée de la lamine A contrairement à l'expression de la progérine comme attendu. Il serait ainsi pertinent de recommencer cette expérience avec un nouveau PMO Hlmna11D ou encore d'autres PMO également capables d'induire l'expression de la progérine tels que le Hlmna11A (Luo et al., 2014).

Dans l'ensemble, notre étude soutient que la PARylation, augmentée dans l'aorte des souris *Lmna*^{G609G/G609G} à la suite de dommages à l'ADN induits par l'expression de la progérine, conduit à une consommation accrue du NAD⁺, ce qui constitue un stress cytotoxique provoquant la perte des VSMCs dans ce modèle. L'inhibition de PARP-1 avec le composé Z permet de restaurer les niveaux de NAD⁺ dans les VSMCs qui expriment la progérine et améliore la pathologie vasculaire des souris *Lmna*^{G609G/G609G}. De futures recherches sont nécessaires pour définir si le traitement Z pourrait s'inscrire comme une nouvelle stratégie thérapeutique ciblant la perte massive des VSMCs dans la progéria.

2.2. Projet annexe : rôle de la PARylation sur la fonction cardiaque et musculaire dans la dystrophie musculaire de Duchenne

2.2.1. Contexte et objectifs de l'étude

A. Introduction

La dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) est une maladie génétique liée au chromosome X dont l'incidence chez l'Homme est estimée à 1 naissance sur 5 000 (Crisafulli et al., 2020). Les patients souffrent d'une dégénérescence progressive des muscles striés, entraînant une perte de la mobilité, une insuffisance respiratoire ainsi qu'une cardiomyopathie conduisant au décès prématuré des patients (Birnkrant et al., 2018; Bushby et al., 2010). La DMD est causée par des mutations du gène *DMD1* entraînant l'absence de dystrophine, une protéine essentielle dans le maintien de l'intégrité des fibres musculaires pendant leur contraction (Campbell and Kahl, 1989; Monaco et al., 1986).

B. Hypothèses

Au centre d'un dysfonctionnement mitochondrial, de la dérégulation calcique et du stress oxydatif, le NAD⁺ est apparue comme une potentielle cible thérapeutique pour la DMD (Cantó et al., 2015; Goody and Henry, 2018). Le NAD⁺ est un cofacteur essentiel pour plusieurs classes d'enzymes telles que les PARPs qui sont les principales consommatrices du NAD⁺ cellulaire. Ces dernières catalysent la PARylation, une modification post-traductionnelle impliquée dans la détection et la réparation des dommages à l'ADN qui peut être compromise si les niveaux de NAD⁺ sont faibles (Cantó et al., 2015; Goody and Henry, 2018). L'ectoenzyme CD38 consomme également le NAD⁺ afin de d'assurer la production de l'ADP-ribose cyclique (cADPR pour « cyclic ADP-ribose »), un messager de

la signalisation calcique dans le cytoplasme (Howard et al., 1993). Enfin, un rôle du NAD⁺ dans la production d'ATP ainsi que dans le maintien des cellules souches musculaires a également été démontré. Il est donc supposé que l'altération du NAD⁺ peut avoir un impact sur la régénération musculaire et plus généralement, sur la fonction musculaire (Zhang et al., 2016).

C. Objectifs

La supplémentation au nicotinamide riboside, un précurseur naturel du NAD⁺, permet de stimuler la voie de synthèse de NAD⁺ et d'améliorer le phénotype musculaire d'un modèle murin de DMD (Zhang et al., 2016). L'objectif de ce projet est d'étudier le NAD⁺ dans les tissus musculaires de chiens atteints de dystrophie musculaire du golden retriever (GRMD). Dans ce modèle, l'évolution des phénotypes pathologiques sont plus progressifs et plus sévères que ceux retrouvés chez les souris DMD (Kornegay, 2017). Réflétant de façon plus fidèle la DMD, les études à partir des chiens GRMD assurent une bonne transposabilité à l'Homme notamment pour l'identification de cibles thérapeutiques.

D. Impact

Bien que plusieurs approches thérapeutiques soient actuellement en cours d'étude dont notamment des stratégies de thérapie génique (Shimizu-Motohashi et al., 2019), l'utilisation de plusieurs thérapies combinées est désormais reconnue. La compréhension du rôle du NAD⁺ dans les mécanismes physiopathologiques de la DMD ainsi que l'identification d'une molécule améliorant le phénotype clinique restent par conséquent pertinent comme cible thérapeutique afin d'envisager des thérapies combinatoires et ainsi optimiser les effets bénéfiques.

2.2.2. Article n°2: Replenishing NAD⁺ content improves striated muscle function in GRMD dogs

Replenishing NAD⁺ content improves striated muscle function in GRMD dogs

Déborah Cardoso, Inès Barthelemy, Stéphane Blot and Antoine Muchir

Manuscrit en préparation pour soumission dans le journal *Frontiers in Cell and Developmental Biology*.

Facteur d'impact de *Frontiers in Cell and Developmental Biology* (2021): 6.7

Replenishing NAD⁺ content improves striated muscle function in GRMD dogs

Débrah Cardoso¹, Inès Barthelemy², Stéphane Blot² and Antoine Muchir^{1, *}

¹Sorbonne University, INSERM, Institute of Myology, Center of Research in Myology, 75013 Paris, France

²U955 – IMRB - Biology of the neuromuscular system, INSERM, UPEC, EFS, Ecole nationale vétérinaire d'Alfort, 94700, Maisons-Alfort, France.

*Correspondence: a.muchir@institut-myologie.org

ABSTRACT

Duchenne muscular dystrophy (DMD) is an X-linked disease caused by mutations in *DMD* gene and loss of the dystrophin protein, which ultimately leads to myofiber membrane fragility and necrosis, with eventual muscle atrophy and contractures. Affected boys typically die in their second or third decade due to either respiratory failure or cardiomyopathy. Among the developed therapeutic strategies for DMD, exon skipping approach corrects the frame shift and partially restores dystrophin expression. However, despite extensive attempts to develop definitive therapies for DMD, the standard of care remains prednisone, which has only palliative benefits. Animal models have played a key role in studies of DMD pathogenesis and treatment development. The golden retriever muscular dystrophy (GRMD) dog displays clinical syndrome aligning with the progressive course of DMD. Therefore, canine studies may translate better to humans. Recent studies suggested that nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺) cellular content could be a critical determinant for striated muscle function. Biosynthesis of NAD⁺ from vitamin B3 (known as salvage pathways) is the primary source of NAD⁺. We showed here that NAD⁺ salvage pathway was altered in the striated muscles of GRMD, leading to an alteration of one of NAD⁺ co-substrate enzymes, PARP-1. Moreover, we showed that boosting NAD⁺ content using nicotinamide (NAM), a natural NAD⁺ precursor, improves the striated muscle function. Collectively, our results provide mechanistic insights into DMD.

KEYWORDS

Duchenne muscular dystrophy ; GRMD ; NAD⁺ ; nicotinamide

INTRODUCTION

Duchene muscular dystrophy (DMD) is the most common muscular disease affecting one in 3,500 live-born males. It is caused by an inherited or spontaneous X-linked recessive mutation in the *DMD* gene (Koenig et al., 1987), leading to a loss of dystrophin expression (Hoffman et al., 1987). As structural and mechanical sarcolemma protein, the absence of dystrophin results in a decrease of muscular fibers stress resistance (Petrof et al., 1993). During contraction, muscle fibers membrane breaks and intracellular signaling defects appear (Constantin, 2014). Clinically, first symptoms appear during the first decade of life with delayed acquisition of ambulation, respiratory insufficiency and cardiomyopathy (Mercuri et al., 2019) resulting in an average lifespan of 24 years, which can reach 40 years for patients using ventilatory support (Rall and Grimm, 2012; Villanova and Kazibwe, 2017). Although progress has been made to identify genes causing the disease and pathological mechanisms, there are currently no optimal therapies. Today, several therapeutic approaches to cure DMD are under investigation, but to date there has been only one effective long-term therapy for this disease based on CRISPR-Cas9 gene editing approach (Nelson et al., 2019). Thus, there remains a major unmet medical need for new therapeutic interventions.

Striated muscles convert chemical energy from adenosine triphosphate (ATP) into mechanical activity, which is necessary to generate movement and maintain posture. Therefore, striated muscles are important metabolic tissues able to store, produce and consume substrates such as amino acids and carbohydrates contributing to provide energy needed during physical activity (Frontera and Ochala, 2015). Given that striated muscles are metabolically important tissues due to a vital role of nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) in energy production, NAD emerges as potential new therapeutic target for muscular dystrophies (Goody and Henry, 2018). NAD is a metabolic co-factor found in cells either in its oxidized (NAD⁺) or reduced (NADH) form (Berger et al., 2004). Poly(ADP-ribose) polymerases (PARPs) are major cellular NAD⁺ consumers that have key cellular functions such as response to cellular stress (Hottiger et al., 2010). Considering the key role of NAD in different cellular process, maintaining the balance between NAD⁺ consumption and biosynthesis is extremely important for cellular homeostasis and tissue function. Three independent intracellular pathways allow NAD⁺ synthesis from various precursors. *De novo* and Preiss-Handler pathways lead to NAD⁺ synthesis from tryptophan (Trp) and nicotinic acid (NA) in the diet but the most important pathway for maintaining

intracellular NAD⁺ levels is the salvage pathway (Revollo et al., 2004). It exists another NAD⁺ precursor - nicotinamide riboside (NR) - that enhances NAD⁺ levels through the salvage pathway when catalyzed by nicotinamide riboside kinase (Nmrk) (Bieganowski and Brenner, 2004; Ratajczak et al., 2016). In the salvage pathway of NAD⁺ biosynthesis, nicotinamide phosphoribosyltransferase (Nampt) was identified as a rate-limiting enzyme that converts NAM to nicotinamide mononucleotide (NMN) (Garten et al., 2015). NAD⁺ is then synthesized from NMN by NMN adenylyltransferase (Nmnat) (Stein and Imai, 2012). NAD⁺ functions as a co-factor for a multitude of enzymatic reactions within different cellular compartments (Hsu et al., 2009; Pillai et al., 2010). NAD⁺ functions have expanded beyond its role as a co-enzyme, as NAD⁺ also acts as degradation substrates for a wide range of enzymes, such as sirtuins and poly(ADP-ribose) polymerase (PARPs) (Berger et al., 2004). PARPs are nuclear enzymes of eukaryotic cells that participate in DNA repair in response to genotoxic stress (Benjamin and Gill, 1980; Langelier et al., 2012). When activated by DNA breaks, PARPs initiate an energy-consuming cycle by transferring ADP-ribose units from NAD⁺ to nuclear proteins. This process results in rapid depletion of the intracellular NAD⁺ pools, slowing the rate of glycolysis and mitochondrial respiration, eventually leading to cellular dysfunction and death.

Previous studies have shown that muscles NAD⁺ levels are low in aging and many pathological conditions (reviewed in (Imai and Guarente, 2014)). In muscles of *mdx* mouse model of DMD, decreased NAD⁺ levels has been observed (Ryu et al., 2016). Our study reports, a decreased of NAD⁺ content in the dystrophin-deficient dog, notably the Golden Retriever muscular dystrophy (GRMD) dog. Moreover, we showed that boosting NAD⁺ content using NAM improves the striated muscle function.

RESULTS

GRMD dogs display an alteration in NAD⁺ levels

The GRMD dog, represents a translational bridge between mice and humans (Duan, 2011), because it mimics more closely the human disease than other existing mammalian models of dystrophin deficiency (**Figure 43A**) (Valentine et al., 1988). GRMD dogs share the same pathogenesis as human disease (Kornegay, 2017) with more severe phenotype than *mdx* mouse considered therefore as more relevant model for identification of therapeutic strategies. GRMD dogs harbor a mutation in the dystrophin gene resulting in a loss of dystrophin protein in striated muscles (**Figure 43B**), and display dystrophic

muscle lesions, progressive fibrosis (*Figure 43C-F*), early locomotor impairment and premature death due to respiratory or cardiac failure.

To evaluate the relationship between NAD⁺ metabolism and DMD, we first assessed the expression of NAD⁺ salvaging and NAD⁺ consuming enzymes (*Figure 38A*) in striated muscles from GRMD dogs at an early and late stage of the disease progression. There was a significant decreased expression of QPRT and NRK2 in both cardiac and skeletal muscles from adult GRMD dogs compared with WT dogs (*Figure 38B*). Given that a consequence of altered NAD⁺ salvage pathways would lead to a drop in cellular NAD⁺ level, we next assessed NAD⁺ striated muscle level in GRMD dogs. We showed that the NAD⁺ content was significantly lowered in heart and skeletal muscles from young and adult GRMD dogs compared with WT dogs (*Figure 38C*). There was a correlation between altered cardiac and skeletal muscle structure and tissular NAD⁺ content, as the decrease in NAD⁺ level was reported in tissues presenting a diseased appearance with fibrosis infiltration for both cardiac and skeletal muscles and atrophic and regenerative fibers in skeletal muscle.

Given that PARPs are major cellular NAD⁺ consumers, we then asked the consequences of decreased skeletal muscles NAD⁺ on PARP-1 activities. PARPs enzymes bind and cleave NAD⁺ to produce NAM and ADP-ribose, and couple one or more ADP-ribose units to promote PARylation of acceptor proteins (Bai, 2015). The level of PARylation detected by poly(ADP-ribose) (PAR) monoclonal antibody was increased in cardiac and skeletal muscles from adult GRMD dogs compared with WT dogs (*Figure 39*).

Taken together, these findings suggest that increased PARylation and altered NAD⁺ salvage pathways are involved in NAD⁺ depletion in GRMD dogs.

In vivo NAM treatment restores NAD⁺ level

Given that there was a decrease of NAD⁺ level in both cardiac and skeletal muscles from adult GRMD dogs, we tested whether NAM, the substrate for Nampt, could increase NAD⁺ content in the tissues and therefore improve muscular function. GRMD dogs were treated with NAM (500 mg. 2/day), starting at 5 months of age for 1 month duration. At the end of the treatment, the NAD⁺ level was increased in skeletal muscles from GRMD dogs (*Figure 40A*). NAM-treated dogs exhibited an increased PARylation and PARP-1 expression compared with untreated animals (*Figure 40B*). Moreover, feeding GRMD dogs with NAM led to increase in Nampt expression while NRK2 expression was

unchanged (**Figure 40C**). Together, these results suggest that NAM effectively increased NAD⁺ level in GRMD dogs.

In vivo NAM treatment appears to improve skeletal muscle function

These data led us to test whether boosting NAD⁺ content using NAM delays the progression of striated muscle dysfunction in DMD. We determined whether the treatment could improve force generation. In conjunction with the dystrophic pattern, tibiotarsal joint flexion force production was reduced in 5 and 6 month-old GRMD dogs compared with WT dogs, and slightly increased within this time period (**Figure 41A**). In the same way, NAM-treated dogs exhibited an increase of their muscle force between 5 and 6 months of age, but this increase was particularly important in one of the treated dogs. This same dog also presented an improved (decreased) half-relaxation time at the end of NAM treatment; such an evolution is unusual in age-matched untreated GRMD dogs which tend to increase their half-relaxation time within the same period of time (**Figure 41C**). From a more global and clinical point of view, a worsening of the clinical score in GRMD dogs is usually observed in the 2-6 months period, pinpointing the rapid evolution of the disease. Conversely, the clinical score of both treated dogs tended to stabilize during the treatment period (**Figure 41D**). Gait analysis using accelerometry evidenced a slight gait improvement in the treated dog that also had muscle force and relaxation improvement; again, such a favorable evolution is uncommon in untreated GRMD dogs (**Figure 41C**).

DISCUSSION

Given the importance of NAD⁺ in mitochondria dysfunction, energetic defect, calcium dysregulation, and oxidative stress, we sought to identify mechanisms linking NAD⁺ and striated muscles dysfunction in GRMD dogs. Previous studies in *mdx* mouse model of DMD identified NAD⁺ as a relevant therapeutic target for DMD (Ryu et al., 2016).

We have demonstrated here that muscular dystrophy in GRMD dogs is associated with muscle NAD⁺ depletion, which can potentially be monitored as an index of disease severity. Reduced NAD⁺ levels are likely the result of PARP activation and reduced protein expression of NAD⁺ salvage pathway. Two complementary strategies exist for manipulating tissue NAD⁺ pools. The first is to enhance NAD⁺ production by supplementing biosynthetic precursors (Yoshino et al., 2018). The second strategy is to

inhibit the enzymatic consumption of NAD⁺. Our study therefore demonstrates that boosting NAD⁺ production, using NAM, could be effective for managing the progression of muscular dystrophy in GRMD dogs (**Figure 42**). While primary NAD⁺ deficiency drives striated muscle weakness, our current data strongly suggest that the characteristic muscle weakness of GRMD dogs can be overcome by NAD⁺ boosting strategy. We used NAM, as opposed to NR as it has been described in two separated studies (Frederick et al., 2020; Ryu et al., 2016), given that NRK2 (the enzyme that converts NR into NMN) expression was lowered in striated muscle of GRMD dogs. This could partially explain the lack of benefit observed by Frederick and colleagues in mdx mice.

Recent studies indicate that dietary supplementation with NR protects against high-fat-diet-induced obesity (Cantó et al., 2012b), while improving hepatic function and protecting against diabetic neuropathy (Trammell et al., 2016). Similarly, NMN enhances insulin sensitivity in against high-fat-diet-fed mice (Yoshino et al., 2011). Moreover, these NAD⁺ precursors are effective at extending lifespan and reducing metabolic disease (Imai et al., 2000; Khan et al., 2014). NAM is one of three NAD⁺ precursor vitamins that is largely made available for NAD⁺ salvage via degradation of dietary NAD⁺. NAM has long been used to treat diverse disease conditions, such as inflammatory diseases and dementia, in humans and animal models (Williams, et al. 2016 Nature). In addition, it has been shown that chronic NAM supplementation improves health span measure (Mitchell et al., 2018).

Our study therefore demonstrates that the use of NAM could be effective for managing the progression of muscular dystrophy. Our observations may have broad implications for other neuromuscular diseases that are characterized by PARP activation.

MATERIALS AND METHODS

Animal. All procedures were approved by the Ethical Committee of EnvA, ANSES and UPEC and by the French Ministry of research under the respective approval numbers 2021-05-04-19 and #31081-2019112814263892 v10 and were performed in accordance with the relevant guidelines and regulations. Samples obtained from juvenile (6-month-old) and adult (older than 12-month-old) dogs were used for experiments.

NAM Supplementation. 500mg of Nicotinamide (Nicobion ND) were orally administrated to GRMD dogs twice a day in a piece of palatable food. The treatment duration was 1 month starting from 5 months of age, the day after the baseline *in vivo* functional evaluation tests and muscle biopsies.

Follow-up of dogs. The treated dogs were followed-up according to the following scheme. Clinical scores were performed monthly from the age of 2 months. Gait analysis using accelerometry was performed monthly before treatment initiation and weekly during the treatment period. In vivo force measurement and muscle biopsies were performed at baseline (5 months of age) and end-treatment (6 months of age).

Immunoblotting. Total proteins were isolated by resuspending striated muscle tissues in extraction buffer (Cell Signaling) completed with deacetylation inhibitors cocktail (Santa Cruz Biotechnology). The lysates were separated by 10% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and transferred to 0.45µm nitrocellulose membranes (Invitrogen). Blotted membranes being were blocked in 5% bovine serum albumin (BSA) in Tris-buffered saline containing 1% Tween 20 (TBS-T) for 1 h at room temperature followed by incubation overnight at 4°C with the appropriate primary antibody ([Table 8](#)). After washing with TBS-T, membranes were for 1h at room temperature incubated with secondary anti-rabbit or anti-mouse antibodies conjugated to a fluorescent dye ([Table 8](#)). Subsequent to being washed with TBS-T the signal was revealed using ChemiDoc MP Imaging System (Biorad). Bands were quantified using Image J software.

NAD⁺ concentration quantification. Fresh striated muscles tissues were homogenized and processed according to previous report (Sander et al., 1976b). The concentration of NAD⁺ was determined using a spectrophotometric assay as described previously (Bernofsky and Swan, 1973b). Absorption measurements were carried out in 96-well plates by spectrophotometry (Tecan).

Statistical analyses. Average, s.e.m and statistical significance were calculated by unpaired Student's t-test, Mann-Whitney-Wilcoxon Test, one-way ANOVA or Kruskal-Wallis one-way ANOVA using GraphPad Prism. P-values are indicated above columns.

REFERENCES

- Bai, P. (2015). Biology of Poly(ADP-Ribose) Polymerases: The Factotums of Cell Maintenance. *Mol Cell* 58, 947–958.
- Benjamin, R.C., and Gill, D.M. (1980). Poly(ADP-ribose) synthesis in vitro programmed by damaged DNA. A comparison of DNA molecules containing different types of strand breaks. *J Biol Chem* 255, 10502–10508.
- Berger, F., Ramírez-Hernández, M.H., and Ziegler, M. (2004). The new life of a centenarian: signalling functions of NAD(P). *Trends Biochem. Sci.* 29, 111–118.
- Bernofsky, C., and Swan, M. (1973). An improved cycling assay for nicotinamide adenine

- dinucleotide. *Anal. Biochem.* 53, 452–458.
- Bieganowski, P., and Brenner, C. (2004). Discoveries of nicotinamide riboside as a nutrient and conserved NRK genes establish a Preiss-Handler independent route to NAD⁺ in fungi and humans. *Cell* 117, 495–502.
- Cantó, C., Houtkooper, R.H., Pirinen, E., Youn, D.Y., Oosterveer, M.H., Cen, Y., Fernandez-Marcos, P.J., Yamamoto, H., Andreux, P.A., Cettour-Rose, P., et al. (2012). The NAD(+) precursor nicotinamide riboside enhances oxidative metabolism and protects against high-fat diet-induced obesity. *Cell Metab* 15, 838–847.
- Constantin, B. (2014). Dystrophin complex functions as a scaffold for signalling proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1838, 635–642.
- Duan, D. (2011). Duchenne muscular dystrophy gene therapy: Lost in translation? *Res Rep Biol* 2011, 31–42.
- Frederick, D.W., McDougal, A.V., Semenas, M., Vappiani, J., Nuzzo, A., Ulrich, J.C., Becherer, J.D., Preugschat, F., Stewart, E.L., Sévin, D.C., et al. (2020). Complementary NAD⁺ replacement strategies fail to functionally protect dystrophin-deficient muscle. *Skelet Muscle* 10, 30.
- Frontera, W.R., and Ochala, J. (2015). Skeletal muscle: a brief review of structure and function. *Calcif. Tissue Int.* 96, 183–195.
- Garten, A., Schuster, S., Penke, M., Gorski, T., de Giorgis, T., and Kiess, W. (2015). Physiological and pathophysiological roles of NAMPT and NAD metabolism. *Nat Rev Endocrinol* 11, 535–546.
- Goody, M.F., and Henry, C.A. (2018). A need for NAD⁺ in muscle development, homeostasis, and aging. *Skelet Muscle* 8, 9.
- Hoffman, E.P., Brown, R.H., and Kunkel, L.M. (1987). Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell* 51, 919–928.
- Hottiger, M.O., Hassa, P.O., Lüscher, B., Schüler, H., and Koch-Nolte, F. (2010). Toward a unified nomenclature for mammalian ADP-ribosyltransferases. *Trends Biochem. Sci.* 35, 208–219.
- Hsu, C.-P., Oka, S., Shao, D., Hariharan, N., and Sadoshima, J. (2009). Nicotinamide phosphoribosyltransferase regulates cell survival through NAD⁺ synthesis in cardiac myocytes. *Circ Res* 105, 481–491.
- Imai, S., and Guarente, L. (2014). NAD⁺ and sirtuins in aging and disease. *Trends Cell Biol.* 24, 464–471.
- Imai, S., Armstrong, C.M., Kaeberlein, M., and Guarente, L. (2000). Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase. *Nature* 403, 795–800.
- Khan, N.A., Auranen, M., Paetau, I., Pirinen, E., Euro, L., Forsström, S., Pasila, L., Velagapudi, V., Carroll, C.J., Auwerx, J., et al. (2014). Effective treatment of mitochondrial myopathy by nicotinamide riboside, a vitamin B3. *EMBO Mol Med* 6, 721–731.
- Koenig, M., Hoffman, E.P., Bertelson, C.J., Monaco, A.P., Feener, C., and Kunkel, L.M. (1987). Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals. *Cell* 50, 509–517.

- Kornegay, J.N. (2017). The golden retriever model of Duchenne muscular dystrophy. *Skelet Muscle* 7, 9.
- Langelier, M.-F., Planck, J.L., Roy, S., and Pascal, J.M. (2012). Structural basis for DNA damage-dependent poly(ADP-ribosyl)ation by human PARP-1. *Science* 336, 728–732.
- Mercuri, E., Bönnemann, C.G., and Muntoni, F. (2019). Muscular dystrophies. *Lancet* 394, 2025–2038.
- Mitchell, S.J., Bernier, M., Aon, M.A., Cortassa, S., Kim, E.Y., Fang, E.F., Palacios, H.H., Ali, A., Navas-Enamorado, I., Di Francesco, A., et al. (2018). Nicotinamide Improves Aspects of Healthspan, but Not Lifespan, in Mice. *Cell Metab* 27, 667-676.e4.
- Nelson, C.E., Wu, Y., Gemberling, M.P., Oliver, M.L., Waller, M.A., Bohning, J.D., Robinson-Hamm, J.N., Bulaklak, K., Castellanos Rivera, R.M., Collier, J.H., et al. (2019). Long-term evaluation of AAV-CRISPR genome editing for Duchenne muscular dystrophy. *Nat Med* 25, 427–432.
- Petrof, B.J., Shrager, J.B., Stedman, H.H., Kelly, A.M., and Sweeney, H.L. (1993). Dystrophin protects the sarcolemma from stresses developed during muscle contraction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 3710–3714.
- Pillai, V.B., Sundaresan, N.R., Kim, G., Gupta, M., Rajamohan, S.B., Pillai, J.B., Samant, S., Ravindra, P.V., Isbatan, A., and Gupta, M.P. (2010). Exogenous NAD blocks cardiac hypertrophic response via activation of the SIRT3-LKB1-AMP-activated kinase pathway. *J. Biol. Chem.* 285, 3133–3144.
- Rall, S., and Grimm, T. (2012). Survival in Duchenne muscular dystrophy. *Acta Myol* 31, 117–120.
- Ratajczak, J., Joffraud, M., Trammell, S.A.J., Ras, R., Canela, N., Boutant, M., Kulkarni, S.S., Rodrigues, M., Redpath, P., Migaud, M.E., et al. (2016). NRK1 controls nicotinamide mononucleotide and nicotinamide riboside metabolism in mammalian cells. *Nat Commun* 7, 13103.
- Revollo, J.R., Grimm, A.A., and Imai, S. (2004). The NAD biosynthesis pathway mediated by nicotinamide phosphoribosyltransferase regulates Sir2 activity in mammalian cells. *J Biol Chem* 279, 50754–50763.
- Ryu, D., Zhang, H., Ropelle, E.R., Sorrentino, V., Mázala, D.A.G., Mouchiroud, L., Marshall, P.L., Campbell, M.D., Ali, A.S., Knowels, G.M., et al. (2016). NAD⁺ repletion improves muscle function in muscular dystrophy and counters global PARylation. *Sci Transl Med* 8, 361ra139.
- Sander, B.J., Oelshlegel, F.J., and Brewer, G.J. (1976). Quantitative analysis of pyridine nucleotides in red blood cells: a single-step extraction procedure. *Anal. Biochem.* 71, 29–36.
- Stein, L.R., and Imai, S. (2012). The dynamic regulation of NAD metabolism in mitochondria. *Trends Endocrinol Metab* 23, 420–428.
- Trammell, S.A.J., Schmidt, M.S., Weidemann, B.J., Redpath, P., Jaksch, F., Dellinger, R.W., Li, Z., Abel, E.D., Migaud, M.E., and Brenner, C. (2016). Nicotinamide riboside is uniquely and orally bioavailable in mice and humans. *Nat Commun* 7, 12948.
- Valentine, B.A., Cooper, B.J., de Lahunta, A., O’Quinn, R., and Blue, J.T. (1988). Canine X-linked muscular dystrophy. An animal model of Duchenne muscular dystrophy: clinical

studies. *J Neurol Sci* 88, 69–81.

Villanova, M., and Kazibwe, S. (2017). New Survival Target for Duchenne Muscular Dystrophy. *Am J Phys Med Rehabil* 96, e28–e30.

Yoshino, J., Mills, K.F., Yoon, M.J., and Imai, S. (2011). Nicotinamide mononucleotide, a key NAD(+) intermediate, treats the pathophysiology of diet- and age-induced diabetes in mice. *Cell Metab.* 14, 528–536.

Yoshino, J., Baur, J.A., and Imai, S.-I. (2018). NAD+ Intermediates: The Biology and Therapeutic Potential of NMN and NR. *Cell Metab* 27, 513–528.

FIGURES

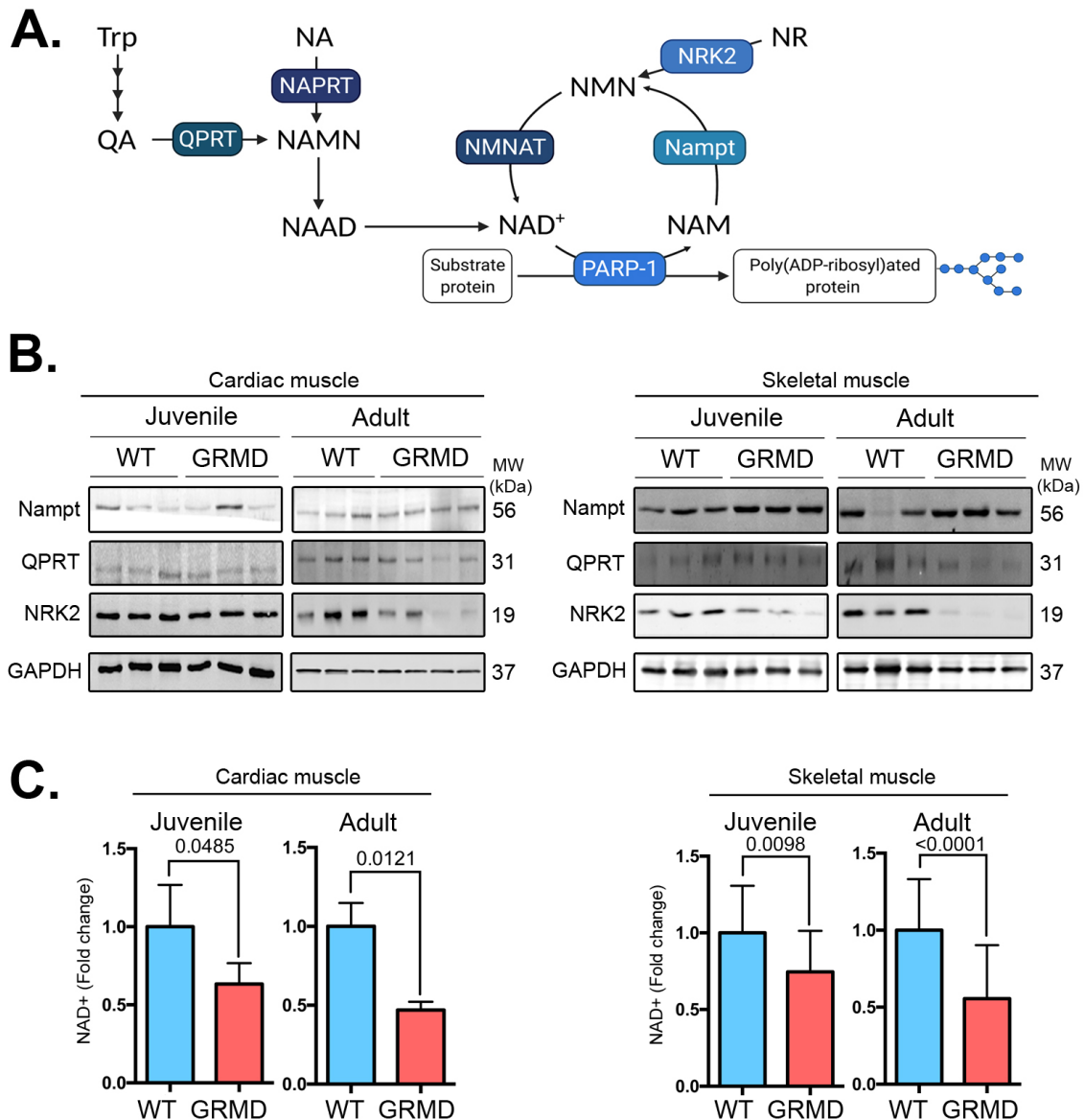


Figure 38 : NAD⁺ salvage pathway is altered in striated muscles of golden retriever muscular dystrophy

(A) Schematic representation of the NAD⁺ biosynthesis. (B) Immunoblots showing Nampt, QPRT and NRK2 protein levels in cardiac and skeletal from wild type (n = 3) and GRMD (n = 3) dogs at juvenile and adult age. GAPDH was used for normalization. (C) Quantification of cardiac and skeletal muscle NAD⁺ content (fold change) in wild type (n = 4-6) and GRMD at juvenile and adult age. Bars indicate mean ± standard error of mean and numbers above columns indicate *P*-values. Differences were analyzed by unpaired t-test.

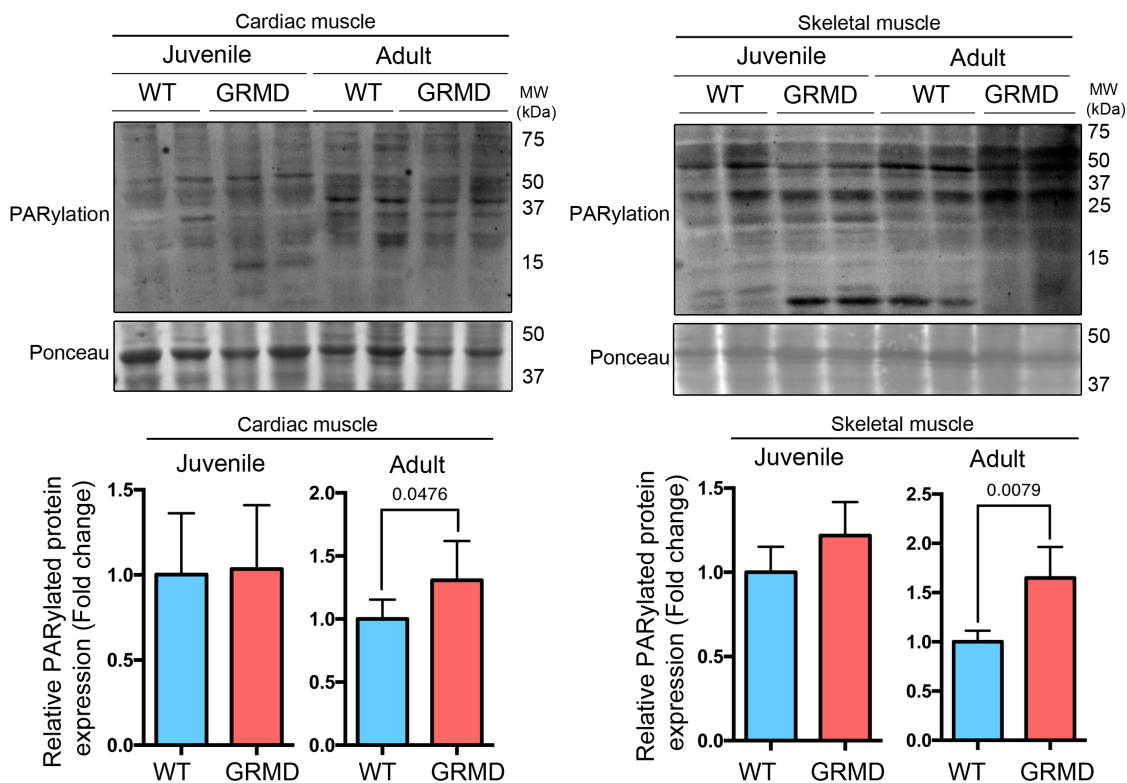


Figure 39 : Global Poly(ADP-ribosylation) is increased in striated muscles of golden retriever muscular dystrophy

Total PARylated protein level expression with PAR antibody (Fold change) in cardiac and skeletal muscle from juvenile and adult WT (n = 2) and GRMD (n = 2) dogs. Ponceau was shown as loading control. The bar graphs represent PARylated protein relative expression (mean ± standard error of means) (relative to ponceau). Differences were analyzed by Mann-Whitney test.

2.2 Projet annexe : rôle de la PARylation sur la fonction cardiaque et musculaire dans la dystrophie musculaire de Duchenne

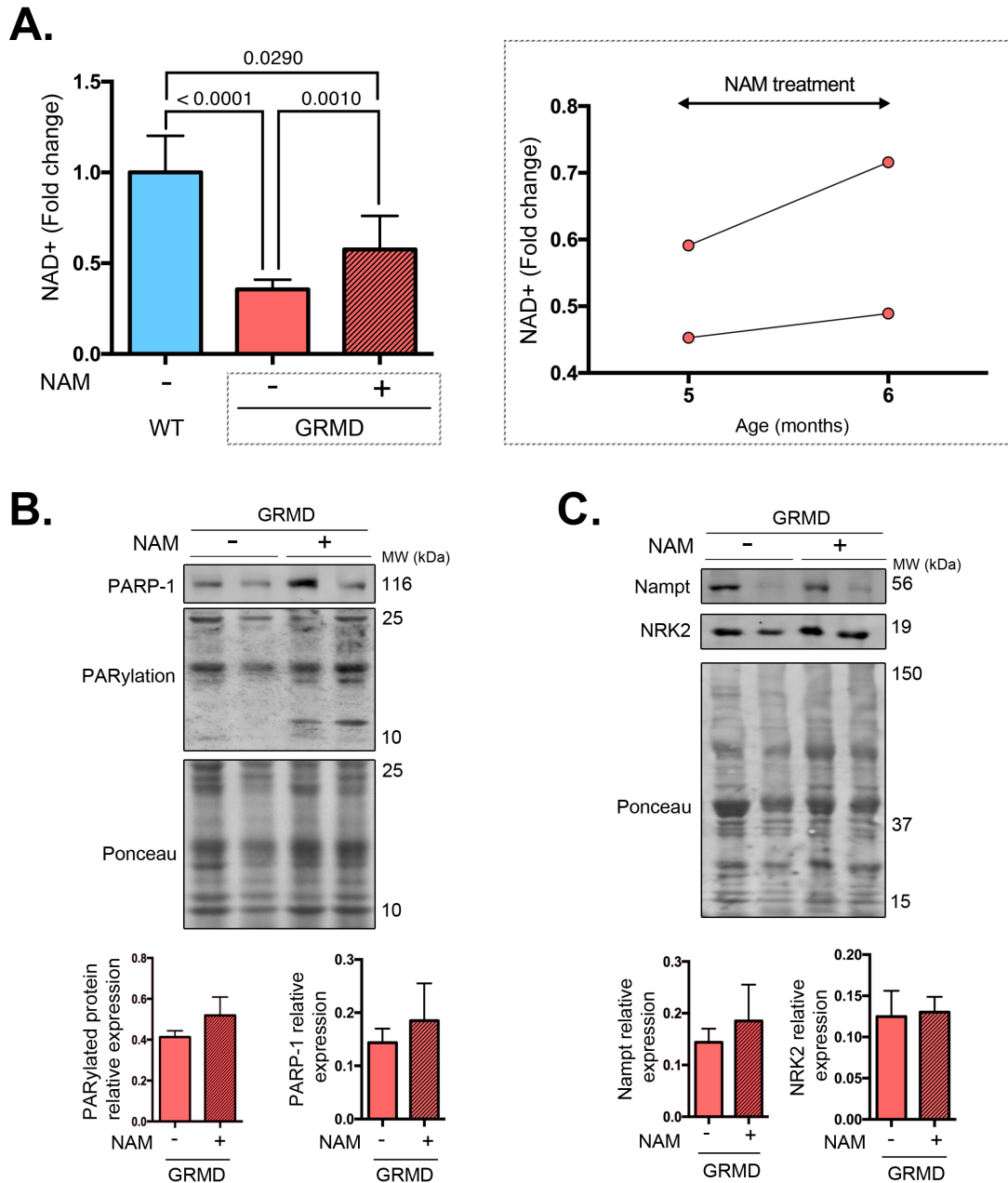


Figure 40 : NAM supplementation improves NAD⁺ levels in striated muscles of golden retriever muscular dystrophy

(A) Quantification of skeletal muscles NAD⁺ content (Fold change) from WT (n = 4), GRMD (n = 2) and NAM-treated GRMD (n = 2) dogs. Bars indicate means ± standard errors of means and numbers above columns indicate P-values. Differences were analyzed by Kruskal-Wallis test. (B) Immunoblots showing total PARylated protein level expression with PAR antibody (Fold change) in skeletal muscle from GRMD (n = 2) dogs treated or not with NAM. Ponceau was shown as loading control. The bar graphs represent PARylated protein relative expression (mean ± standard error of means) (relative to ponceau). (C) Immunoblots showing Nampt and NRK2 protein level expression (Fold change) in skeletal muscle from GRMD (n = 2) dogs treated or not with NAM. Ponceau was shown as loading control. The bar graphs represent PARP-1 and Nampt protein relative expression (mean ± standard error of means) (relative to ponceau).

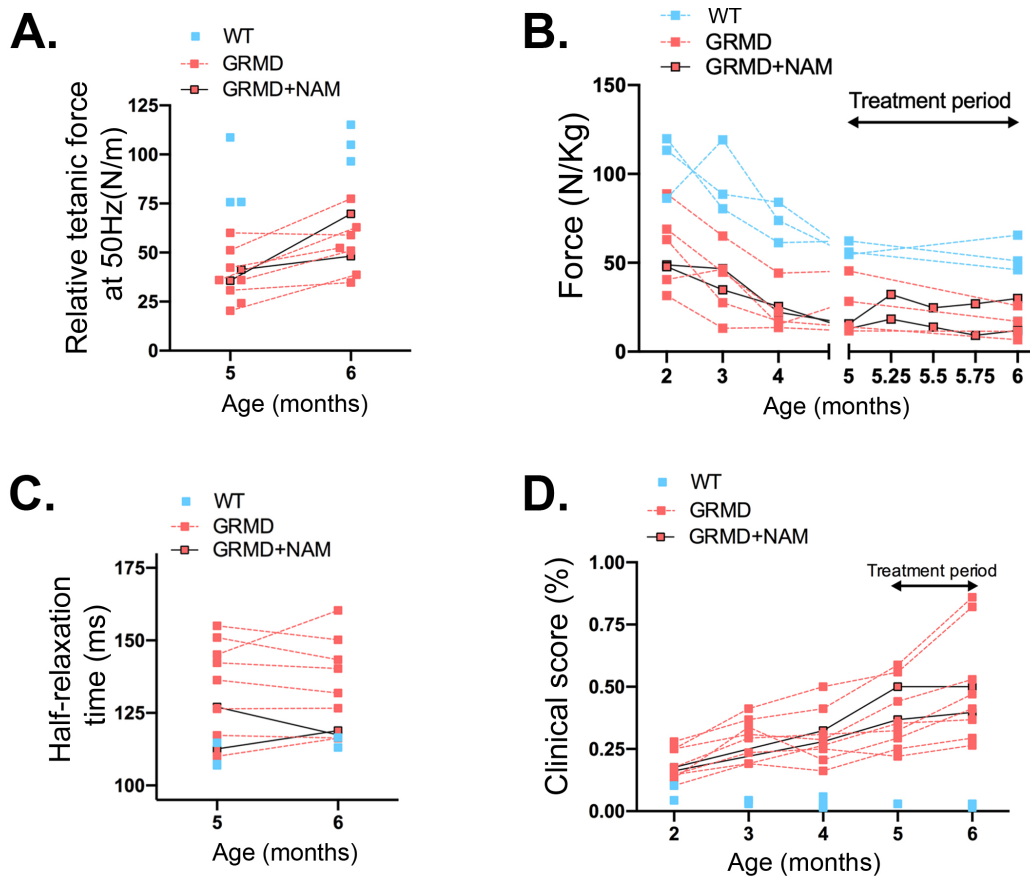


Figure 41 : NAM supplementation stabilized muscular function of golden retriever muscular dystrophy

(A) Relative tetanic force at 50 Hz in the two treated dogs before and after one month of NAM treatment, relative to age-matched WT (n=3) and untreated GRMD dogs (n=8). (B) Force production during gait measured by 3D-accelerometry: longitudinal follow-up in the two treated dogs during a 3 month-period before treatment, and during treatment, relative to age-matches WT (n=3) and untreated GRMD dogs (n=5 at inclusion, n=4 from 5 months of age) (C) Half-relaxation time after a tetanic contraction measured during in vivo force measurement test, in the two treated dogs, before treatment and after one month of NAM treatment, relative to age-matched WT (n=3) and untreated GRMD dogs (n=8). (D) Clinical score assessed monthly in the two treated dogs, relative to WT (n=3) and untreated GRMD dogs (n=8).

2.2 Projet annexe : rôle de la PARylation sur la fonction cardiaque et musculaire dans la dystrophie musculaire de Duchenne

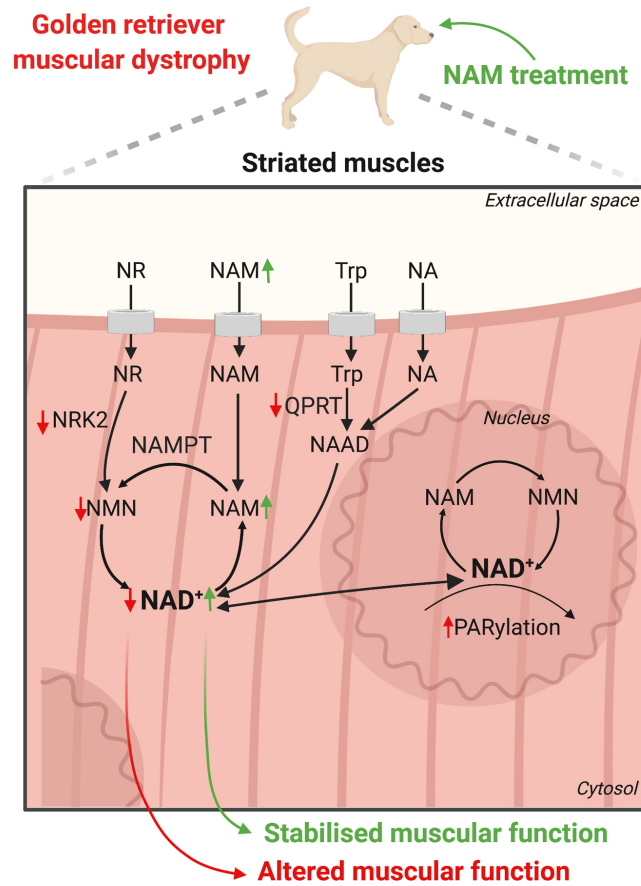


Figure 42 : Working model

Schematic representation of the mechanism of NAD⁺-mediated alteration of muscle performance and therapeutic intervention in DMD.

SUPPLEMENTARY

Supplementary Materials and Methods

Immunostaining and histology. Tissues were snap frozen in isopentane cooled in liquid nitrogen and stored at -80°C. Ten μm sections were cut and stained with H&E or sirius red. For immunostaining, sections were rehydrated in PBS and fixed with acetone-methanol (v:v). Endogen peroxidase activity was blocked by 3% H₂O₂, and sections were incubated in primary dystrophin antibody (NCL-Dys2, 1/20 In PBS 10% goat serum) 1h30 at room temperature. After washing with PBS, samples were incubated with secondary antibody (Goat anti-mouse IgG (H+L)-dextran polymer-HRP, Dako) for 30 minutes at room temperature. Staining was revealed using DAB (Dako) and counterstaining of nuclei was performed using hematein. Slices were mounted in Canada balsam medium. Immunostaining and stained slices were imaged in bright field under a Leica light microscope.

Clinical score. Dogs were clinically assessed using a previously described scoring grid, consisting of 17 items focusing on locomotor, postural, deglutition and respiratory criteria. Each item was graded from 0 (normal situation) to 2 (worse situation) and the sum of values of all the items was used for analysis, and expressed as a percentage of the maximal possible score.

Gait analysis. Gait quality was assessed using 3D-accelerometry as previously described. Briefly, dogs wearing a device containing 3 orthogonally-positioned accelerometers (Locometrix®), were encouraged to run or walk at their preferred gait and speed along a dedicated corridor. Accelerations generated near to the center of gravity at rest, in the three gait axes were recorded at 100 Hz. Traces were analyzed in the software Equimetrix. Total power was calculated as the sum of the integral of the power spectrum obtained by a Fast Fourier Transform on the trace obtained in each of the three axes. The force index was calculated by normalizing the total power by the gait speed, and was expressed in N/kg.

In vivo force measurement. Dogs under general anesthesia (induction with propofol, maintenance with isoflurane in 100% O₂) were positioned in dorsal recumbency and their left hindlimb was positioned in a dedicated ergometer. Knee and tarsus joints were maintained 90° flexed, the femur being vertically and the tibia horizontally positioned.

2.2 Projet annexe : rôle de la PARylation sur la fonction cardiaque et musculaire dans la dystrophie musculaire de Duchenne

The metatarsophalangeal segment was placed vertically and attached to a plate linked to two force transducers. Supramaximal stimulation of the peroneal nerve was performed to obtain twitch or tetanic contraction. Force values were normalized by the length of the tibial segment measured in the ergometer, to obtain relative force values.

Muscle biopsies. Muscle biopsies were performed on dogs under general anesthesia, with a morphine- analgesia. Biceps femoris and sartorius cranialis biopsies were taken surgically and immediately snap-frozen in isopentane cooled in liquid nitrogen or placed in 75% EtOH / 25% HEPES 10mM pH 7,1 buffer on ice for subsequent NAD extraction.

Antibody	Provider	Reference	Dilution
GAPDH (Rabbit)	Abcam	#ab8245	1/1000
Nampt (Rabbit)	Abcam	#ab4580	1/1000
Nrk2 (Rabbit)	US Biological	#037146	1/1000
PAR (Mouse)	EM Millipore	AM80	1/1000
PARP-1 (Rabbit)	Santa Cruz Biotechnology	#sc-8007	1/1000
QPRT (Rabbit)	Abcam	#ab171944	1/1000
Goat Anti-Mouse IgG StarBright Blue 520	Bio-Rad	#12005866	1/1000
Goat Anti-Rabbit IgG StarBright Blue 520	Bio-Rad	#12004161	1/1000

Table 8 : Antibodies used for western blotting

Supplementary data

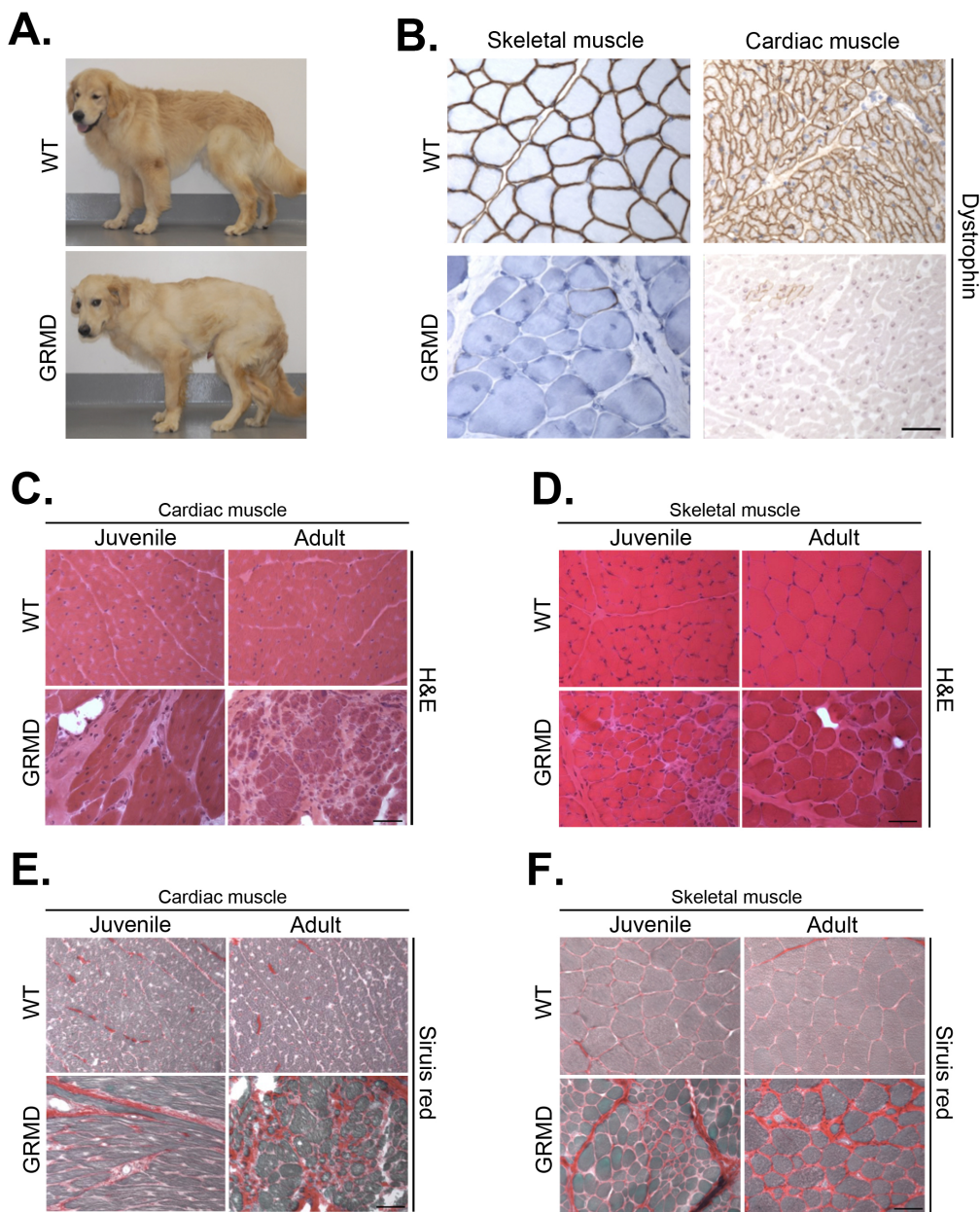


Figure 43 : *Golden retriever model of muscular dystrophy: a more translatable model to human DMD*

(A) Representative images of GR and GRMD dogs at 9 months of age (B) Dystrophin immunostaining on striated muscle sections from WT and GRMD dogs at 6 months of age and of cardiac muscle sections (left ventricular free wall) at 8 months of age. Scale bar, 50 μ m. (C) Representative heart sections from juvenile (6 month-old) or adult (12 month-old) WT and GRMD dogs stained with hematoxylin & eosin (H&E). Scale bar, 50 μ m. (D) Representative skeletal muscle (Biceps femoris) sections from juvenile (6 month-old) or adult (12 month-old) WT and GRMD dogs stained with hematoxylin & eosin (H&E). Scale bar, 50 μ m. (E) Representative heart sections (left ventricular free wall) from juvenile or adult WT and GRMD dogs stained with Sirius red. Scale bar, 50 μ m. (F) Representative skeletal muscle (Biceps femoris) sections from juvenile or adult WT and GRMD dogs stained with sirius red. Scale bar, 50 μ m.

Chapitre 3

CONCLUSION GENERALE

Pour conclure, ce travail de recherche a eu pour but de répondre à d'importantes problématiques qui limitent fortement la compréhension des syndromes de vieillissement prématuré à l'aide d'une série intégrée de modèles. Ces derniers nous ont permis de souligner le rôle de la PARylation sur l'apparition des troubles cardiovasculaires dans la progéria. J'ai démontré que l'expression de la progérine dans les VSMCs aortiques était associée à une augmentation des dommages à l'ADN qui induisent une augmentation de la PARylation afin de réparer ces dommages. Sachant que la PARylation consomme du NAD⁺, l'augmentation de la PARylation dans les VSMCs est responsable d'une utilisation accrue du NAD⁺ qui, en parallèle, est moins produit par la voie de sauvetage. En effet, nous avons montré un défaut d'expression de protéines impliquées dans cette voie. Ces changements, combinés à une altération de la fonction mitochondriale ainsi qu'à des changements épigénétiques, provoquent une chute des niveaux de NAD⁺ des VSMCs *Lmna*^{G609G/G609G}. Comme décrit dans la littérature, les chutes du niveau de NAD⁺, induites par la suractivation de PARP-1, constituent un stress cytotoxique cellulaire. Cela provoque un relargage par les mitochondries du facteur AIF qui transite vers le noyau par le cytoplasme pour déclencher l'apoptose caspase indépendante appelée *Parthanatos*. Ce mécanisme, confirmé dans les VSMCs *Lmna*^{G609G/G609G}, conduirait ainsi à la perte de ces cellules qui seraient d'avantage sensibles aux chutes de NAD⁺ de par leur besoin énergétique important pour leur fonction contractile. Par ailleurs, cette hypothèse est renforcée par l'étude de la PARylation tant dans le muscle squelettique que dans le cœur de chien GRMD. Nous avons en effet également démontré une chute des niveaux de NAD⁺ qui, lorsqu'elle est atténuée par un traitement au nicotinamide, améliore la fonction musculaire. Ce résultat nécessite cependant d'être confirmé en augmentant le nombre de chiens traités au NAM ainsi que la durée du traitement. La fonction musculaire étant dépendante de la réserve énergétique, les cellules musculaires dont les taux de NAD⁺ sont faibles à la suite d'une protéine mutée ou absente confèrent une pathologie à l'ensemble du tissu. En effet, le traitement des souris *Lmna*^{G609G/+} avec un inhibiteur de la PARylation permet de restaurer les niveaux de NAD⁺ et de diminuer la perte des VSMCs et par conséquent, la pathologie vasculaire (**Figure 44**). Bien que ce résultat confirme le lien entre PARylation et pathologie vasculaire, il est néanmoins nécessaire de le confirmer dans le modèle *Lmna*^{G609G/G609G}.

Collectivement, ces résultats soutiennent la thèse que la PARylation joue un rôle sur l'apparition des troubles cardiovasculaires dans la progéria de Hutchinson-Gilford offrant d'une part, une meilleure compréhension des mécanismes physiopathologiques et d'autre part, ouvrant la voie à de nouveaux travaux pour la mise au point de traitements novateurs contre les atteintes cardiovasculaires dans la progéria mais également dans le vieillissement en général.

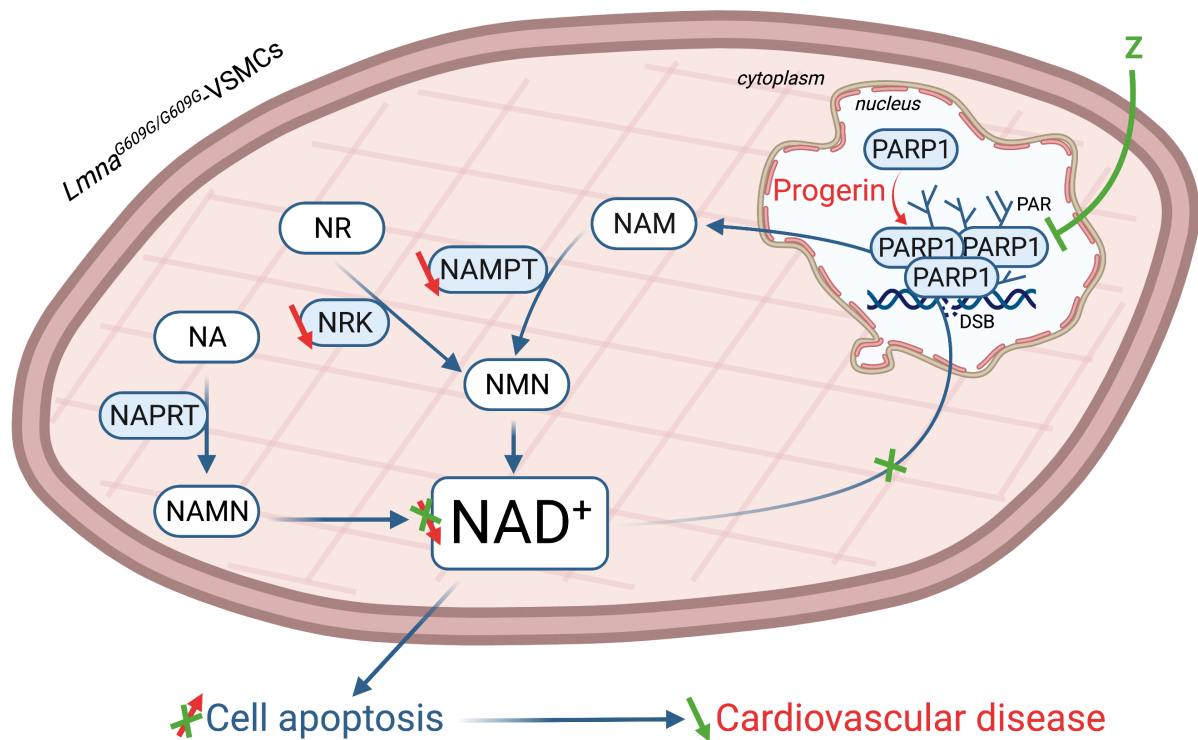


Figure 44 : Schéma bilan représentant le mécanisme par lequel la PARylation conduit à la perte des VSMCs *Lmna*^{G609G/G609G}

DSB : double strand breaks ; NA : nicotinic acid ; NAD⁺ : nicotinamide adénine dinucléotide ; NAM : nicotinamide ; NAMN : nicotinic acid mononucleotide ; NAMPT : nicotinamide phospho-ribosyl-transférase ; NAPRT : nicotinic acid phospho-ribosyl-transférase ; NMN : nicotinamide mononucléotide ; NR : nicotinamide riboside ; NRK : nicotinamide riboside kinase ; PAR : poly(ADP-ribose) ; PARP : poly(ADP-Ribose)polymérase ; VSMCs : vascular smooth muscle cells ; Z : molécule inhibitrice de PARP-1.

Chapitre 4

BIBLIOGRAPHIE

- Aaronson, R.P., and Blobel, G. (1975). Isolation of nuclear pore complexes in association with a lamina. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72, 1007–1011.
- Aebi, U., Cohn, J., Buhle, L., and Gerace, L. (1986). The nuclear lamina is a meshwork of intermediate-type filaments. *Nature* 323, 560–564.
- Afonso, P., Auclair, M., Boccara, F., Vantyghem, M.-C., Katlama, C., Capeau, J., Vigouroux, C., and Caron-Debarle, M. (2016). LMNA mutations resulting in lipodystrophy and HIV protease inhibitors trigger vascular smooth muscle cell senescence and calcification: Role of ZMPSTE24 downregulation. *Atherosclerosis* 245, 200–211.
- Aguado, J., Sola-Carvajal, A., Cancila, V., Revêchon, G., Ong, P.F., Jones-Weinert, C.W., Arzt, E., Lattanzi, G., Dreesen, O., Tripodo, C., et al. (2019). Inhibition of DNA damage response at telomeres improves the detrimental phenotypes of Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome. *Nat Commun* 10, 4990.
- Ahmed, M.S., Ikram, S., Bibi, N., and Mir, A. (2018). Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome: A Premature Aging Disease. *Mol Neurobiol* 55, 4417–4427.
- Aliper, A.M., Csoka, A.B., Buzdin, A., Jetka, T., Roumiantsev, S., Moskalev, A., and Zhavoronkov, A. (2015). Signaling pathway activation drift during aging: Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome fibroblasts are comparable to normal middle-age and old-age cells. *Aging (Albany NY)* 7, 26–37.
- Amé, J.C., Rolli, V., Schreiber, V., Niedergang, C., Apiou, F., Decker, P., Muller, S., Höger, T., Ménissier-de Murcia, J., and de Murcia, G. (1999). PARP-2, A novel mammalian DNA damage-dependent poly(ADP-ribose) polymerase. *J Biol Chem* 274, 17860–17868.
- Andrabi, S.A., Kim, N.S., Yu, S.-W., Wang, H., Koh, D.W., Sasaki, M., Klaus, J.A., Otsuka, T., Zhang, Z., Koehler, R.C., et al. (2006). Poly(ADP-ribose) (PAR) polymer is a death signal. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 18308–18313.
- Andrés, V., and González, J.M. (2009). Role of A-type lamins in signaling, transcription, and chromatin organization. *J Cell Biol* 187, 945–957.
- Ansari, H.R., and Raghava, G.P.S. (2010). Identification of NAD interacting residues in proteins. *BMC Bioinformatics* 11, 160.
- Arciniegas, E., Ponce, L., Hartt, Y., Graterol, A., and Carlini, R.G. (2000). Intimal thickening involves transdifferentiation of embryonic endothelial cells. *Anat Rec* 258, 47–57.
- Armulik, A., Abramsson, A., and Betsholtz, C. (2005). Endothelial/pericyte interactions. *Circ Res* 97, 512–523.
- Atchison, L., Zhang, H., Cao, K., and Truskey, G.A. (2017). A Tissue Engineered Blood Vessel Model of Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome Using Human iPSC-derived Smooth Muscle Cells. *Sci Rep* 7, 8168.
- Aveleira, C.A., Ferreira-Marques, M., Cortes, L., Valero, J., Pereira, D., Pereira de Almeida, L., and Cavadas, C. (2020). Neuropeptide Y Enhances Progerin Clearance and Ameliorates the Senescent Phenotype of Human Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome Cells. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 75, 1073–1078.
- Bai, P. (2015). Biology of Poly(ADP-Ribose) Polymerases: The Factotums of Cell Maintenance. *Mol Cell* 58, 947–958.
- Baker, P.B., Baba, N., and Boesel, C.P. (1981). Cardiovascular abnormalities in progeria. Case report and review of the literature. *Arch Pathol Lab Med* 105, 384–386.

- Banasik, M., Komura, H., Shimoyama, M., and Ueda, K. (1992). Specific inhibitors of poly(ADP-ribose) synthetase and mono(ADP-ribosyl)transferase. *J Biol Chem* 267, 1569–1575.
- Barascu, A., Le Chalony, C., Pennarun, G., Genet, D., Zaarour, N., and Bertrand, P. (2012). Oxidative stress alters nuclear shape through lamins dysregulation: a route to senescence. *Nucleus* 3, 411–417.
- Baricheva, E.A., Berrios, M., Bogachev, S.S., Borisevich, I.V., Lapik, E.R., Sharakhov, I.V., Stuurman, N., and Fisher, P.A. (1996). DNA from *Drosophila melanogaster* beta-heterochromatin binds specifically to nuclear lamins in vitro and the nuclear envelope in situ. *Gene* 171, 171–176.
- Barthélémy, F., Navarro, C., Fayek, R., Da Silva, N., Roll, P., Sigaudy, S., Oshima, J., Bonne, G., Papadopoulou-Legbelou, K., Evangeliou, A.E., et al. (2015). Truncated prelamin A expression in HGPS-like patients: a transcriptional study. *Eur J Hum Genet* 23, 1051–1061.
- Barton, L.J., Soshnev, A.A., and Geyer, P.K. (2015). Networking in the nucleus: a spotlight on LEM-domain proteins. *Curr Opin Cell Biol* 34, 1–8.
- Benedicto, I., Dorado, B., and Andrés, V. (2021). Molecular and Cellular Mechanisms Driving Cardiovascular Disease in Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome: Lessons Learned from Animal Models. *Cells* 10, 1157.
- 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.
- Benjamin, R.C., and Gill, D.M. (1980). Poly(ADP-ribose) synthesis in vitro programmed by damaged DNA. A comparison of DNA molecules containing different types of strand breaks. *J Biol Chem* 255, 10502–10508.
- Benson, E.K., Lee, S.W., and Aaronson, S.A. (2010). Role of progerin-induced telomere dysfunction in HGPS premature cellular senescence. *J Cell Sci* 123, 2605–2612.
- Berger, F., Ramírez-Hernández, M.H., and Ziegler, M. (2004). The new life of a centenarian: signalling functions of NAD(P). *Trends Biochem. Sci.* 29, 111–118.
- Bergo, M.O., Gavino, B., Ross, J., Schmidt, W.K., Hong, C., Kendall, L.V., Mohr, A., Meta, M., Genant, H., Jiang, Y., et al. (2002). *Zmpste24* deficiency in mice causes spontaneous bone fractures, muscle weakness, and a prelamin A processing defect. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 13049–13054.
- Bernofsky, C., and Swan, M. (1973a). An improved cycling assay for nicotinamide adenine dinucleotide. *Anal Biochem* 53, 452–458.
- Bernofsky, C., and Swan, M. (1973b). An improved cycling assay for nicotinamide adenine dinucleotide. *Anal. Biochem.* 53, 452–458.
- Bertrand, A.T., Chikhaoui, K., Ben Yaou, R., and Bonne, G. (2011). [Laminopathies: one gene, several diseases]. *Biol Aujourd'hui* 205, 147–162.
- Bertrand, P., Saintigny, Y., and Lopez, B.S. (2004). p53's double life: transactivation-independent repression of homologous recombination. *Trends Genet* 20, 235–243.
- Beyret, E., Liao, H.-K., Yamamoto, M., Hernandez-Benitez, R., Fu, Y., Erikson, G., Reddy, P., and Izpisua Belmonte, J.C. (2019). Single-dose CRISPR-Cas9 therapy extends lifespan of

- mice with Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Nat Med* 25, 419–422.
- Biamonti, G., Giacca, M., Perini, G., Contreas, G., Zentilin, L., Weighardt, F., Guerra, M., Della Valle, G., Saccone, S., and Riva, S. (1992). The gene for a novel human lamin maps at a highly transcribed locus of chromosome 19 which replicates at the onset of S-phase. *Mol Cell Biol* 12, 3499–3506.
- Bieganowski, P., and Brenner, C. (2004). Discoveries of nicotinamide riboside as a nutrient and conserved NRK genes establish a Preiss-Handler independent route to NAD⁺ in fungi and humans. *Cell* 117, 495–502.
- Birnkrant, D.J., Bushby, K., Bann, C.M., Apkon, S.D., Blackwell, A., Brumbaugh, D., Case, L.E., Clemens, P.R., Hadjiyannakis, S., Pandya, S., et al. (2018). Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 1: diagnosis, and neuromuscular, rehabilitation, endocrine, and gastrointestinal and nutritional management. *Lancet Neurol* 17, 251–267.
- Blackburn, E.H. (2001). Switching and signaling at the telomere. *Cell* 106, 661–673.
- Blondel, S., Egesipe, A.-L., Picardi, P., Jaskowiak, A.-L., Notarnicola, M., Ragot, J., Tournois, J., Le Corf, A., Brinon, B., Poydenot, P., et al. (2016). Drug screening on Hutchinson Gilford progeria pluripotent stem cells reveals aminopyrimidines as new modulators of farnesylation. *Cell Death Dis* 7, e2105.
- Boehler, C., Gauthier, L., Yelamos, J., Noll, A., Schreiber, V., and Dantzer, F. (2011). Phenotypic characterization of Parp-1 and Parp-2 deficient mice and cells. *Methods Mol Biol* 780, 313–336.
- Bogan, K.L., and Brenner, C. (2008). Nicotinic acid, nicotinamide, and nicotinamide riboside: a molecular evaluation of NAD⁺ precursor vitamins in human nutrition. *Annu Rev Nutr* 28, 115–130.
- Bonne, G., Di Barletta, M.R., Varnous, S., Bécane, H.M., Hammouda, E.H., Merlini, L., Muntoni, F., Greenberg, C.R., Gary, F., Urtizbera, J.A., et al. (1999). Mutations in the gene encoding lamin A/C cause autosomal dominant Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Nat Genet* 21, 285–288.
- Boujrad, H., Gubkina, O., Robert, N., Krantic, S., and Susin, S.A. (2007). AIF-mediated programmed necrosis: a highly regulated way to die. *Cell Cycle* 6, 2612–2619.
- Boutouja, F., Stiehm, C.M., and Platta, H.W. (2019). mTOR: A Cellular Regulator Interface in Health and Disease. *Cells* 8, E18.
- Brassard, J.A., Fekete, N., Garnier, A., and Hoesli, C.A. (2016). Hutchinson-Gilford progeria syndrome as a model for vascular aging. *Biogerontology* 17, 129–145.
- Briand, N., and Collas, P. (2018). Laminopathy-causing lamin A mutations reconfigure lamina-associated domains and local spatial chromatin conformation. *Nucleus* 9, 216–226.
- Brochu, G., Duchaine, C., Thibeault, L., Lagueux, J., Shah, G.M., and Poirier, G.G. (1994). Mode of action of poly(ADP-ribose) glycohydrolase. *Biochim Biophys Acta* 1219, 342–350.
- Broers, J.L., Machiels, B.M., van Eys, G.J., Kuijpers, H.J., Manders, E.M., van Driel, R., and Ramaekers, F.C. (1999). Dynamics of the nuclear lamina as monitored by GFP-tagged A-type lamins. *J Cell Sci* 112 (Pt 20), 3463–3475.

- Broers, J.L.V., Ramaekers, F.C.S., Bonne, G., Yaou, R.B., and Hutchison, C.J. (2006). Nuclear lamins: laminopathies and their role in premature ageing. *Physiol Rev* 86, 967–1008.
- Bröker, L.E., Kruyt, F.A.E., and Giaccone, G. (2005). Cell death independent of caspases: a review. *Clin Cancer Res* 11, 3155–3162.
- Bryant, H.E., Petermann, E., Schultz, N., Jemth, A.-S., Loseva, O., Issaeva, N., Johansson, F., Fernandez, S., McGlynn, P., and Helleday, T. (2009). PARP is activated at stalled forks to mediate Mre11-dependent replication restart and recombination. *EMBO J* 28, 2601–2615.
- Burke, B., and Stewart, C.L. (2013). The nuclear lamins: flexibility in function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 14, 13–24.
- Bürkle, A., and Virág, L. (2013). Poly(ADP-ribose): PARadigms and PARadoxes. *Mol Aspects Med* 34, 1046–1065.
- Bushby, K., Finkel, R., Birnkrant, D.J., Case, L.E., Clemens, P.R., Cripe, L., Kaul, A., Kinnett, K., McDonald, C., Pandya, S., et al. (2010). Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 1: diagnosis, and pharmacological and psychosocial management. *Lancet Neurol* 9, 77–93.
- Butala, P., Szpalski, C., Soares, M., Davidson, E.H., Knobel, D., and Warren, S.M. (2012). Zmpste24^{-/-} mouse model for senescent wound healing research. *Plast Reconstr Surg* 130, 788e–798e.
- Cabanillas, R., Cadiñanos, J., Villameytide, J.A.F., Pérez, M., Longo, J., Richard, J.M., Alvarez, R., Durán, N.S., Illán, R., González, D.J., et al. (2011). Néstor-Guillermo progeria syndrome: a novel premature aging condition with early onset and chronic development caused by BANF1 mutations. *Am J Med Genet A* 155A, 2617–2625.
- Campbell, K.P., and Kahl, S.D. (1989). Association of dystrophin and an integral membrane glycoprotein. *Nature* 338, 259–262.
- Camps, J., Wangsa, D., Falke, M., Brown, M., Case, C.M., Erdos, M.R., and Ried, T. (2014). Loss of lamin B1 results in prolongation of S phase and decondensation of chromosome territories. *FASEB J* 28, 3423–3434.
- Cantó, C., Houtkooper, R.H., Pirinen, E., Youn, D.Y., Oosterveer, M.H., Cen, Y., Fernandez-Marcos, P.J., Yamamoto, H., Andreux, P.A., Cettour-Rose, P., et al. (2012a). The NAD(+) precursor nicotinamide riboside enhances oxidative metabolism and protects against high-fat diet-induced obesity. *Cell Metab.* 15, 838–847.
- Cantó, C., Houtkooper, R.H., Pirinen, E., Youn, D.Y., Oosterveer, M.H., Cen, Y., Fernandez-Marcos, P.J., Yamamoto, H., Andreux, P.A., Cettour-Rose, P., et al. (2012b). The NAD(+) precursor nicotinamide riboside enhances oxidative metabolism and protects against high-fat diet-induced obesity. *Cell Metab* 15, 838–847.
- Cantó, C., Menzies, K.J., and Auwerx, J. (2015). NAD(+) Metabolism and the Control of Energy Homeostasis: A Balancing Act between Mitochondria and the Nucleus. *Cell Metab* 22, 31–53.
- Cao, K., Blair, C.D., Faddah, D.A., Kieckhafer, J.E., Olive, M., Erdos, M.R., Nabel, E.G., and Collins, F.S. (2011a). Progerin and telomere dysfunction collaborate to trigger cellular senescence in normal human fibroblasts. *J Clin Invest* 121, 2833–2844.
- Cao, K., Graziotto, J.J., Blair, C.D., Mazzulli, J.R., Erdos, M.R., Krainc, D., and Collins, F.S.

- (2011b). Rapamycin reverses cellular phenotypes and enhances mutant protein clearance in Hutchinson-Gilford progeria syndrome cells. *Sci Transl Med* 3, 89ra58.
- Capell, B.C., and Collins, F.S. (2006). Human laminopathies: nuclei gone genetically awry. *Nat Rev Genet* 7, 940–952.
- 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, 12879–12884.
- Cardoso, D., and Muchir, A. (2020). Need for NAD⁺: Focus on Striated Muscle Laminopathies. *Cells* 9, E2248.
- Carmeliet, P. (2000). Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med* 6, 389–395.
- Carrero, D., Soria-Valles, C., and López-Otín, C. (2016). Hallmarks of progeroid syndromes: lessons from mice and reprogrammed cells. *Dis Model Mech* 9, 719–735.
- Cau, P., Navarro, C., Harhour, K., Roll, P., Sigaudy, S., Kaspi, E., Perrin, S., De Sandre-Giovannoli, A., and Lévy, N. (2014). Nuclear matrix, nuclear envelope and premature aging syndromes in a translational research perspective. *Semin Cell Dev Biol* 29, 125–147.
- Caux, F., Dubosclard, E., Lascols, O., Buendia, B., Chazouillères, O., Cohen, A., Courvalin, J.-C., Laroche, L., Capeau, J., Vigouroux, C., et al. (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.
- Cesarone, C.F., Scarabelli, L., Giannoni, P., Gallo, G., and Orunesu, M. (1990). Relationship between poly(ADP-ribose) polymerase activity and DNA synthesis in cultured hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 171, 1037–1043.
- Chambon, P., Weill, J.D., and Mandel, P. (1963). Nicotinamide mononucleotide activation of new DNA-dependent polyadenylic acid synthesizing nuclear enzyme. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 11, 39–43.
- Chaudhry, R., Miao, J.H., and Rehman, A. (2021). Physiology, Cardiovascular. In *StatPearls*, (Treasure Island (FL): StatPearls Publishing), p.
- Chen, H., Chen, X., and Zheng, Y. (2013). The nuclear lamina regulates germline stem cell niche organization via modulation of EGFR signaling. *Cell Stem Cell* 13, 73–86.
- Chen, N.Y., Yang, Y., Weston, T.A., Belling, J.N., Heizer, P., Tu, Y., Kim, P., Edillo, L., Jonas, S.J., Weiss, P.S., et al. (2019). An absence of lamin B1 in migrating neurons causes nuclear membrane ruptures and cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 116, 25870–25879.
- Chen, Z.-J., Wang, W.-P., Chen, Y.-C., Wang, J.-Y., Lin, W.-H., Tai, L.-A., Liou, G.-G., Yang, C.-S., and Chi, Y.-H. (2014). Dysregulated interactions between lamin A and SUN1 induce abnormalities in the nuclear envelope and endoplasmic reticulum in progeric laminopathies. *J Cell Sci* 127, 1792–1804.
- Chi, P., Allis, C.D., and Wang, G.G. (2010). Covalent histone modifications--miswritten, misinterpreted and mis-erased in human cancers. *Nat Rev Cancer* 10, 457–469.
- Chojnowski, A., Ong, P.F., Wong, E.S.M., Lim, J.S.Y., Mutalif, R.A., Navasankari, R., Dutta, B., Yang, H., Liow, Y.Y., Sze, S.K., et al. (2015a). Progerin reduces LAP2 α -telomere

- association in Hutchinson-Gilford progeria. *Elife* 4.
- Chojnowski, A., Ong, P.F., Wong, E.S.M., Lim, J.S.Y., Mutalif, R.A., Navasankari, R., Dutta, B., Yang, H., Liow, Y.Y., Sze, S.K., et al. (2015b). Progerin reduces LAP2 α -telomere association in Hutchinson-Gilford progeria. *Elife* 4.
- Ciccia, A., and Elledge, S.J. (2010). The DNA Damage Response: Making it safe to play with knives. *Mol Cell* 40, 179–204.
- Cobb, A.M., Larrieu, D., Warren, D.T., Liu, Y., Srivastava, S., Smith, A.J.O., Bowater, R.P., Jackson, S.P., and Shanahan, C.M. (2016). Prelamin A impairs 53BP1 nuclear entry by mislocalizing NUP153 and disrupting the Ran gradient. *Aging Cell* 15, 1039–1050.
- Cohen, M.S., and Chang, P. (2018). Insights into the biogenesis, function, and regulation of ADP-ribosylation. *Nat Chem Biol* 14, 236–243.
- Cohen-Armon, M., Visochek, L., Rozensal, D., Kalal, A., Geistrikh, I., Klein, R., Bendetz-Nezer, S., Yao, Z., and Seger, R. (2007). DNA-independent PARP-1 activation by phosphorylated ERK2 increases Elk1 activity: a link to histone acetylation. *Mol Cell* 25, 297–308.
- Constantin, B. (2014). Dystrophin complex functions as a scaffold for signalling proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1838, 635–642.
- 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.
- Cortes, U., Tong, W.-M., Coyle, D.L., Meyer-Ficca, M.L., Meyer, R.G., Petrilli, V., Herceg, Z., Jacobson, E.L., Jacobson, M.K., and Wang, Z.-Q. (2004). Depletion of the 110-Kilodalton Isoform of Poly(ADP-Ribose) Glycohydrolase Increases Sensitivity to Genotoxic and Endotoxic Stress in Mice. *Mol Cell Biol* 24, 7163–7178.
- Covarrubias, A.J., Perrone, R., Grozio, A., and Verdin, E. (2021). NAD⁺ metabolism and its roles in cellular processes during ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 22, 119–141.
- Crisafulli, S., Sultana, J., Fontana, A., Salvo, F., Messina, S., and Trifirò, G. (2020). Global epidemiology of Duchenne muscular dystrophy: an updated systematic review and meta-analysis. *Orphanet J Rare Dis* 15, 141.
- Crisp, M., Liu, Q., Roux, K., Rattner, J.B., Shanahan, C., Burke, B., Stahl, P.D., and Hodzic, D. (2006). Coupling of the nucleus and cytoplasm: role of the LINC complex. *J Cell Biol* 172, 41–53.
- Csoka, A.B., Cao, H., Sammak, P.J., Constantinescu, D., Schatten, G.P., and Hegele, R.A. (2004a). Novel lamin A/C gene (LMNA) mutations in atypical progeroid syndromes. *J Med Genet* 41, 304–308.
- Csoka, A.B., English, S.B., Simkevich, C.P., Ginzinger, D.G., Butte, A.J., Schatten, G.P., Rothman, F.G., and Sedivy, J.M. (2004b). Genome-scale expression profiling of Hutchinson-Gilford progeria syndrome reveals widespread transcriptional misregulation leading to mesodermal/mesenchymal defects and accelerated atherosclerosis. *Aging Cell* 3, 235–243.
- Curtin, N.J., and Szabo, C. (2020a). Poly(ADP-ribose) polymerase inhibition: past, present and future. *Nat Rev Drug Discov* 19, 711–736.
- Curtin, N.J., and Szabo, C. (2020b). Poly(ADP-ribose) polymerase inhibition: past, present

- and future. *Nat Rev Drug Discov* 19, 711–736.
- Dahl, K.N., Scaffidi, P., Islam, M.F., Yodh, A.G., Wilson, K.L., and Misteli, T. (2006). Distinct structural and mechanical properties of the nuclear lamina in Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 10271–10276.
- Dali-Youcef, N., Lagouge, M., Froelich, S., Koehl, C., Schoonjans, K., and Auwerx, J. (2007). Sirtuins: the “magnificent seven”, function, metabolism and longevity. *Ann Med* 39, 335–345.
- Dantzer, F., de La Rubia, G., Ménissier-De Murcia, J., Hostomsky, Z., de Murcia, G., and Schreiber, V. (2000). Base excision repair is impaired in mammalian cells lacking Poly(ADP-ribose) polymerase-1. *Biochemistry* 39, 7559–7569.
- De Sandre-Giovannoli, A., Chaouch, M., Kozlov, S., Vallat, J.-M., Tazir, M., Kassouri, N., Szepetowski, P., Hammadouche, T., Vandenberghe, A., Stewart, C.L., et al. (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.
- De Sandre-Giovannoli, A., Bernard, R., Cau, P., Navarro, C., Amiel, J., Boccaccio, I., Lyonnet, S., Stewart, C.L., Munnich, A., Le Merrer, M., et al. (2003). Lamin a truncation in Hutchinson-Gilford progeria. *Science* 300, 2055.
- Dechat, T., Pflieger, K., Sengupta, K., Shimi, T., Shumaker, D.K., Solimando, L., and Goldman, R.D. (2008). Nuclear lamins: major factors in the structural organization and function of the nucleus and chromatin. *Genes Dev* 22, 832–853.
- 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.
- Del Campo, L., Sánchez-López, A., Salaices, M., von Kleeck, R.A., Expósito, E., González-Gómez, C., Cussó, L., Guzmán-Martínez, G., Ruiz-Cabello, J., Desco, M., et al. (2019). Vascular smooth muscle cell-specific progerin expression in a mouse model of Hutchinson-Gilford progeria syndrome promotes arterial stiffness: Therapeutic effect of dietary nitrite. *Aging Cell* 18, e12936.
- Delbarre, E., Tramier, M., Coppey-Moisan, M., Gaillard, C., Courvalin, J.-C., 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.
- Dhillon, S. (2021). Lonafarnib: First Approval. *Drugs* 81, 283–289.
- Diguet, N., Trammell, S.A.J., Tannous, C., Deloux, R., Piquereau, J., Mougnot, N., Gouge, A., Gressette, M., Manoury, B., Blanc, J., et al. (2018). Nicotinamide Riboside Preserves Cardiac Function in a Mouse Model of Dilated Cardiomyopathy. *Circulation* 137, 2256–2273.
- Dimauro, T., and David, G. (2009). Chromatin modifications: the driving force of senescence and aging? *Aging (Albany NY)* 1, 182–190.
- Dittmer, T.A., and Misteli, T. (2011). The lamin protein family. *Genome Biol* 12, 222.
- Doetsch, M., Gluch, A., Poznanović, G., Bode, J., and Vidaković, M. (2012). YY1-binding sites provide central switch functions in the PARP-1 gene expression network. *PLoS One* 7, e44125.
- Domingo, D.L., Trujillo, M.I., Council, S.E., Merideth, M.A., Gordon, L.B., Wu, T., Introne, W.J.,

- Gahl, W.A., and Hart, T.C. (2009). Hutchinson-Gilford progeria syndrome: oral and craniofacial phenotypes. *Oral Dis* 15, 187–195.
- Donnalaja, F., Carnevali, F., Jacchetti, E., and Raimondi, M.T. (2020). Lamin A/C Mechanotransduction in Laminopathies. *Cells* 9, E1306.
- Dorado, B., Pløen, G.G., Baretino, A., Macías, A., Gonzalo, P., Andrés-Manzano, M.J., González-Gómez, C., Galán-Arriola, C., Alfonso, J.M., Lobo, M., et al. (2019). Generation and characterization of a novel knockin minipig model of Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Cell Discov* 5, 16.
- Duan, D. (2011). Duchenne muscular dystrophy gene therapy: Lost in translation? *Res Rep Biol* 2011, 31–42.
- Duband, J.L., Gimona, M., Scatena, M., Sartore, S., and Small, J.V. (1993). Calponin and SM 22 as differentiation markers of smooth muscle: spatiotemporal distribution during avian embryonic development. *Differentiation* 55, 1–11.
- Durkacz, B.W., Omidiji, O., Gray, D.A., and Shall, S. (1980). (ADP-ribose)_n participates in DNA excision repair. *Nature* 283, 593–596.
- Egesipe, A.-L., Blondel, S., Lo Cicero, A., Jaskowiak, A.-L., Navarro, C., Sandre-Giovannoli, A.D., Levy, N., Peschanski, M., and Nissan, X. (2016). Metformin decreases progerin expression and alleviates pathological defects of Hutchinson-Gilford progeria syndrome cells. *NPJ Aging Mech Dis* 2, 16026.
- Ellis, D.J., Jenkins, H., Whitfield, W.G., and Hutchison, C.J. (1997). GST-lamin fusion proteins act as dominant negative mutants in *Xenopus* egg extract and reveal the function of the lamina in DNA replication. *J Cell Sci* 110 (Pt 20), 2507–2518.
- Emery, A.E. (2000). Emery-Dreifuss muscular dystrophy - a 40 year retrospective. *Neuromuscul Disord* 10, 228–232.
- 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. (2003a). Recurrent de novo point mutations in lamin A cause Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Nature* 423, 293–298.
- 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. (2003b). Recurrent de novo point mutations in lamin A cause Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Nature* 423, 293–298.
- Espada, J., Varela, I., Flores, I., Ugalde, A.P., Cadiñanos, J., Pendás, A.M., Stewart, C.L., Tryggvason, K., Blasco, M.A., Freije, J.M.P., et al. (2008). Nuclear envelope defects cause stem cell dysfunction in premature-aging mice. *J Cell Biol* 181, 27–35.
- Fatkin, D., MacRae, C., Sasaki, T., Wolff, M.R., Porcu, M., Frenneaux, M., Atherton, J., Vidaillet, H.J., Spudich, S., De Girolami, U., et al. (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.
- Favreau, C., Dubosclard, E., Ostlund, C., Vigouroux, C., Capeau, J., Wehnert, M., Higuete, D., Worman, H.J., Courvalin, J.-C., and Buendia, B. (2003). Expression of lamin A mutated in the carboxyl-terminal tail generates an aberrant nuclear phenotype similar to that observed in cells from patients with Dunnigan-type partial lipodystrophy and Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Exp Cell Res* 282, 14–23.

- Fawcett, D.W. (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.
- Frederick, D.W., McDougal, A.V., Semenas, M., Vappiani, J., Nuzzo, A., Ulrich, J.C., Becherer, J.D., Preugschat, F., Stewart, E.L., Sévin, D.C., et al. (2020). Complementary NAD⁺ replacement strategies fail to functionally protect dystrophin-deficient muscle. *Skelet Muscle* 10, 30.
- Frontera, W.R., and Ochala, J. (2015). Skeletal muscle: a brief review of structure and function. *Calcif. Tissue Int.* 96, 183–195.
- Gabriel, D., Gordon, L.B., and Djabali, K. (2016). Temsirolimus Partially Rescues the Hutchinson-Gilford Progeria Cellular Phenotype. *PLoS One* 11, e0168988.
- Galiová, G., Bártová, E., Raska, I., Krejčí, J., and Kozubek, S. (2008). Chromatin changes induced by lamin A/C deficiency and the histone deacetylase inhibitor trichostatin A. *Eur J Cell Biol* 87, 291–303.
- Gant, T.M., and Wilson, K.L. (1997). Nuclear assembly. *Annu Rev Cell Dev Biol* 13, 669–695.
- Garten, A., Schuster, S., Penke, M., Gorski, T., de Giorgis, T., and Kiess, W. (2015). Physiological and pathophysiological roles of NAMPT and NAD metabolism. *Nat Rev Endocrinol* 11, 535–546.
- Geng, L., Liu, Z., Zhang, W., Li, W., Wu, Z., Wang, W., Ren, R., Su, Y., Wang, P., Sun, L., et al. (2019). Chemical screen identifies a geroprotective role of quercetin in premature aging. *Protein Cell* 10, 417–435.
- Georgatos, S.D., Meier, J., and Simos, G. (1994). Lamins and lamin-associated proteins. *Curr Opin Cell Biol* 6, 347–353.
- Gerace, L., and Blobel, G. (1982). Nuclear lamina and the structural organization of the nuclear envelope. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 46 Pt 2, 967–978.
- Gerhard-Herman, M., Smoot, L.B., Wake, N., Kieran, M.W., Kleinman, M.E., Miller, D.T., Schwartzman, A., Giobbie-Hurder, A., Neuberg, D., and Gordon, L.B. (2012). Mechanisms of premature vascular aging in children with Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Hypertension* 59, 92–97.
- Gesson, K., Rescheneder, P., Skoruppa, M.P., von Haeseler, A., Dechat, T., and Foisner, R. (2016). A-type lamins bind both hetero- and euchromatin, the latter being regulated by lamina-associated polypeptide 2 alpha. *Genome Res* 26, 462–473.
- Gibbs-Seymour, I., Markiewicz, E., Bekker-Jensen, S., Mailand, N., and Hutchison, C.J. (2015). Lamin A/C-dependent interaction with 53BP1 promotes cellular responses to DNA damage. *Aging Cell* 14, 162–169.
- Gilford, H. (1897). On a Condition of Mixed Premature and Immature Development. *Med Chir Trans* 80, 17-46.25.
- Goldberg, M.W., Huttenlauch, I., Hutchison, C.J., and Stick, R. (2008). Filaments made from A- and B-type lamins differ in structure and organization. *J Cell Sci* 121, 215–225.
- Goldman, R.D., Shumaker, D.K., Erdos, M.R., Eriksson, M., Goldman, A.E., Gordon, L.B., Gruenbaum, Y., Khuon, S., Mendez, M., Varga, R., et al. (2004). Accumulation of mutant lamin A causes progressive changes in nuclear architecture in Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 8963–8968.

- Gomes, F.C., Paulin, D., and Moura Neto, V. (1999). Glial fibrillary acidic protein (GFAP): modulation by growth factors and its implication in astrocyte differentiation. *Braz J Med Biol Res* 32, 619–631.
- Gomez, M., Wu, J., Schreiber, V., Dunlap, J., Dantzer, F., Wang, Y., and Liu, Y. (2006). PARP1 Is a TRF2-associated poly(ADP-ribose)polymerase and protects eroded telomeres. *Mol Biol Cell* 17, 1686–1696.
- Gonzalez-Suarez, I., Redwood, A.B., Perkins, S.M., Vermolen, B., Lichtensztejn, D., Grotzky, D.A., Morgado-Palacin, L., Gapud, E.J., Sleckman, B.P., Sullivan, T., et al. (2009). Novel roles for A-type lamins in telomere biology and the DNA damage response pathway. *EMBO J* 28, 2414–2427.
- Gonzalo, S., and Kreienkamp, R. (2015). DNA repair defects and genome instability in Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome. *Curr Opin Cell Biol* 34, 75–83.
- Gonzalo, S., Kreienkamp, R., and Askjaer, P. (2017). Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome: A premature aging disease caused by LMNA gene mutations. *Ageing Res Rev* 33, 18–29.
- Goody, M.F., and Henry, C.A. (2018). A need for NAD⁺ in muscle development, homeostasis, and aging. *Skelet Muscle* 8, 9.
- Gordon, C.M., Gordon, L.B., Snyder, B.D., Nazarian, A., Quinn, N., Huh, S., Giobbie-Hurder, A., Neuberg, D., Cleveland, R., Kleinman, M., et al. (2011). Hutchinson-Gilford progeria is a skeletal dysplasia. *J Bone Miner Res* 26, 1670–1679.
- Gordon, L.B., McCarten, K.M., Giobbie-Hurder, A., Machan, J.T., Campbell, S.E., Berns, S.D., and Kieran, M.W. (2007). Disease progression in Hutchinson-Gilford progeria syndrome: impact on growth and development. *Pediatrics* 120, 824–833.
- Gordon, L.B., Kleinman, M.E., Miller, D.T., Neuberg, D.S., Giobbie-Hurder, A., Gerhard-Herman, M., Smoot, L.B., Gordon, C.M., Cleveland, R., Snyder, B.D., et al. (2012). Clinical trial of a farnesyltransferase inhibitor in children with Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 16666–16671.
- Gordon, L.B., Massaro, J., D’Agostino, R.B., Campbell, S.E., Brazier, J., Brown, W.T., Kleinman, M.E., Kieran, M.W., and Progeria Clinical Trials Collaborative (2014). Impact of farnesylation inhibitors on survival in Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Circulation* 130, 27–34.
- Gordon, L.B., Kleinman, M.E., Massaro, J., D’Agostino, R.B., Shappell, H., Gerhard-Herman, M., Smoot, L.B., Gordon, C.M., Cleveland, R.H., Nazarian, A., et al. (2016). Clinical Trial of the Protein Farnesylation Inhibitors Lonafarnib, Pravastatin, and Zoledronic Acid in Children With Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome. *Circulation* 134, 114–125.
- Gordon, L.B., Shappell, H., Massaro, J., D’Agostino, R.B., Brazier, J., Campbell, S.E., Kleinman, M.E., and Kieran, M.W. (2018). Association of Lonafarnib Treatment vs No Treatment With Mortality Rate in Patients With Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome. *JAMA* 319, 1687–1695.
- Graziano, S., Coll-Bonfill, N., Teodoro-Castro, B., Kuppa, S., Jackson, J., Shashkova, E., Mahajan, U., Vindigni, A., Antony, E., and Gonzalo, S. (2021). Lamin A/C recruits ssDNA protective proteins RPA and RAD51 to stalled replication forks to maintain fork stability. *J Biol Chem* 297, 101301.
- Grossman, E., Dahan, I., Stick, R., Goldberg, M.W., Gruenbaum, Y., and Medalia, O. (2012).

- Filaments assembly of ectopically expressed *Caenorhabditis elegans* lamin within *Xenopus* oocytes. *J Struct Biol* 177, 113–118.
- Guelen, L., Pagie, L., Brasset, E., Meuleman, W., Faza, M.B., Talhout, W., Eussen, B.H., de Klein, A., Wessels, L., de Laat, W., et al. (2008). Domain organization of human chromosomes revealed by mapping of nuclear lamina interactions. *Nature* 453, 948–951.
- Guilbert, S.M., Cardoso, D., Lévy, N., Muchir, A., and Nissan, X. (2020). Hutchinson-Gilford progeria syndrome: Rejuvenating old drugs to fight accelerated ageing. *Methods*.
- Guo, Y., Kim, Y., Shimi, T., Goldman, R.D., and Zheng, Y. (2014). Concentration-dependent lamin assembly and its roles in the localization of other nuclear proteins. *Mol Biol Cell* 25, 1287–1297.
- Gupte, R., Liu, Z., and Kraus, W.L. (2017). PARPs and ADP-ribosylation: recent advances linking molecular functions to biological outcomes. *Genes Dev* 31, 101–126.
- Haas, M., and Jost, E. (1993). Functional analysis of phosphorylation sites in human lamin A controlling lamin disassembly, nuclear transport and assembly. *Eur J Cell Biol* 62, 237–247.
- Haince, J.-F., Ouellet, M.-E., McDonald, D., Hendzel, M.J., and Poirier, G.G. (2006). Dynamic relocation of poly(ADP-ribose) glycohydrolase isoforms during radiation-induced DNA damage. *Biochim Biophys Acta* 1763, 226–237.
- Hamczyk, M.R., Villa-Bellosta, R., Gonzalo, P., Andrés-Manzano, M.J., Nogales, P., Bentzon, J.F., López-Otín, C., and Andrés, V. (2018). Vascular Smooth Muscle-Specific Progerin Expression Accelerates Atherosclerosis and Death in a Mouse Model of Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome. *Circulation* 138, 266–282.
- Hamczyk, M.R., Villa-Bellosta, R., Quesada, V., Gonzalo, P., Vidak, S., Nevado, R.M., Andrés-Manzano, M.J., Misteli, T., López-Otín, C., and Andrés, V. (2019). Progerin accelerates atherosclerosis by inducing endoplasmic reticulum stress in vascular smooth muscle cells. *EMBO Mol Med* 11, e9736.
- Hanumanthappa, N.B., Madhusudan, G., Mahimarangaiah, J., and Manjunath, C.N. (2011). Hutchinson-Gilford progeria syndrome with severe calcific aortic valve stenosis. *Ann Pediatr Cardiol* 4, 204–206.
- Harhour, K., Navarro, C., Depetris, D., Mattei, M.-G., Nissan, X., Cau, P., De Sandre-Giovannoli, A., and Lévy, N. (2017). MG132-induced progerin clearance is mediated by autophagy activation and splicing regulation. *EMBO Mol Med* 9, 1294–1313.
- Hasegawa, S., Fujimura, S., Shimizu, Y., and Sugimura, R. (1967). The polymerization of adenosine 5'-diphosphate-ribose moiety of NAD by nuclear enzyme. II. Properties of the reaction product. *Biochim Biophys Acta* 149, 369–376.
- Hayflick, L. (1965). THE LIMITED IN VITRO LIFETIME OF HUMAN DIPLOID CELL STRAINS. *Exp Cell Res* 37, 614–636.
- Heald, R., and McKeon, F. (1990). Mutations of phosphorylation sites in lamin A that prevent nuclear lamina disassembly in mitosis. *Cell* 61, 579–589.
- Hegele, R.A., Cao, H., Liu, D.M., Costain, G.A., Charlton-Menys, V., Rodger, N.W., and Durrington, P.N. (2006). Sequencing of the reannotated LMNB2 gene reveals novel mutations in patients with acquired partial lipodystrophy. *Am J Hum Genet* 79, 383–

- Heilbronn, L.K. (2017). Clinical Trials Corner. *Nutr Healthy Aging* 4, 193–194.
- Heitlinger, E., Peter, M., Häner, M., Lustig, A., Aebi, U., and Nigg, E.A. (1991). Expression of chicken lamin B2 in *Escherichia coli*: characterization of its structure, assembly, and molecular interactions. *J Cell Biol* 113, 485–495.
- Hennekam, R.C.M. (2006). Hutchinson-Gilford progeria syndrome: review of the phenotype. *Am J Med Genet A* 140, 2603–2624.
- Hernandez, L., Roux, K.J., Wong, E.S.M., Mounkes, L.C., Mutalif, R., Navasankari, R., Rai, B., Cool, S., Jeong, J.-W., Wang, H., et al. (2010). Functional coupling between the extracellular matrix and nuclear lamina by Wnt signaling in progeria. *Dev Cell* 19, 413–425.
- Herrmann, H., and Aebi, U. (2000). Intermediate filaments and their associates: multi-talented structural elements specifying cytoarchitecture and cytodynamics. *Curr Opin Cell Biol* 12, 79–90.
- Herrmann, H., and Aebi, U. (2016). Intermediate Filaments: Structure and Assembly. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 8.
- Heyn, H., Moran, S., and Esteller, M. (2013). Aberrant DNA methylation profiles in the premature aging disorders Hutchinson-Gilford Progeria and Werner syndrome. *Epigenetics* 8, 28–33.
- Hisama, F.M., Lessel, D., Leistritz, D., Friedrich, K., McBride, K.L., Pastore, M.T., Gottesman, G.S., Saha, B., Martin, G.M., Kubisch, C., et al. (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.
- Hoffman, E.P., Brown, R.H., and Kunkel, L.M. (1987). Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell* 51, 919–928.
- Hottiger, M.O., Hassa, P.O., Lüscher, B., Schüler, H., and Koch-Nolte, F. (2010). Toward a unified nomenclature for mammalian ADP-ribosyltransferases. *Trends Biochem. Sci.* 35, 208–219.
- Howard, M., Grimaldi, J.C., Bazan, J.F., Lund, F.E., Santos-Argumedo, L., Parkhouse, R.M., Walseth, T.F., and Lee, H.C. (1993). Formation and hydrolysis of cyclic ADP-ribose catalyzed by lymphocyte antigen CD38. *Science* 262, 1056–1059.
- Hsu, C.-P., Oka, S., Shao, D., Hariharan, N., and Sadoshima, J. (2009). Nicotinamide phosphoribosyltransferase regulates cell survival through NAD⁺ synthesis in cardiac myocytes. *Circ Res* 105, 481–491.
- Hurtado-Bagès, S., Knobloch, G., Ladurner, A.G., and Buschbeck, M. (2020). The taming of PARP1 and its impact on NAD⁺ metabolism. *Mol Metab* 38, 100950.
- 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.
- Ibrahim, M.X., Sayin, V.I., Akula, M.K., Liu, M., Fong, L.G., Young, S.G., and Bergo, M.O. (2013). Targeting isoprenylcysteine methylation ameliorates disease in a mouse model of progeria. *Science* 340, 1330–1333.

- Imai, S., and Guarente, L. (2014). NAD⁺ and sirtuins in aging and disease. *Trends Cell Biol.* 24, 464–471.
- Imai, S., Armstrong, C.M., Kaeberlein, M., and Guarente, L. (2000). Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase. *Nature* 403, 795–800.
- Jackson, S.P., and Bartek, J. (2009). The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature* 461, 1071–1078.
- Janin, A., Bauer, D., Ratti, F., Millat, G., and Méjat, A. (2017). Nuclear envelopathies: a complex LINC between nuclear envelope and pathology. *Orphanet J Rare Dis* 12, 147.
- Jayasena, T., Bustamante, S., Clement, J., Welschinger, R., Caplan, G.A., Sachdev, P.S., and Braidy, N. (2020). Clinical Assessment of the NADome as Biomarkers for Healthy Aging. *Methods Mol Biol* 2138, 207–216.
- Juarez-Salinas, H., Sims, J.L., and Jacobson, M.K. (1979). Poly(ADP-ribose) levels in carcinogen-treated cells. *Nature* 282, 740–741.
- Jubin, T., Kadam, A., Gani, A.R., Singh, M., Dwivedi, M., and Begum, R. (2017). Poly ADP-ribose polymerase-1: Beyond transcription and towards differentiation. *Semin Cell Dev Biol* 63, 167–179.
- Jung, H.-J., Coffinier, C., Choe, Y., Beigneux, A.P., Davies, B.S.J., Yang, S.H., Barnes, R.H., Hong, J., Sun, T., Pleasure, S.J., et al. (2012). Regulation of prelamin A but not lamin C by miR-9, a brain-specific microRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, E423-431.
- Jung, H.-J., Lee, J.M., Yang, S.H., Young, S.G., and Fong, L.G. (2013). Nuclear lamins in the brain - new insights into function and regulation. *Mol Neurobiol* 47, 290–301.
- Kang, H.T., Park, J.T., Choi, K., Choi, H.J.C., Jung, C.W., Kim, G.R., Lee, Y.-S., and Park, S.C. (2017). Chemical screening identifies ROCK as a target for recovering mitochondrial function in Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Aging Cell* 16, 541–550.
- Katoh, Y., Loukianov, E., Koprass, E., Zilberman, A., and Periasamy, M. (1994). Identification of functional promoter elements in the rabbit smooth muscle myosin heavy chain gene. *J Biol Chem* 269, 30538–30545.
- Khan, N.A., Auranen, M., Paetau, I., Pirinen, E., Euro, L., Forsström, S., Pasila, L., Velagapudi, V., Carroll, C.J., Auwerx, J., et al. (2014). Effective treatment of mitochondrial myopathy by nicotinamide riboside, a vitamin B3. *EMBO Mol Med* 6, 721–731.
- Kieran, M.W., Gordon, L., and Kleinman, M. (2007). New approaches to progeria. *Pediatrics* 120, 834–841.
- Kim, P.H., Luu, J., Heizer, P., Tu, Y., Weston, T.A., Chen, N., Lim, C., Li, R.L., Lin, P.-Y., Dunn, J.C.Y., et al. (2018). Disrupting the LINC complex in smooth muscle cells reduces aortic disease in a mouse model of Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Sci Transl Med* 10, eaat7163.
- Kim, P.H., Chen, N.Y., Heizer, P.J., Tu, Y., Weston, T.A., Fong, J.L.-C., Gill, N.K., Rowat, A.C., Young, S.G., and Fong, L.G. (2021). Nuclear membrane ruptures underlie the vascular pathology in a mouse model of Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *JCI Insight* 6, 151515.
- Kinoshita, D., Nagasawa, A., Shimizu, I., Ito, T.K., Yoshida, Y., Tsuchida, M., Iwama, A., Hayano, T., and Minamino, T. (2017). Progerin impairs vascular smooth muscle cell

- growth via the DNA damage response pathway. *Oncotarget* 8, 34045–34056.
- Kleinstiver, B.P., Pattanayak, V., Prew, M.S., Tsai, S.Q., Nguyen, N.T., Zheng, Z., and Joung, J.K. (2016). High-fidelity CRISPR-Cas9 nucleases with no detectable genome-wide off-target effects. *Nature* 529, 490–495.
- Koblan, L.W., Erdos, M.R., Wilson, C., Cabral, W.A., Levy, J.M., Xiong, Z.-M., Tavares, U.L., Davison, L.M., Gete, Y.G., Mao, X., et al. (2021). In vivo base editing rescues Hutchinson-Gilford progeria syndrome in mice. *Nature* 589, 608–614.
- Koenig, M., Hoffman, E.P., Bertelson, C.J., Monaco, A.P., Feener, C., and Kunkel, L.M. (1987). Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals. *Cell* 50, 509–517.
- Koh, D.W., Lawler, A.M., Poitras, M.F., Sasaki, M., Wattler, S., Nehls, M.C., Stöger, T., Poirier, G.G., Dawson, V.L., and Dawson, T.M. (2004). Failure to degrade poly(ADP-ribose) causes increased sensitivity to cytotoxicity and early embryonic lethality. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 17699–17704.
- Kornegay, J.N. (2017). The golden retriever model of Duchenne muscular dystrophy. *Skelet Muscle* 7, 9.
- Kowalik, M.A., Columbano, A., and Perra, A. (2017). Emerging Role of the Pentose Phosphate Pathway in Hepatocellular Carcinoma. *Front Oncol* 7, 87.
- Kraus, W.L. (2008). Transcriptional control by PARP-1: chromatin modulation, enhancer-binding, coregulation, and insulation. *Curr Opin Cell Biol* 20, 294–302.
- Kreienkamp, R., Croke, M., Neumann, M.A., Bedia-Diaz, G., Graziano, S., Dusso, A., Dorsett, D., Carlberg, C., and Gonzalo, S. (2016). Vitamin D receptor signaling improves Hutchinson-Gilford progeria syndrome cellular phenotypes. *Oncotarget* 7, 30018–30031.
- Kreienkamp, R., Graziano, S., Coll-Bonfill, N., Bedia-Diaz, G., Cybulla, E., Vindigni, A., Dorsett, D., Kubben, N., Batista, L.F.Z., and Gonzalo, S. (2018). A Cell-Intrinsic Interferon-like Response Links Replication Stress to Cellular Aging Caused by Progerin. *Cell Rep* 22, 2006–2015.
- Kubben, N., Voncken, J.W., Konings, G., van Weeghel, M., van den Hoogenhof, M.M., Gijbels, M., van Erk, A., Schoonderwoerd, K., van den Bosch, B., Dahlmans, V., et al. (2011). Post-natal myogenic and adipogenic developmental: defects and metabolic impairment upon loss of A-type lamins. *Nucleus* 2, 195–207.
- Kubben, N., Zhang, W., Wang, L., Voss, T.C., Yang, J., Qu, J., Liu, G.-H., and Misteli, T. (2016a). Repression of the Antioxidant NRF2 Pathway in Premature Aging. *Cell* 165, 1361–1374.
- Kubben, N., Brimacombe, K.R., Donegan, M., Li, Z., and Misteli, T. (2016b). A high-content imaging-based screening pipeline for the systematic identification of anti-progeroid compounds. *Methods* 96, 46–58.
- Kudlow, B.A., Stanfel, M.N., Burtner, C.R., Johnston, E.D., and Kennedy, B.K. (2008). Suppression of proliferative defects associated with processing-defective lamin A mutants by hTERT or inactivation of p53. *Mol Biol Cell* 19, 5238–5248.
- Kychygina, A., Dall’Osto, M., Allen, J.A.M., Cadoret, J.-C., Piras, V., Pickett, H.A., and Crabbe, L. (2021). Progerin impairs 3D genome organization and induces fragile telomeres by

- limiting the dNTP pools. *Sci Rep* 11, 13195.
- Lacolley, P., Regnault, V., Nicoletti, A., Li, Z., and Michel, J.-B. (2012). The vascular smooth muscle cell in arterial pathology: a cell that can take on multiple roles. *Cardiovasc Res* 95, 194–204.
- Lacolley, P., Regnault, V., Segers, P., and Laurent, S. (2017). Vascular Smooth Muscle Cells and Arterial Stiffening: Relevance in Development, Aging, and Disease. *Physiol Rev* 97, 1555–1617.
- Lai, A.Y., and Wade, P.A. (2011). Cancer biology and NuRD: a multifaceted chromatin remodelling complex. *Nat Rev Cancer* 11, 588–596.
- Laliberté, J.F., Dagenais, A., Filion, M., Bibor-Hardy, V., Simard, R., and Royal, A. (1984). Identification of distinct messenger RNAs for nuclear lamin C and a putative precursor of nuclear lamin A. *J Cell Biol* 98, 980–985.
- Lammerding, J., Schulze, P.C., Takahashi, T., Kozlov, S., Sullivan, T., Kamm, R.D., Stewart, C.L., and Lee, R.T. (2004). Lamin A/C deficiency causes defective nuclear mechanics and mechanotransduction. *J Clin Invest* 113, 370–378.
- Lammerding, J., Fong, L.G., Ji, J.Y., Reue, K., Stewart, C.L., Young, S.G., and Lee, R.T. (2006). Lamins A and C but not lamin B1 regulate nuclear mechanics. *J Biol Chem* 281, 25768–25780.
- Langelier, M.-F., Planck, J.L., Roy, S., and Pascal, J.M. (2012). Structural basis for DNA damage-dependent poly(ADP-ribosyl)ation by human PARP-1. *Science* 336, 728–732.
- Larrieu, D., Britton, S., Demir, M., Rodriguez, R., and Jackson, S.P. (2014). Chemical inhibition of NAT10 corrects defects of laminopathic cells. *Science* 344, 527–532.
- Lazebnik, Y.A., Kaufmann, S.H., Desnoyers, S., Poirier, G.G., and Earnshaw, W.C. (1994). Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE. *Nature* 371, 346–347.
- Lebel, M., Lavoie, J., Gaudreault, I., Bronsard, M., and Drouin, R. (2003). Genetic Cooperation between the Werner Syndrome Protein and Poly(ADP-Ribose) Polymerase-1 in Preventing Chromatid Breaks, Complex Chromosomal Rearrangements, and Cancer in Mice. *Am J Pathol* 162, 1559–1569.
- Lee, D.C., Welton, K.L., Smith, E.D., and Kennedy, B.K. (2009). A-type nuclear lamins act as transcriptional repressors when targeted to promoters. *Exp Cell Res* 315, 996–1007.
- Lee, J.M., Nobumori, C., Tu, Y., Choi, C., Yang, S.H., Jung, H.-J., Vickers, T.A., Rigo, F., Bennett, C.F., Young, S.G., et al. (2016a). Modulation of LMNA splicing as a strategy to treat progerin A diseases. *J Clin Invest* 126, 1592–1602.
- Lee, J.W., Harrigan, J., Opresko, P.L., and Bohr, V.A. (2005). Pathways and functions of the Werner syndrome protein. *Mech Ageing Dev* 126, 79–86.
- Lee, S.-J., Jung, Y.-S., Yoon, M.-H., Kang, S.-M., Oh, A.-Y., Lee, J.-H., Jun, S.-Y., Woo, T.-G., Chun, H.-Y., Kim, S.K., et al. (2016b). Interruption of progerin-lamin A/C binding ameliorates Hutchinson-Gilford progeria syndrome phenotype. *J Clin Invest* 126, 3879–3893.
- de Leeuw, R., Gruenbaum, Y., and Medalia, O. (2018). Nuclear Lamins: Thin Filaments with Major Functions. *Trends Cell Biol* 28, 34–45.
- Lehner, C.F., Fürstenberger, G., Eppenberger, H.M., and Nigg, E.A. (1986). Biogenesis of the

- nuclear lamina: in vivo synthesis and processing of nuclear protein precursors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 2096–2099.
- Li, M., Lu, L.-Y., Yang, C.-Y., Wang, S., and Yu, X. (2013). The FHA and BRCT domains recognize ADP-ribosylation during DNA damage response. *Genes Dev* 27, 1752–1768.
- Lin, F., and Worman, H.J. (1993). Structural organization of the human gene encoding nuclear lamin A and nuclear lamin C. *J Biol Chem* 268, 16321–16326.
- Lin, S.-J., Kaeberlein, M., Andalis, A.A., Sturtz, L.A., Defossez, P.-A., Culotta, V.C., Fink, G.R., and Guarente, L. (2002). Calorie restriction extends *Saccharomyces cerevisiae* lifespan by increasing respiration. *Nature* 418, 344–348.
- Liu, S.Y., and Ikegami, K. (2020). Nuclear lamin phosphorylation: an emerging role in gene regulation and pathogenesis of laminopathies. *Nucleus* 11, 299–314.
- Liu, B., Wang, J., Chan, K.M., Tjia, W.M., Deng, W., Guan, X., Huang, J., Li, K.M., Chau, P.Y., Chen, D.J., et al. (2005). Genomic instability in laminopathy-based premature aging. *Nat Med* 11, 780–785.
- Liu, B., Ghosh, S., Yang, X., Zheng, H., Liu, X., Wang, Z., Jin, G., Zheng, B., Kennedy, B.K., Suh, Y., et al. (2012). Resveratrol rescues SIRT1-dependent adult stem cell decline and alleviates progeroid features in laminopathy-based progeria. *Cell Metab* 16, 738–750.
- Liu, B., Wang, Z., Zhang, L., Ghosh, S., Zheng, H., and Zhou, Z. (2013a). Depleting the methyltransferase Suv39h1 improves DNA repair and extends lifespan in a progeria mouse model. *Nat Commun* 4, 1868.
- Liu, B., Wang, Z., Ghosh, S., and Zhou, Z. (2013b). Defective ATM-Kap-1-mediated chromatin remodeling impairs DNA repair and accelerates senescence in progeria mouse model. *Aging Cell* 12, 316–318.
- Liu, C., Arnold, R., Henriques, G., and Djabali, K. (2019). Inhibition of JAK-STAT Signaling with Baricitinib Reduces Inflammation and Improves Cellular Homeostasis in Progeria Cells. *Cells* 8, E1276.
- 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.
- Liu, Y., Wang, Y., Rusinol, A.E., Sinensky, M.S., Liu, J., Shell, S.M., 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.
- Liu, Y., Drozdov, I., Shroff, R., Beltran, L.E., and Shanahan, C.M. (2013c). Prelamin A accelerates vascular calcification via activation of the DNA damage response and senescence-associated secretory phenotype in vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 112, e99-109.
- Lo Cicero, A., and Nissan, X. (2015). Pluripotent stem cells to model Hutchinson-Gilford progeria syndrome (HGPS): Current trends and future perspectives for drug discovery. *Ageing Res Rev* 24, 343–348.
- Lo Cicero, A., Jaskowiak, A.-L., Egesipe, A.-L., Tournois, J., Brinon, B., Pitrez, P.R., Ferreira, L., de Sandre-Giovannoli, A., Levy, N., and Nissan, X. (2016a). A High Throughput Phenotypic Screening reveals compounds that counteract premature osteogenic differentiation of HGPS iPS-derived mesenchymal stem cells. *Sci Rep* 6, 34798.

- Lo Cicero, A., Jaskowiak, A.-L., Egesipe, A.-L., Tournois, J., Brinon, B., Pitrez, P.R., Ferreira, L., de Sandre-Giovannoli, A., Levy, N., and Nissan, X. (2016b). A High Throughput Phenotypic Screening reveals compounds that counteract premature osteogenic differentiation of HGPS iPS-derived mesenchymal stem cells. *Sci Rep* 6, 34798.
- Loi, M., Cenni, V., Duchi, S., Squarzoni, S., Lopez-Otin, C., Foisner, R., Lattanzi, G., and Capanni, C. (2016). Barrier-to-autointegration factor (BAF) involvement in prelamin A-related chromatin organization changes. *Oncotarget* 7, 15662–15677.
- López-Otín, C., Blasco, M.A., Partridge, L., Serrano, M., and Kroemer, G. (2013). The hallmarks of aging. *Cell* 153, 1194–1217.
- Louis, S.F., and Zahradka, P. (2010). Vascular smooth muscle cell motility: From migration to invasion. *Exp Clin Cardiol* 15, e75-85.
- Lu, X., and Djabali, K. (2018). Autophagic Removal of Farnesylated Carboxy-Terminal Lamin Peptides. *Cells* 7, E33.
- Lu, J.T., Muchir, A., Nagy, P.L., and Worman, H.J. (2011). LMNA cardiomyopathy: cell biology and genetics meet clinical medicine. *Dis Model Mech* 4, 562–568.
- Ludérus, M.E., de Graaf, A., Mattia, E., den Blaauwen, J.L., Grande, M.A., de Jong, L., and van Driel, R. (1992). Binding of matrix attachment regions to lamin B1. *Cell* 70, 949–959.
- Ludérus, M.E., den Blaauwen, J.L., de Smit, O.J., Compton, D.A., and van Driel, R. (1994). Binding of matrix attachment regions to lamin polymers involves single-stranded regions and the minor groove. *Mol Cell Biol* 14, 6297–6305.
- Lund, E., and Collas, P. (2013). Nuclear lamins: making contacts with promoters. *Nucleus* 4, 424–430.
- Luo, X., and Kraus, W.L. (2012). On PAR with PARP: cellular stress signaling through poly(ADP-ribose) and PARP-1. *Genes Dev* 26, 417–432.
- Luo, Y.-B., Mitrpant, C., Adams, A.M., Johnsen, R.D., Fletcher, S., Mastaglia, F.L., and Wilton, S.D. (2014). Antisense oligonucleotide induction of progerin in human myogenic cells. *PLoS One* 9, e98306.
- Machiels, B.M., Henfling, M.E., Schutte, B., van Engeland, M., Broers, J.L., and Ramaekers, F.C. (1996). Subcellular localization of proteasomes in apoptotic lung tumor cells and persistence as compared to intermediate filaments. *Eur J Cell Biol* 70, 250–259.
- Magni, G., Amici, A., Emanuelli, M., Raffaelli, N., and Ruggieri, S. (1999). Enzymology of NAD⁺ synthesis. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 73, 135–182, xi.
- Mahen, R., Hattori, H., Lee, M., Sharma, P., Jeyasekharan, A.D., and Venkitaraman, A.R. (2013). A-type lamins maintain the positional stability of DNA damage repair foci in mammalian nuclei. *PLoS One* 8, e61893.
- Mangerich, A., and Bürkle, A. (2012). Pleiotropic cellular functions of PARP1 in longevity and aging: genome maintenance meets inflammation. *Oxid Med Cell Longev* 2012, 321653.
- Marji, J., O'Donoghue, S.I., McClintock, D., Satagopam, V.P., Schneider, R., Ratner, D., Worman, H.J., Gordon, L.B., and Djabali, K. (2010). Defective lamin A-Rb signaling in Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome and reversal by farnesyltransferase inhibition. *PLoS One* 5, e11132.

- Martin, N., Schwamborn, K., Schreiber, V., Werner, A., Guillier, C., Zhang, X.-D., Bischof, O., Seeler, J.-S., and Dejean, A. (2009). PARP-1 transcriptional activity is regulated by sumoylation upon heat shock. *EMBO J* 28, 3534–3548.
- Massudi, H., Grant, R., Braidy, N., Guest, J., Farnsworth, B., and Guillemin, G.J. (2012). Age-associated changes in oxidative stress and NAD⁺ metabolism in human tissue. *PLoS One* 7, e42357.
- Mehta, I.S., Eskiw, C.H., Arican, H.D., Kill, I.R., and Bridger, J.M. (2011). Farnesyltransferase inhibitor treatment restores chromosome territory positions and active chromosome dynamics in Hutchinson-Gilford progeria syndrome cells. *Genome Biol* 12, R74.
- Meier, J., Campbell, K.H., Ford, C.C., Stick, R., and Hutchison, C.J. (1991). The role of lamin LIII in nuclear assembly and DNA replication, in cell-free extracts of *Xenopus* eggs. *J Cell Sci* 98 (Pt 3), 271–279.
- Melcer, S., Gruenbaum, Y., and Krohne, G. (2007). Invertebrate lamins. *Exp Cell Res* 313, 2157–2166.
- Ménissier de Murcia, J., Ricoul, M., Tartier, L., Niedergang, C., Huber, A., Dantzer, F., Schreiber, V., Amé, J.-C., Dierich, A., LeMeur, M., et al. (2003). Functional interaction between PARP-1 and PARP-2 in chromosome stability and embryonic development in mouse. *EMBO J* 22, 2255–2263.
- Mercuri, E., Bönnemann, C.G., and Muntoni, F. (2019). Muscular dystrophies. *Lancet* 394, 2025–2038.
- Mericskay, M. (2016). Nicotinamide adenine dinucleotide homeostasis and signalling in heart disease: Pathophysiological implications and therapeutic potential. *Arch Cardiovasc Dis* 109, 207–215.
- Merideth, M.A., Gordon, L.B., Clauss, S., Sachdev, V., Smith, A.C.M., 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.
- Meshorer, E., and Gruenbaum, Y. (2009). NURD keeps chromatin young. *Nat Cell Biol* 11, 1176–1177.
- Messner, S., Altmeyer, M., Zhao, H., Pozivil, A., Roschitzki, B., Gehrig, P., Rutishauser, D., Huang, D., Cafilisch, A., and Hottiger, M.O. (2010). PARP1 ADP-ribosylates lysine residues of the core histone tails. *Nucleic Acids Res* 38, 6350–6362.
- Mewborn, S.K., Puckelwartz, M.J., Abuisneineh, F., Fahrenbach, J.P., Zhang, Y., MacLeod, H., Dellefave, L., Pytel, P., Selig, S., Labno, C.M., et al. (2010). Altered chromosomal positioning, compaction, and gene expression with a lamin A/C gene mutation. *PLoS One* 5, e14342.
- Meyer-Ficca, M.L., Meyer, R.G., Coyle, D.L., Jacobson, E.L., and Jacobson, M.K. (2004). Human poly(ADP-ribose) glycohydrolase is expressed in alternative splice variants yielding isoforms that localize to different cell compartments. *Exp Cell Res* 297, 521–532.
- Mildvan, A.S., Xia, Z., Azurmendi, H.F., Saraswat, V., Legler, P.M., Massiah, M.A., Gabelli, S.B., Bianchet, M.A., Kang, L.-W., and Amzel, L.M. (2005). Structures and mechanisms of Nudix hydrolases. *Arch Biochem Biophys* 433, 129–143.
- Mitchell, S.J., Bernier, M., Aon, M.A., Cortassa, S., Kim, E.Y., Fang, E.F., Palacios, H.H., Ali, A.,

- Navas-Enamorado, I., Di Francesco, A., et al. (2018). Nicotinamide Improves Aspects of Healthspan, but Not Lifespan, in Mice. *Cell Metab* 27, 667-676.e4.
- Miwa, M., and Sugimura, T. (1971). Splitting of the ribose-ribose linkage of poly(adenosine diphosphate-ribose) by a calf thymus extract. *J Biol Chem* 246, 6362–6364.
- Miwa, M., Tanaka, M., Matsushima, T., and Sugimura, T. (1974). Purification and properties of glycohydrolase from calf thymus splitting ribose-ribose linkages of poly(adenosine diphosphate ribose). *J Biol Chem* 249, 3475–3482.
- Moir, R.D., Montag-Lowy, M., and Goldman, R.D. (1994). Dynamic properties of nuclear lamins: lamin B is associated with sites of DNA replication. *J Cell Biol* 125, 1201–1212.
- Moir, R.D., Yoon, M., Khuon, S., and Goldman, R.D. (2000). Nuclear lamins A and B1: different pathways of assembly during nuclear envelope formation in living cells. *J Cell Biol* 151, 1155–1168.
- Mojiri, A., Walther, B.K., Jiang, C., Matrone, G., Holgate, R., Xu, Q., Morales, E., Wang, G., Gu, J., Wang, R., et al. (2021). Telomerase therapy reverses vascular senescence and extends lifespan in progeria mice. *Eur Heart J* ehab547.
- Monaco, A.P., Neve, R.L., Colletti-Feener, C., Bertelson, C.J., Kurnit, D.M., and Kunkel, L.M. (1986). Isolation of candidate cDNAs for portions of the Duchenne muscular dystrophy gene. *Nature* 323, 646–650.
- Muchir, A., Bonne, G., van der Kooij, A.J., van Meegen, M., Baas, F., Bolhuis, P.A., 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., Medioni, J., Laluc, M., Massart, C., Arimura, T., van der Kooij, A.J., Desguerre, I., Mayer, M., Ferrer, X., Briault, S., et al. (2004). Nuclear envelope alterations in fibroblasts from patients with muscular dystrophy, cardiomyopathy, and partial lipodystrophy carrying lamin A/C gene mutations. *Muscle Nerve* 30, 444–450.
- Muchir, A., Pavlidis, P., Decostre, V., Herron, A.J., Arimura, T., Bonne, G., and Worman, H.J. (2007). Activation of MAPK pathways links LMNA mutations to cardiomyopathy in Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *J Clin Invest* 117, 1282–1293.
- Muchir, A., Shan, J., Bonne, G., Lehnart, S.E., and Worman, H.J. (2009). Inhibition of extracellular signal-regulated kinase signaling to prevent cardiomyopathy caused by mutation in the gene encoding A-type lamins. *Hum Mol Genet* 18, 241–247.
- von Muhlinen, N., Horikawa, I., Alam, F., Isogaya, K., Lissa, D., Vojtesek, B., Lane, D.P., and Harris, C.C. (2018). p53 isoforms regulate premature aging in human cells. *Oncogene* 37, 2379–2393.
- Muñoz-Gómez, J.A., Rodríguez-Vargas, J.M., Quiles-Pérez, R., Aguilar-Quesada, R., Martín-Oliva, D., de Murcia, G., Menissier de Murcia, J., Almendros, A., Ruiz de Almodóvar, M., and Oliver, F.J. (2009). PARP-1 is involved in autophagy induced by DNA damage. *Autophagy* 5, 61–74.
- de Murcia, G., Schreiber, V., Molinete, M., Saulier, B., Poch, O., Masson, M., Niedergang, C., and Ménissier de Murcia, J. (1994). Structure and function of poly(ADP-ribose) polymerase. *Mol Cell Biochem* 138, 15–24.
- Musich, P.R., 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.
- Nair, K., Ramachandran, P., Krishnamoorthy, K.M., Dora, S., and Achuthan, T.J. (2004). Hutchinson-Gilford progeria syndrome with severe calcific aortic valve stenosis and calcific mitral valve. *J Heart Valve Dis* 13, 866–869.
- Nakajima, N., and Abe, K. (1995). Genomic structure of the mouse A-type lamin gene locus encoding somatic and germ cell-specific lamins. *FEBS Lett* 365, 108–114.
- Nakano-Kurimoto, R., Ikeda, K., Uraoka, M., Nakagawa, Y., Yutaka, K., Koide, M., Takahashi, T., Matoba, S., Yamada, H., Okigaki, M., et al. (2009). Replicative senescence of vascular smooth muscle cells enhances the calcification through initiating the osteoblastic transition. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 297, H1673-1684.
- Navarro, C.L., De Sandre-Giovannoli, A., Bernard, R., Boccaccio, I., Boyer, A., Geneviève, D., Hadj-Rabia, S., Gaudy-Marqueste, C., Smitt, H.S., Vabres, P., et al. (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, C.E., Wu, Y., Gemberling, M.P., Oliver, M.L., Waller, M.A., Bohning, J.D., Robinson-Hamm, J.N., Bulaklak, K., Castellanos Rivera, R.M., Collier, J.H., et al. (2019). Long-term evaluation of AAV-CRISPR genome editing for Duchenne muscular dystrophy. *Nat Med* 25, 427–432.
- Newport, J., and Spann, T. (1987). Disassembly of the nucleus in mitotic extracts: membrane vesicularization, lamin disassembly, and chromosome condensation are independent processes. *Cell* 48, 219–230.
- Niere, M., Mashimo, M., Agledal, L., Dölle, C., Kasamatsu, A., Kato, J., Moss, J., and Ziegler, M. (2012). ADP-ribosylhydrolase 3 (ARH3), not poly(ADP-ribose) glycohydrolase (PARG) isoforms, is responsible for degradation of mitochondrial matrix-associated poly(ADP-ribose). *J Biol Chem* 287, 16088–16102.
- Niessen, P., Rensen, S., van Deursen, J., De Man, J., De Laet, A., Vanderwinden, J.-M., Wedel, T., Baker, D., Doevendans, P., Hofker, M., et al. (2005). Smoothelin-a is essential for functional intestinal smooth muscle contractility in mice. *Gastroenterology* 129, 1592–1601.
- Nigg, E.A. (1989). The nuclear envelope. *Curr Opin Cell Biol* 1, 435–440.
- Nigg, E.A., Kitten, G.T., and Vorburger, K. (1992). Targeting lamin proteins to the nuclear envelope: the role of CaaX box modifications. *Biochem Soc Trans* 20, 500–504.
- Nili, E., Cojocar, G.S., Kalma, Y., Ginsberg, D., Copeland, N.G., Gilbert, D.J., Jenkins, N.A., Berger, R., Shaklai, S., Amariglio, N., et al. (2001). Nuclear membrane protein LAP2beta mediates transcriptional repression alone and together with its binding partner GCL (germ-cell-less). *J Cell Sci* 114, 3297–3307.
- Nishizuka, Y., Ueda, K., Nakazawa, K., and Hayaishi, O. (1967). Studies on the polymer of adenosine diphosphate ribose. I. Enzymic formation from nicotinamide adenine dinucleotide in mammalian nuclei. *J Biol Chem* 242, 3164–3171.
- 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.

- Noren Hooten, N., Kompaniezy, K., Barnes, J., Lohani, A., and Evans, M.K. (2011). Poly(ADP-ribose) polymerase 1 (PARP-1) binds to 8-oxoguanine-DNA glycosylase (OGG1). *J Biol Chem* 286, 44679–44690.
- Novelli, G., Muchir, A., Sangiuolo, F., Helbling-Leclerc, A., D’Apice, M.R., Massart, C., Capon, F., Sbraccia, P., Federici, M., Lauro, R., et al. (2002). Mandibuloacral dysplasia is caused by a mutation in LMNA-encoding lamin A/C. *Am J Hum Genet* 71, 426–431.
- Olins, A.L., Rhodes, G., Welch, D.B.M., Zwerger, M., and Olins, D.E. (2010). Lamin B receptor: multi-tasking at the nuclear envelope. *Nucleus* 1, 53–70.
- Olive, M., Harten, I., Mitchell, R., Beers, J.K., Djabali, K., Cao, K., Erdos, M.R., Blair, C., Funke, B., Smoot, L., et al. (2010). Cardiovascular pathology in Hutchinson-Gilford progeria: correlation with the vascular pathology of aging. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 30, 2301–2309.
- Osmanagic-Myers, S., Kiss, A., Manakanatas, C., Hamza, O., Sedlmayer, F., Szabo, P.L., Fischer, I., Fichtinger, P., Podesser, B.K., Eriksson, M., et al. (2019). Endothelial progerin expression causes cardiovascular pathology through an impaired mechanoresponse. *J Clin Invest* 129, 531–545.
- Osorio, F.G., Varela, I., Lara, E., Puente, X.S., Espada, J., Santoro, R., Freije, J.M.P., Fraga, M.F., and López-Otín, C. (2010). Nuclear envelope alterations generate an aging-like epigenetic pattern in mice deficient in Zmpste24 metalloprotease. *Aging Cell* 9, 947–957.
- Osorio, F.G., Navarro, C.L., Cadiñanos, J., López-Mejía, I.C., Quirós, P.M., Bartoli, C., Rivera, J., Tazi, J., Guzmán, G., Varela, I., et al. (2011). Splicing-directed therapy in a new mouse model of human accelerated aging. *Sci Transl Med* 3, 106ra107.
- Osorio, F.G., Bárcena, C., Soria-Valles, C., Ramsay, A.J., de Carlos, F., Cobo, J., Fueyo, A., Freije, J.M.P., and López-Otín, C. (2012). Nuclear lamina defects cause ATM-dependent NF-κB activation and link accelerated aging to a systemic inflammatory response. *Genes Dev* 26, 2311–2324.
- Ottaviano, Y., and Gerace, L. (1985). Phosphorylation of the nuclear lamins during interphase and mitosis. *J Biol Chem* 260, 624–632.
- Owens, G.K. (1995). Regulation of differentiation of vascular smooth muscle cells. *Physiol Rev* 75, 487–517.
- Owens, G.K., Kumar, M.S., and Wamhoff, B.R. (2004). Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease. *Physiol Rev* 84, 767–801.
- Padiath, Q.S., Saigoh, K., Schiffmann, R., Asahara, H., Yamada, T., Koeppen, A., Hogan, K., Ptáček, L.J., and Fu, Y.-H. (2006). Lamin B1 duplications cause autosomal dominant leukodystrophy. *Nat Genet* 38, 1114–1123.
- Pajerowski, J.D., Dahl, K.N., Zhong, F.L., Sammak, P.J., and Discher, D.E. (2007). Physical plasticity of the nucleus in stem cell differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 15619–15624.
- Palzer, L., Bader, J.J., Angel, F., Witzel, M., Blaser, S., McNeil, A., Wandersee, M.K., Leu, N.A., Lengner, C.J., Cho, C.E., et al. (2018). Alpha-Amino-Beta-Carboxy-Muconate-Semialdehyde Decarboxylase Controls Dietary Niacin Requirements for NAD⁺ Synthesis. *Cell Rep* 25, 1359-1370.e4.

- Park, K.-H., and Park, W.J. (2015). Endothelial Dysfunction: Clinical Implications in Cardiovascular Disease and Therapeutic Approaches. *J Korean Med Sci* 30, 1213–1225.
- Parry, D.A., Conway, J.F., and Steinert, P.M. (1986). Structural studies on lamin. Similarities and differences between lamin and intermediate-filament proteins. *Biochem J* 238, 305–308.
- Patil, S., and Sengupta, K. (2021). Role of A- and B-type lamins in nuclear structure-function relationships. *Biol Cell* 113, 295–310.
- Patrizi, G., and Poger, M. (1967). The ultrastructure of the nuclear periphery. The zonula nucleum limitans. *J Ultrastruct Res* 17, 127–136.
- Pegoraro, G., Kubben, N., Wickert, U., Göhler, H., Hoffmann, K., and Misteli, T. (2009). Ageing-related chromatin defects through loss of the NURD complex. *Nat Cell Biol* 11, 1261–1267.
- Pendás, A.M., Zhou, Z., Cadiñanos, J., Freije, J.M.P., Wang, J., Hultenby, K., Astudillo, A., Wernerson, A., Rodríguez, F., Tryggvason, K., et al. (2002). Defective prelamin A processing and muscular and adipocyte alterations in *Zmpste24* metalloproteinase-deficient mice. *Nat Genet* 31, 94–99.
- Pennarun, G., Picotto, J., Etourneau, L., Redavid, A.-R., Certain, A., Gauthier, L.R., Fontanilla-Ramirez, P., Busso, D., Chabance-Okumura, C., Thézé, B., et al. (2021). Increase in lamin B1 promotes telomere instability by disrupting the shelterin complex in human cells. *Nucleic Acids Res* 49, 9886–9905.
- Peric-Hupkes, D., Meuleman, W., Pagie, L., Bruggeman, S.W.M., Solovei, I., Brugman, W., Gräf, S., Flicek, P., Kerkhoven, R.M., van Lohuizen, M., et al. (2010). Molecular maps of the reorganization of genome-nuclear lamina interactions during differentiation. *Mol Cell* 38, 603–613.
- Peter, M., Heitlinger, E., Häner, M., Aebi, U., and Nigg, E.A. (1991). Disassembly of in vitro formed lamin head-to-tail polymers by CDC2 kinase. *EMBO J* 10, 1535–1544.
- Petrof, B.J., Shrager, J.B., Stedman, H.H., Kelly, A.M., and Sweeney, H.L. (1993). Dystrophin protects the sarcolemma from stresses developed during muscle contraction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 3710–3714.
- Pillai, V.B., Sundaresan, N.R., Kim, G., Gupta, M., Rajamohan, S.B., Pillai, J.B., Samant, S., Ravindra, P.V., Isbatan, A., and Gupta, M.P. (2010). Exogenous NAD blocks cardiac hypertrophic response via activation of the SIRT3-LKB1-AMP-activated kinase pathway. *J. Biol. Chem.* 285, 3133–3144.
- Pitrez, P.R., Estronca, L., Monteiro, L.M., Colell, G., Vazão, H., Santinha, D., Harhour, K., Thornton, D., Navarro, C., Egesipe, A.-L., et al. (2020). Vulnerability of progeroid smooth muscle cells to biomechanical forces is mediated by MMP13. *Nat Commun* 11, 4110.
- Prakash, A., Gordon, L.B., Kleinman, M.E., Gurary, E.B., Massaro, J., D’Agostino, R., Kieran, M.W., Gerhard-Herman, M., and Smoot, L. (2018). Cardiac Abnormalities in Patients With Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome. *JAMA Cardiol* 3, 326–334.
- Prokocimer, M., Barkan, R., and Gruenbaum, Y. (2013). Hutchinson-Gilford progeria syndrome through the lens of transcription. *Aging Cell* 12, 533–543.
- Puckelwartz, M.J., Depreux, F.F., and McNally, E.M. (2011). Gene expression, chromosome position and lamin A/C mutations. *Nucleus* 2, 162–167.

- Purnell, M.R., and Whish, W.J. (1980). Novel inhibitors of poly(ADP-ribose) synthetase. *Biochem J* 185, 775–777.
- Qian, M., Liu, Z., Peng, L., Tang, X., Meng, F., Ao, Y., Zhou, M., Wang, M., Cao, X., Qin, B., et al. (2018). Boosting ATM activity alleviates aging and extends lifespan in a mouse model of progeria. *Elife* 7, e34836.
- Quijano-Roy, S., Mbieleu, B., Bönnemann, C.G., Jeannet, P.-Y., Colomer, J., Clarke, N.F., Cuisset, J.-M., Roper, H., De Meirleir, L., D’Amico, A., et al. (2008). De novo LMNA mutations cause a new form of congenital muscular dystrophy. *Ann Neurol* 64, 177–186.
- Quirós-González, I., Román-García, P., Alonso-Montes, C., Barrio-Vázquez, S., Carrillo-López, N., Naves-Díaz, M., Mora, M.I., Corrales, F.J., López-Hernández, F.J., Ruiz-Torres, M.P., et al. (2016). Lamin A is involved in the development of vascular calcification induced by chronic kidney failure and phosphorus load. *Bone* 84, 160–168.
- Ragnauth, C.D., Warren, D.T., Liu, Y., McNair, R., Tajsic, T., Figg, N., Shroff, R., Skepper, J., and Shanahan, C.M. (2010). Prelamin A acts to accelerate smooth muscle cell senescence and is a novel biomarker of human vascular aging. *Circulation* 121, 2200–2210.
- Rajman, L., Chwalek, K., and Sinclair, D.A. (2018). Therapeutic Potential of NAD-Boosting Molecules: The In Vivo Evidence. *Cell Metab* 27, 529–547.
- Rall, S., and Grimm, T. (2012). Survival in Duchenne muscular dystrophy. *Acta Myol* 31, 117–120.
- Ratajczak, J., Joffraud, M., Trammell, S.A.J., Ras, R., Canela, N., Boutant, M., Kulkarni, S.S., Rodrigues, M., Redpath, P., Migaud, M.E., et al. (2016). NRK1 controls nicotinamide mononucleotide and nicotinamide riboside metabolism in mammalian cells. *Nat Commun* 7, 13103.
- Redwood, A.B., Perkins, S.M., Vanderwaal, R.P., Feng, Z., Biehl, K.J., Gonzalez-Suarez, I., Morgado-Palacin, L., Shi, W., Sage, J., Roti-Roti, J.L., et al. (2011). A dual role for A-type lamins in DNA double-strand break repair. *Cell Cycle* 10, 2549–2560.
- Reeder, R.H., Ueda, K., Honjo, T., Nishizuka, Y., and Hayaishi, O. (1967). Studies on the polymer of adenosine diphosphate ribose. II. Characterization of the polymer. *J Biol Chem* 242, 3172–3179.
- Renou, L., Stora, S., Yaou, R.B., 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.
- Revollo, J.R., Grimm, A.A., and Imai, S. (2004). The NAD biosynthesis pathway mediated by nicotinamide phosphoribosyltransferase regulates Sir2 activity in mammalian cells. *J Biol Chem* 279, 50754–50763.
- Richards, S.A., Muter, J., Ritchie, P., Lattanzi, G., and Hutchison, C.J. (2011). The accumulation of un-repairable DNA damage in laminopathy progeria fibroblasts is caused by ROS generation and is prevented by treatment with N-acetyl cysteine. *Hum Mol Genet* 20, 3997–4004.
- Rivera-Torres, J., Acín-Perez, R., Cabezas-Sánchez, P., Osorio, F.G., Gonzalez-Gómez, C., Megias, D., Cámara, C., López-Otín, C., Enríquez, J.A., Luque-García, J.L., et al. (2013). Identification of mitochondrial dysfunction in Hutchinson-Gilford progeria syndrome

- through use of stable isotope labeling with amino acids in cell culture. *J Proteomics* 91, 466–477.
- Rivera-Torres, J., Calvo, C.J., Llach, A., Guzmán-Martínez, G., Caballero, R., González-Gómez, C., Jiménez-Borreguero, L.J., Guadix, J.A., Osorio, F.G., López-Otín, C., et al. (2016). Cardiac electrical defects in progeroid mice and Hutchinson-Gilford progeria syndrome patients with nuclear lamina alterations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113, E7250–E7259.
- Rodriguez, S., Coppède, 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.
- Rodríguez-Vargas, J.M., Oliver-Pozo, F.J., and Dantzer, F. (2019). PARP1 and Poly(ADP-ribose) Signaling during Autophagy in Response to Nutrient Deprivation. *Oxid Med Cell Longev* 2019, 2641712.
- Rogakou, E.P., Boon, C., Redon, C., and Bonner, W.M. (1999). Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo. *J Cell Biol* 146, 905–916.
- Rork, J.F., Huang, J.T., Gordon, L.B., Kleinman, M., Kieran, M.W., and Liang, M.G. (2014). Initial cutaneous manifestations of Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Pediatr Dermatol* 31, 196–202.
- Rosengardten, Y., McKenna, T., Grochová, D., and Eriksson, M. (2011). Stem cell depletion in Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Aging Cell* 10, 1011–1020.
- Ruf, A., Mennissier de Murcia, J., de Murcia, G., and Schulz, G.E. (1996). Structure of the catalytic fragment of poly(AD-ribose) polymerase from chicken. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 7481–7485.
- Ryu, D., Zhang, H., Ropelle, E.R., Sorrentino, V., Mázala, D.A.G., Mouchiroud, L., Marshall, P.L., Campbell, M.D., Ali, A.S., Knowels, G.M., et al. (2016). NAD⁺ repletion improves muscle function in muscular dystrophy and counters global PARylation. *Sci Transl Med* 8, 361ra139.
- Rzepecki, R., Bogachev, S.S., Kokoza, E., Stuurman, N., and Fisher, P.A. (1998). In vivo association of lamins with nucleic acids in *Drosophila melanogaster*. *J Cell Sci* 111 (Pt 1), 121–129.
- Sadhukhan, R., and Ghosh, U. (2021). PARP1 modulates telomere sister chromatid exchange and telomere length homeostasis by regulating telomere localization of SLX4 in U2OS cells. *Life Sci* 277, 119556.
- Salamat, M., Dhar, P.K., Neagu, D.L., and Lyon, J.B. (2010). Aortic calcification in a patient with hutchinson-gilford progeria syndrome. *Pediatr Cardiol* 31, 925–926.
- Sánchez-López, A., Espinós-Estévez, C., González-Gómez, C., Gonzalo, P., Andrés-Manzano, M.J., Fanjul, V., Riquelme-Borja, R., Hamczyk, M.R., Macías, Á., Del Campo, L., et al. (2021). Cardiovascular Progerin Suppression and lamin A Restoration Rescues Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome. *Circulation*.
- Sander, B.J., Oelshlegel, F.J., and Brewer, G.J. (1976a). Quantitative analysis of pyridine nucleotides in red blood cells: a single-step extraction procedure. *Anal Biochem* 71, 29–36.
- Sander, B.J., Oelshlegel, F.J., and Brewer, G.J. (1976b). Quantitative analysis of pyridine nucleotides in red blood cells: a single-step extraction procedure. *Anal. Biochem.* 71,

29–36.

- Santiago-Fernández, O., Osorio, F.G., Quesada, V., Rodríguez, F., Basso, S., Maeso, D., Rolas, L., Barkaway, A., Nourshargh, S., Folgueras, A.R., et al. (2019). Development of a CRISPR/Cas9-based therapy for Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Nat Med* 25, 423–426.
- 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.
- Scheibye-Knudsen, M., Mitchell, S.J., Fang, E.F., Iyama, T., Ward, T., Wang, J., Dunn, C.A., Singh, N., Veith, S., Hasan-Olive, M.M., et al. (2014). A high-fat diet and NAD(+) activate Sirt1 to rescue premature aging in cockayne syndrome. *Cell Metab* 20, 840–855.
- Schirmer, E.C., and Gerace, L. (2004). The stability of the nuclear lamina polymer changes with the composition of lamin subtypes according to their individual binding strengths. *J Biol Chem* 279, 42811–42817.
- Schirmer, E.C., Guan, T., and Gerace, L. (2001). Involvement of the lamin rod domain in heterotypic lamin interactions important for nuclear organization. *J Cell Biol* 153, 479–489.
- Schuldt, A. (2013). Mechanotransduction: Lamin A for tension relief. *Nat Rev Mol Cell Biol* 14, 610.
- Schultz, N., Lopez, E., Saleh-Gohari, N., and Helleday, T. (2003). Poly(ADP-ribose) polymerase (PARP-1) has a controlling role in homologous recombination. *Nucleic Acids Res* 31, 4959–4964.
- Shackleton, S., Lloyd, D.J., Jackson, S.N., Evans, R., Niermeijer, M.F., Singh, B.M., Schmidt, H., Brabant, G., Kumar, S., Durrington, P.N., et al. (2000). LMNA, encoding lamin A/C, is mutated in partial lipodystrophy. *Nat Genet* 24, 153–156.
- Shay, J.W., Pereira-Smith, O.M., and Wright, W.E. (1991). A role for both RB and p53 in the regulation of human cellular senescence. *Exp Cell Res* 196, 33–39.
- Shieh, W.M., Amé, J.C., Wilson, M.V., Wang, Z.Q., Koh, D.W., Jacobson, M.K., and Jacobson, E.L. (1998). Poly(ADP-ribose) polymerase null mouse cells synthesize ADP-ribose polymers. *J Biol Chem* 273, 30069–30072.
- Shimi, T., Pflieger, K., Kojima, S., Pack, C.-G., Solovei, I., Goldman, A.E., Adam, S.A., Shumaker, D.K., Kinjo, M., Cremer, T., et al. (2008). The A- and B-type nuclear lamin networks: microdomains involved in chromatin organization and transcription. *Genes Dev* 22, 3409–3421.
- Shimi, T., Kittisopikul, M., Tran, J., Goldman, A.E., Adam, S.A., Zheng, Y., Jaqaman, K., and Goldman, R.D. (2015). Structural organization of nuclear lamins A, C, B1, and B2 revealed by superresolution microscopy. *Mol Biol Cell* 26, 4075–4086.
- Shimizu, R.T., Blank, R.S., Jervis, R., Lawrenz-Smith, S.C., and Owens, G.K. (1995). The smooth muscle alpha-actin gene promoter is differentially regulated in smooth muscle versus non-smooth muscle cells. *J Biol Chem* 270, 7631–7643.
- Shimizu-Motohashi, Y., Komaki, H., Motohashi, N., Takeda, S., Yokota, T., and Aoki, Y. (2019). Restoring Dystrophin Expression in Duchenne Muscular Dystrophy: Current

Status of Therapeutic Approaches. *J Pers Med* 9, E1.

- Shimokawa, T., Masutani, M., Nozaki, T., Nakagama, H., Araki, S., Aoki, Y., and Sugimura, T. (1998). The human poly(ADP-ribose) glycohydrolase maps to chromosome 10q11.23-21.1 by fluorescence in situ hybridization. *Hum Cell* 11, 243–246.
- Shoeman, R.L., and Traub, P. (1990). The in vitro DNA-binding properties of purified nuclear lamin proteins and vimentin. *J Biol Chem* 265, 9055–9061.
- Shumaker, D.K., Dechat, T., Kohlmaier, A., Adam, S.A., Bozovsky, M.R., Erdos, M.R., Eriksson, M., Goldman, A.E., Khuon, S., Collins, F.S., et al. (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, D.K., Solimando, L., Sengupta, K., Shimi, T., Adam, S.A., Grunwald, A., Strelkov, S.V., Aebi, U., Cardoso, M.C., and Goldman, R.D. (2008). The highly conserved nuclear lamin Ig-fold binds to PCNA: its role in DNA replication. *J Cell Biol* 181, 269–280.
- Sidi, S., and Rosa, F.M. (2004). [Mechanotransduction of hemodynamic forces regulates organogenesis]. *Med Sci (Paris)* 20, 557–561.
- Silvera, V.M., Gordon, L.B., Orbach, D.B., Campbell, S.E., Machan, J.T., and Ullrich, N.J. (2013). Imaging characteristics of cerebrovascular arteriopathy and stroke in Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *AJNR Am J Neuroradiol* 34, 1091–1097.
- Simon, D.N., and Wilson, K.L. (2013). Partners and post-translational modifications of nuclear lamins. *Chromosoma* 122, 13–31.
- Sivaraman, null, Thappa, D.M., D'Souza, M., and Ratnakar, C. (1999). Progeria (Hutchinson-Gilford): a case report. *J Dermatol* 26, 324–328.
- Soldatenkov, V.A., Albor, A., Patel, B.K., Dreszer, R., Dritschilo, A., and Notario, V. (1999). Regulation of the human poly(ADP-ribose) polymerase promoter by the ETS transcription factor. *Oncogene* 18, 3954–3962.
- Soldatenkov, V.A., Trofimova, I.N., Rouzaut, A., McDermott, F., Dritschilo, A., and Notario, V. (2002). Differential regulation of the response to DNA damage in Ewing's sarcoma cells by ETS1 and EWS/FLI-1. *Oncogene* 21, 2890–2895.
- Song, E.-K., Rah, S.-Y., Lee, Y.-R., Yoo, C.-H., Kim, Y.-R., Yeom, J.-H., Park, K.-H., Kim, J.-S., Kim, U.-H., and Han, M.-K. (2011). Connexin-43 hemichannels mediate cyclic ADP-ribose generation and its Ca²⁺-mobilizing activity by NAD⁺/cyclic ADP-ribose transport. *J. Biol. Chem.* 286, 44480–44490.
- Song, M., San, H., Anderson, S.A., Cannon, R.O., and Orlic, D. (2014). Shear stress-induced mechanotransduction protein deregulation and vasculopathy in a mouse model of progeria. *Stem Cell Res Ther* 5, 41.
- Spagnolo, L., Barbeau, J., Curtin, N.J., Morris, E.P., and Pearl, L.H. (2012). Visualization of a DNA-PK/PARP1 complex. *Nucleic Acids Res* 40, 4168–4177.
- Spann, T.P., Moir, R.D., Goldman, A.E., Stick, R., and Goldman, R.D. (1997). Disruption of nuclear lamin organization alters the distribution of replication factors and inhibits DNA synthesis. *J Cell Biol* 136, 1201–1212.
- Spann, T.P., Goldman, A.E., Wang, C., Huang, S., and Goldman, R.D. (2002). Alteration of nuclear lamin organization inhibits RNA polymerase II-dependent transcription. *J Cell Biol* 156, 603–608.

- van Steensel, B., and Belmont, A.S. (2017a). Lamina-Associated Domains: Links with Chromosome Architecture, Heterochromatin, and Gene Repression. *Cell* 169, 780–791.
- van Steensel, B., and Belmont, A.S. (2017b). Lamina-Associated Domains: Links with Chromosome Architecture, Heterochromatin, and Gene Repression. *Cell* 169, 780–791.
- Stehbens, W.E., Wakefield, S.J., Gilbert-Barnes, E., Olson, R.E., and Ackerman, J. (1999). Histological and ultrastructural features of atherosclerosis in progeria. *Cardiovasc Pathol* 8, 29–39.
- Stehbens, W.E., Delahunt, B., Shozawa, T., and Gilbert-Barnes, E. (2001). Smooth muscle cell depletion and collagen types in progeric arteries. *Cardiovasc Pathol* 10, 133–136.
- Stein, L.R., and Imai, S. (2012). The dynamic regulation of NAD metabolism in mitochondria. *Trends Endocrinol Metab* 23, 420–428.
- Stenmark, K.R., Yeager, M.E., El Kasmi, K.C., Nozik-Grayck, E., Gerasimovskaya, E.V., Li, M., Riddle, S.R., and Frid, M.G. (2013). The adventitia: essential regulator of vascular wall structure and function. *Annu Rev Physiol* 75, 23–47.
- Stick, R., Angres, B., Lehner, C.F., and Nigg, E.A. (1988). The fates of chicken nuclear lamin proteins during mitosis: evidence for a reversible redistribution of lamin B2 between inner nuclear membrane and elements of the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* 107, 397–406.
- Stierlé, V., Couprie, J., Ostlund, C., Krimm, I., Zinn-Justin, S., Hossenlopp, P., Worman, H.J., Courvalin, J.-C., and Duband-Goulet, I. (2003). The carboxyl-terminal region common to lamins A and C contains a DNA binding domain. *Biochemistry* 42, 4819–4828.
- Strandgren, C., Revêchon, G., Sola-Carvajal, A., and Eriksson, M. (2017). Emerging candidate treatment strategies for Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Biochem Soc Trans* 45, 1279–1293.
- Stuurman, N., Heins, S., and Aebi, U. (1998). Nuclear lamins: their structure, assembly, and interactions. *J Struct Biol* 122, 42–66.
- Sugimura, T., Fujimura, S., Hasegawa, S., and Kawamura, Y. (1967). Polymerization of the adenosine 5'-diphosphate ribose moiety of NAD by rat liver nuclear enzyme. *Biochim Biophys Acta* 138, 438–441.
- Sullivan, T., Escalante-Alcalde, D., Bhatt, H., Anver, M., Bhat, N., Nagashima, K., Stewart, C.L., and Burke, B. (1999). Loss of A-type lamin expression compromises nuclear envelope integrity leading to muscular dystrophy. *J Cell Biol* 147, 913–920.
- Swift, J., Ivanovska, I.L., Buxboim, A., Harada, T., Dingal, P.C.D.P., Pinter, J., Pajeroski, J.D., Spinler, K.R., Shin, J.-W., Tewari, M., et al. (2013). Nuclear lamin-A scales with tissue stiffness and enhances matrix-directed differentiation. *Science* 341, 1240104.
- Szántó, M., and Bai, P. (2020). The role of ADP-ribose metabolism in metabolic regulation, adipose tissue differentiation, and metabolism. *Genes Dev* 34, 321–340.
- 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.
- Tang, Y., Yang, X., Friesel, R.E., Vary, C.P.H., and Liaw, L. (2011). Mechanisms of TGF- β -induced differentiation in human vascular smooth muscle cells. *J Vasc Res* 48, 485–494.
- Thijssen, D.H.J., Carter, S.E., and Green, D.J. (2016). Arterial structure and function in

- vascular ageing: are you as old as your arteries? *J Physiol* 594, 2275–2284.
- Trammell, S.A.J., Schmidt, M.S., Weidemann, B.J., Redpath, P., Jaksch, F., Dellinger, R.W., Li, Z., Abel, E.D., Migaud, M.E., and Brenner, C. (2016). Nicotinamide riboside is uniquely and orally bioavailable in mice and humans. *Nat Commun* 7, 12948.
- Turgay, Y., Eibauer, M., Goldman, A.E., Shimi, T., Khayat, M., Ben-Harush, K., Dubrovsky-Gaup, A., Sapra, K.T., Goldman, R.D., and Medalia, O. (2017). The molecular architecture of lamins in somatic cells. *Nature* 543, 261–264.
- Tyson, J., Bundy, K., Roach, C., Douglas, H., Ventura, V., Segars, M.F., Schwartz, O., and Simpson, C.L. (2020). Mechanisms of the Osteogenic Switch of Smooth Muscle Cells in Vascular Calcification: WNT Signaling, BMPs, Mechanotransduction, and EndMT. *Bioengineering (Basel)* 7, E88.
- Ummarino, S., Mozzon, M., Zamporlini, F., Amici, A., Mazzola, F., Orsomando, G., Ruggieri, S., and Raffaelli, N. (2017). Simultaneous quantitation of nicotinamide riboside, nicotinamide mononucleotide and nicotinamide adenine dinucleotide in milk by a novel enzyme-coupled assay. *Food Chem* 221, 161–168.
- Valentine, B.A., Cooper, B.J., de Lahunta, A., O’Quinn, R., and Blue, J.T. (1988). Canine X-linked muscular dystrophy. An animal model of Duchenne muscular dystrophy: clinical studies. *J Neurol Sci* 88, 69–81.
- Varela, I., Pereira, S., Ugalde, A.P., Navarro, C.L., Suárez, M.F., Cau, P., Cadiñanos, J., Osorio, F.G., Foray, N., Cobo, J., et al. (2008). Combined treatment with statins and aminobisphosphonates extends longevity in a mouse model of human premature aging. *Nat Med* 14, 767–772.
- Varga, R., Eriksson, M., Erdos, M.R., Olive, M., Harten, I., Kolodgie, F., Capell, B.C., Cheng, J., Faddah, D., Perkins, S., et al. (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.
- Verdin, E. (2015). NAD⁺ in aging, metabolism, and neurodegeneration. *Science* 350, 1208–1213.
- Vergnes, L., Péterfy, M., Bergo, M.O., Young, S.G., and Reue, K. (2004). Lamin B1 is required for mouse development and nuclear integrity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 10428–10433.
- Vida, A., Abdul-Rahman, O., Mikó, E., Brunyánszki, A., and Bai, P. (2016). Poly(ADP-Ribose) Polymerases in Aging - Friend or Foe? *Curr Protein Pept Sci* 17, 705–712.
- Vidak, S., and Foisner, R. (2016). Molecular insights into the premature aging disease progeria. *Histochem Cell Biol* 145, 401–417.
- Vignier, N., Chatzifrangkeskou, M., Morales Rodriguez, B., Mericskay, M., Mougnot, N., Wahbi, K., Bonne, G., and Muchir, A. (2018). Rescue of biosynthesis of nicotinamide adenine dinucleotide protects the heart in cardiomyopathy caused by lamin A/C gene mutation. *Hum. Mol. Genet.* 27, 3870–3880.
- Vigouroux, C., Auclair, M., Dubosclard, E., Pouchelet, M., Capeau, J., Courvalin, J.C., and Buendia, B. (2001). Nuclear envelope disorganization in fibroblasts from lipodystrophic patients with heterozygous R482Q/W mutations in the lamin A/C gene. *J Cell Sci* 114, 4459–4468.

- Villa-Bellosta, R., Rivera-Torres, J., Osorio, F.G., Acín-Pérez, R., Enriquez, J.A., López-Otín, C., and Andrés, V. (2013a). 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-Bellosta, R., Rivera-Torres, J., Osorio, F.G., Acín-Pérez, R., Enriquez, J.A., López-Otín, C., and Andrés, V. (2013b). 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.
- Villanova, M., and Kazibwe, S. (2017). New Survival Target for Duchenne Muscular Dystrophy. *Am J Phys Med Rehabil* 96, e28–e30.
- Virág, L., and Szabó, C. (2002). The therapeutic potential of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors. *Pharmacol Rev* 54, 375–429.
- Virág, L., Robaszkiewicz, A., Rodriguez-Vargas, J.M., and Oliver, F.J. (2013). Poly(ADP-ribose) signaling in cell death. *Mol Aspects Med* 34, 1153–1167.
- Wacker, D.A., Ruhl, D.D., Balagamwala, E.H., Hope, K.M., Zhang, T., and Kraus, W.L. (2007). The DNA binding and catalytic domains of poly(ADP-ribose) polymerase 1 cooperate in the regulation of chromatin structure and transcription. *Mol Cell Biol* 27, 7475–7485.
- Walling, B.L., and Murphy, P.M. (2021). Protean Regulation of Leukocyte Function by Nuclear Lamins. *Trends Immunol* 42, 323–335.
- Wang, F., Zhang, W., Yang, Q., Kang, Y., Fan, Y., Wei, J., Liu, Z., Dai, S., Li, H., Li, Z., et al. (2020). Generation of a Hutchinson-Gilford progeria syndrome monkey model by base editing. *Protein Cell* 11, 809–824.
- Wang, Y., Dawson, V.L., and Dawson, T.M. (2009). Poly(ADP-ribose) signals to mitochondrial AIF: a key event in parthanatos. *Exp Neurol* 218, 193–202.
- Wang, Y., Kim, N.S., Haince, J.-F., Kang, H.C., David, K.K., Andrabi, S.A., Poirier, G.G., Dawson, V.L., and Dawson, T.M. (2011). Poly(ADP-ribose) (PAR) binding to apoptosis-inducing factor is critical for PAR polymerase-1-dependent cell death (parthanatos). *Sci Signal* 4, ra20.
- Watson, A., Nong, Z., Yin, H., O’Neil, C., Fox, S., Balint, B., Guo, L., Leo, O., Chu, M.W.A., Gros, R., et al. (2017). Nicotinamide Phosphoribosyltransferase in Smooth Muscle Cells Maintains Genome Integrity, Resists Aortic Medial Degeneration, and Is Suppressed in Human Thoracic Aortic Aneurysm Disease. *Circ Res* 120, 1889–1902.
- Weaver, A.N., and Yang, E.S. (2013). Beyond DNA Repair: Additional Functions of PARP-1 in Cancer. *Front Oncol* 3, 290.
- Webb, R.C. (2003). Smooth muscle contraction and relaxation. *Adv Physiol Educ* 27, 201–206.
- Weber, K., Plessmann, U., and Traub, P. (1989). Maturation of nuclear lamin A involves a specific carboxy-terminal trimming, which removes the polyisoprenylation site from the precursor; implications for the structure of the nuclear lamina. *FEBS Lett* 257, 411–414.
- Wei, H., and Yu, X. (2016). Functions of PARylation in DNA Damage Repair Pathways.

Genomics Proteomics Bioinformatics 14, 131–139.

- Wein, K.H., Netzker, R., and Brand, K. (1993). Cell cycle-related expression of poly(ADP-ribose)transferase in proliferating rat thymocytes. *Biochim Biophys Acta* 1176, 69–76.
- Wen, B., Wu, H., Shinkai, Y., Irizarry, R.A., and Feinberg, A.P. (2009). Large histone H3 lysine 9 dimethylated chromatin blocks distinguish differentiated from embryonic stem cells. *Nat Genet* 41, 246–250.
- Wenzel, V., Roedl, D., Gabriel, D., Gordon, L.B., Herlyn, M., Schneider, R., Ring, J., and Djabali, K. (2012). Naïve adult stem cells from patients with Hutchinson-Gilford progeria syndrome express low levels of progerin in vivo. *Biol Open* 1, 516–526.
- Willaume, S., Rass, E., Fontanilla-Ramirez, P., Moussa, A., Wanschoor, P., and Bertrand, P. (2021). A Link between Replicative Stress, Lamin Proteins, and Inflammation. *Genes (Basel)* 12, 552.
- Wood, A.M., Rendtlew Danielsen, J.M., Lucas, C.A., Rice, E.L., Scalzo, D., Shimi, T., Goldman, R.D., Smith, E.D., Le Beau, M.M., and Kosak, S.T. (2014). TRF2 and lamin A/C interact to facilitate the functional organization of chromosome ends. *Nat Commun* 5, 5467.
- Worman, H.J. (2012). Nuclear lamins and laminopathies. *J Pathol* 226, 316–325.
- Wydner, K.L., McNeil, J.A., Lin, F., Worman, H.J., and Lawrence, J.B. (1996). Chromosomal assignment of human nuclear envelope protein genes LMNA, LMNB1, and LBR by fluorescence in situ hybridization. *Genomics* 32, 474–478.
- Xiong, Z.-M., Choi, J.Y., Wang, K., Zhang, H., Tariq, Z., Wu, D., Ko, E., LaDana, C., Sesaki, H., and Cao, K. (2016). Methylene blue alleviates nuclear and mitochondrial abnormalities in progeria. *Aging Cell* 15, 279–290.
- Yamada, M., Miwa, M., and Sugimura, T. (1971). Studies on poly (adenosine diphosphate-ribose). X. Properties of a partially purified poly (adenosine diphosphate-ribose) polymerase. *Arch Biochem Biophys* 146, 579–586.
- Ye, Q., and Worman, H.J. (1995). Protein-protein interactions between human nuclear lamins expressed in yeast. *Exp Cell Res* 219, 292–298.
- Ying, S., Hamdy, F.C., and Helleday, T. (2012). Mre11-dependent degradation of stalled DNA replication forks is prevented by BRCA2 and PARP1. *Cancer Res* 72, 2814–2821.
- Yoshino, J., Mills, K.F., Yoon, M.J., and Imai, S. (2011). Nicotinamide mononucleotide, a key NAD(+) intermediate, treats the pathophysiology of diet- and age-induced diabetes in mice. *Cell Metab.* 14, 528–536.
- Yoshino, J., Baur, J.A., and Imai, S.-I. (2018). NAD⁺ Intermediates: The Biology and Therapeutic Potential of NMN and NR. *Cell Metab* 27, 513–528.
- Yu, C.E., Oshima, J., Fu, Y.H., Wijsman, E.M., Hisama, F., Alisch, R., Matthews, S., Nakura, J., Miki, T., Ouais, S., et al. (1996). Positional cloning of the Werner's syndrome gene. *Science* 272, 258–262.
- Yu, S.-W., Wang, H., Poitras, M.F., Coombs, C., Bowers, W.J., Federoff, H.J., Poirier, G.G., Dawson, T.M., and Dawson, V.L. (2002). Mediation of poly(ADP-ribose) polymerase-1-dependent cell death by apoptosis-inducing factor. *Science* 297, 259–263.
- Yu, S.-W., Andrabi, S.A., Wang, H., Kim, N.S., Poirier, G.G., Dawson, T.M., and Dawson, V.L. (2006). Apoptosis-inducing factor mediates poly(ADP-ribose) (PAR) polymer-induced

- cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 18314–18319.
- Zaghini, A., Sarli, G., Barboni, C., Sanapo, M., Pellegrino, V., Diana, A., Linta, N., Rambaldi, J., D'Apice, M.R., Murdocca, M., et al. (2020). Long term breeding of the Lmna G609G progeric mouse: Characterization of homozygous and heterozygous models. *Exp Gerontol* 130, 110784.
- Zaniolo, K., Desnoyers, S., Leclerc, S., and Guérin, S.L. (2007). Regulation of poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) gene expression through the post-translational modification of Sp1: a nuclear target protein of PARP-1. *BMC Mol Biol* 8, 96.
- Zhang, H., Xiong, Z.-M., and Cao, K. (2014a). Mechanisms controlling the smooth muscle cell death in progeria via down-regulation of poly(ADP-ribose) polymerase 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111, E2261-2270.
- Zhang, H., Xiong, Z.-M., and Cao, K. (2014b). Mechanisms controlling the smooth muscle cell death in progeria via down-regulation of poly(ADP-ribose) polymerase 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111, E2261-2270.
- Zhang, H., Ryu, D., Wu, Y., Gariani, K., Wang, X., Luan, P., D'Amico, D., Ropelle, E.R., Lutolf, M.P., Aebbersold, R., et al. (2016). NAD⁺ repletion improves mitochondrial and stem cell function and enhances life span in mice. *Science* 352, 1436–1443.
- Zhang, J., Lian, Q., Zhu, G., Zhou, F., Sui, L., Tan, C., Mutalif, 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.
- Zhang, R., Shen, Y., Zhou, L., Sangwung, P., Fujioka, H., Zhang, L., and Liao, X. (2017). Short-term administration of Nicotinamide Mononucleotide preserves cardiac mitochondrial homeostasis and prevents heart failure. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 112, 64–73.
- Zhang, S., Lin, Y., Kim, Y.-S., Hande, M.P., Liu, Z.-G., and Shen, H.-M. (2007). c-Jun N-terminal kinase mediates hydrogen peroxide-induced cell death via sustained poly(ADP-ribose) polymerase-1 activation. *Cell Death Differ* 14, 1001–1010.
- Zhao, K., Harel, A., Stuurman, N., Guedalia, D., and Gruenbaum, Y. (1996). Binding of matrix attachment regions to nuclear lamin is mediated by the rod domain and depends on the lamin polymerization state. *FEBS Lett* 380, 161–164.

Chapitre 5

ANNEXES

Ce chapitre est composé de deux articles publiés. Le premier est une revue qui expose les différentes études mettant en avant l'importance du NAD⁺ dans les laminopathies des muscles striés. Le deuxième article est une revue qui résume les différentes molécules pharmaceutiques potentiellement repositionnables dans le traitement de la progéria.

5.1. Article n°3 (REVUE)

Need for NAD⁺: Focus on Striated Muscle Laminopathies

Déborah Cardoso and Antoine Muchir

Parue le 7 octobre 2020 dans le journal Cells.

Facteur d'impact de Cells (2019) : 4.4

Review

Need for NAD⁺: Focus on Striated Muscle Laminopathies

Déborah Cardoso and Antoine Muchir * 

INSERM, Institute of Myology, Center of Research in Myology, Sorbonne University, 75013 Paris, France; d.cardoso@institut-myologie.org

* Correspondence: a.muchir@institut-myologie.org; Tel.: +33-(1)-42-16-57-05

Received: 15 September 2020; Accepted: 5 October 2020; Published: 7 October 2020



Abstract: Laminopathies are a heterogeneous group of rare diseases caused by genetic mutations in the *LMNA* gene, encoding A-type lamins. A-type lamins are nuclear envelope proteins which associate with B-type lamins to form the nuclear lamina, a meshwork underlying the inner nuclear envelope of differentiated cells. The laminopathies include lipodystrophies, progeroid phenotypes and striated muscle diseases. Research on striated muscle laminopathies in the recent years has provided novel perspectives on the role of the nuclear lamina and has shed light on the pathological consequences of altered nuclear lamina. The role of altered nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺) in the physiopathology of striated muscle laminopathies has been recently highlighted. Here, we have summarized these findings and reviewed the current knowledge about NAD⁺ alteration in striated muscle laminopathies, providing potential therapeutic approaches.

Keywords: striated muscle laminopathies; NAD⁺; dilated cardiomyopathy; Emery–Dreifuss muscular dystrophy; therapies

1. Introduction

Laminopathies are a heterogeneous group of genetic disorders caused by mutations in *LMNA*, which encodes nuclear A-type lamins: lamins A and C. Generated by alternative splicing, lamins A and C are identical for most of their sequence but differ from their C-terminal domains [1]. The central rod domain of A-type lamins consists of heptad repeats, which drives the interaction between two lamin proteins, the basic structural unit of lamins assembly. The rod domain is flanked by N- and C-terminal non- α -helical domains. The C-terminal domain has a nuclear localization sequence (NLS) for nuclear import (sequence KKRKLE). In addition, lamin A but not lamin C has a CaaX motif (sequence CSIM), which undergoes cleavage of the last three amino acids and isoprenylation of the terminal cysteine residue. The C-terminal 18 amino acids of lamin A, including the isoprenyl group, is removed by proteolysis. Lamins A and C, which are members of the intermediate filaments family, dimerize and further assemble to form the nuclear lamina [2], a fibrillar meshwork contributing to cellular functions such as mechanotransduction, regulation of gene transcription and chromatin structure [3]. These intermediate filament proteins, the only intermediate filaments located within the nucleus, are expressed in most tissues.

The nuclear lamina is part of the nuclear envelope, which defines the barrier between the nucleus and cytoplasm and features inner and outer membranes separated by a perinuclear space. The nuclear envelope contains specific integral and associated proteins that form a mechanical link, called the LINC (LInker of Nucleoskeleton and Cytoskeleton) complex, tethering the nucleo- and cytoskeleton via the nuclear envelope. This LINC complex may serve as a mechanosensor, translating mechanical cues, which include physical forces and alterations in extracellular matrix mechanics, into biochemical signals, thus allowing cells to adapt to their physical environment. On the other hand, lamins A and C

interact with chromatin through lamina-associated domains (LADs), which impact gene expression and regulation in a tissue-specific manner. The discovery that several genetic diseases are caused by mutations in the *LMNA* gene has resulted in a reassessment of the function of the nuclear lamina.

2. Laminopathies

Since the first description of *LMNA* mutations associated with Emery–Dreifuss muscular dystrophy (EDMD) through positional cloning in 1999 [4], the improvement of genetic strategies allowed the identification of other *LMNA* variants (reviewed by [5]). To date, more than 10 human clinical entities have been attributed to *LMNA* mutations. Collectively named laminopathies, they are commonly classified into four groups according to affected tissue: (i) adipose tissue, (ii) nervous system, (iii) accelerated ageing and (iv) striated muscles [6].

LMNA mutations cause partial lipodystrophy syndromes. Cao and Hegele identified *LMNA* mutations in a monogenic disorder: the Dunnigan-type familial partial lipodystrophy (FPLD) [7]. FPLD is characterized by loss of fat affecting the limbs and trunk from puberty; accumulation of fat in the neck and face; and predisposition to insulin resistance leading to complications such as glucose intolerance, dyslipidemia, high blood pressure, liver steatosis and increased risk for coronary heart disease. FPLD patients are born with normal fat distribution, but after the onset of puberty, there is regional loss of fat from the extremities associated with insulin resistance and, frequently, diabetes mellitus. All FPLD-causing mutations in patients are found within a small cluster of residues exposed on the surface of lamins A and C [8,9].

LMNA got a lot of attention in 2003, when two groups localized Hutchinson–Gilford progeria syndrome (HGPS), a premature ageing syndrome, to the *LMNA* locus [10,11]. In 1886, Jonathan Hutchinson first described what is now known as HGPS. The latter is an extremely rare genetic disorder associated with a characteristic aged appearance very early in life. Children with HGPS appear normal at birth but, within a year, begin to display effects of accelerated ageing. As they mature, the disorder causes children to age about a decade for every year of their life. On average, death occurs at the age of 13, with at least 90% of subjects dying from progressive atherosclerosis of the coronary and cerebral arteries, with tissues such as bone and skin also prominently affected. Interestingly, patients do not suffer from osteoporosis, cancer, increased abdominal fat, cataract or neurodegeneration, signs usually associated with ageing [12]. Recent studies have demonstrated that a microRNA (miR-9) expression prevents progerin accumulation in HGPS neural cells, which explains the absence of brain-associated disorders in HGPS patients [13]. HGPS is a sporadic autosomal dominant disease caused in nearly all cases by a de novo single-base substitution in codon 608 of exon 11 of *LMNA* [10,11]. The *LMNA* mutation creates a cryptic splice donor site, resulting in expression of a truncated pre-lamin A called “progerin” with a 50-amino acid internal deletion near the C-terminus. Pre-lamin A is normally farnesylated on the cysteine of a CaaX motif located at its C-terminus. The prenylated protein is then recognized by an endoprotease and cleaved 15 amino acids away, including the farnesylated cysteine. This cleavage site is deleted from progerin, and hence, it remains farnesylated. Even though no single mechanism has clearly emerged to explain the complex phenotype in HGPS, considerable data suggest that farnesylated progerin is the molecular culprit.

Other progeroid laminopathies have been described, including mandibuloacral dysplasia type A, discovered in 2002 and featuring an intermediate clinical phenotype between FPLD and HGPS. Moreover, the most severe laminopathy so far reported is Restricted dermopathy (RD), which is fatal soon after birth and is caused by accumulation of farnesylated prelamin A. RD should be considered a severe developmental disease mostly affecting skin, though the bone phenotype and molecular defect are almost similar to those of HGPS.

3. Striated Muscle Laminopathies

Among striated muscle laminopathies, EDMD was first described by the study of a family suffering from early contractures, skeletal muscle weakness and cardiomyopathy [14]. The disease can be

transmitted in both an autosomal and X-linked manner (mutations in the *EMD* gene, encoding emerin, which is a protein of the inner nuclear membrane interacting directly with lamins A and C) [15,16]. In EDMD, symptoms generally appear in the first decade of life. Contractures are the first clinical signs of disease and appear before muscle weakness and wasting, which is different from most other muscular dystrophies. Contractures affect the elbows, neck extensor muscles and Achilles tendons and prevent complete extension, leading to difficulties with posture and walking. The slowly progressive muscle weakness and wasting begins in a humero-peroneal distribution (biceps, triceps and peroneal), usually during the end of the second decade of life. Cardiac disease occurs in all cases of EDMD, and in most cases, symptoms begin at the end of the second decade, with no direct relationship to the severity of the skeletal muscle involvement. The initial presentation is usually atrioventricular conduction blockage, and over time, dilated cardiomyopathy develops. Sudden cardiac death is common in EDMD, and insertion of a defibrillator can be a lifesaving measure. Striated muscles laminopathies include also limb-girdle muscular dystrophies type 1 [16,17], *LMNA*-associated congenital muscular dystrophies [18] and isolated dilated cardiomyopathy with conduction defects [19]. These disorders share dilated cardiomyopathy as a common denominator, which has negative effects on health span and quality of life, leading in most cases to heart failure (Figure 1) (reviewed by [20]).

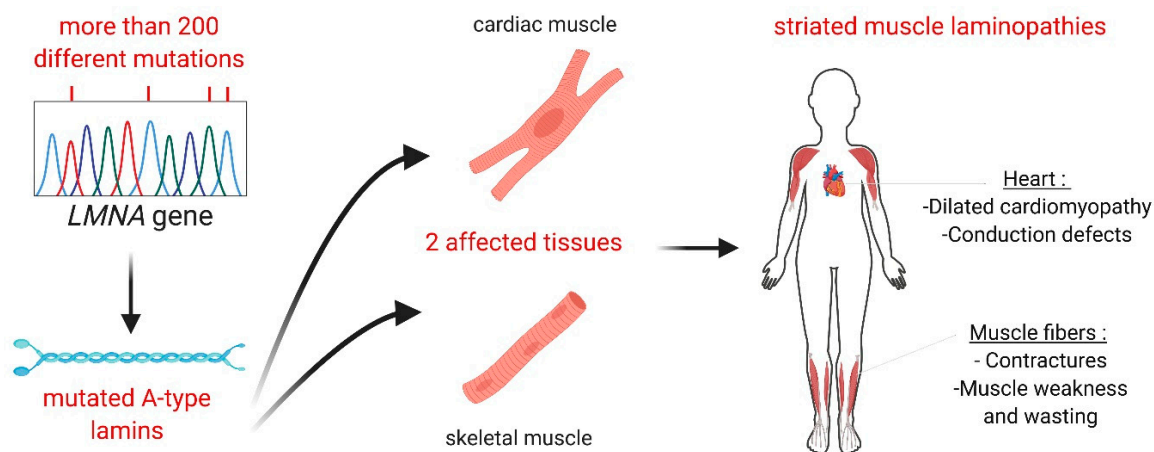


Figure 1. Striated muscle laminopathies: from genotype to phenotype. All along the *LMNA* gene, more than 200 different mutations have been related to striated muscle laminopathies (e.g., p.H222P, p.R190W and p.E65G mutations respectively lead to Emery–Dreifuss muscular dystrophy, limb girdle muscular dystrophy and dilated cardiomyopathy). These mutations in *LMNA* gene, encoding A-type lamins, affect both cardiac and skeletal muscle tissue. Patients with striated muscle laminopathies exhibit different clinical features such as contractures, muscle weakness and wasting, but they all share cardiac dysfunction as a common denominator.

The mechanisms by which mutations in *LMNA*, the gene responsible for the autosomal form of EDMD, cause tissue-specific disorders are poorly understood. Research on striated muscle laminopathies in recent years has provided novel perspectives on the role of the nuclear lamina and has shed light on the pathological consequences of altered nuclear lamina [5]. Although progresses have been made to identify genes causing the disease and to decipher pathological mechanisms, there is currently no curative treatment for these diseases. An emerging body of work supports a new view of the nuclear lamins A and C as a node that integrates and transduces a range of signals during development and in terminally differentiated cells. Hence, beyond its classical barrier function, studies of the nuclear envelope are increasingly providing insights into basic aspects of cellular organization and function, providing novel insights into the pathogenesis of human disease. Dissecting these pathways would likely lead to the discovery of new mechanisms that control development and tissue-specific diseases. Since the discovery that *LMNA* mutations can cause striated muscle pathology, three mutually nonexclusive mechanisms have been hypothesized to underpin the pathogenesis:

(1) impaired nuclear mechanoresistance via the LINC complex, or “mechanical hypothesis”; (2) alteration of lamin A/C-controlled intracellular signalling pathways, or “signalling hypothesis”; and (3) dysregulation of chromatin organization leading to gene expression alterations, or “chromatin hypothesis”.

4. NAD⁺: From Metabolism to Consumption

Altered nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺) metabolism is associated with ageing and many pathological conditions, such as metabolic diseases, and disorders of the muscular system have recently been linked to the development of striated muscles laminopathies. This review focuses on the role played by NAD⁺ metabolism in striated muscles laminopathies, from bench to bedside.

NAD⁺ is a co-factor for several enzymatic reactions [21]. These processes lead to consumption of NAD⁺, resulting ultimately in a constant need to replenish cellular NAD⁺ stores. Thus, maintaining the balance between NAD⁺ degradation and biosynthesis is critical for cellular homeostasis. Skeletal muscle requires massive amounts of energy to sustain contractile function. Given that skeletal muscle energy stores are limited, altered NAD⁺ homeostasis could contribute to the pathogenesis of striated muscle diseases.

In mammals, bearing in mind that only neurons are able to import NAD⁺ [22], tissues like striated muscles use independent intracellular pathways to produce NAD⁺. NAD⁺ can be synthesized from various ways (Figure 2).

De novo and Preiss–Handler pathways lead to NAD⁺ synthesis from tryptophan (Trp) and the vitamin B3 nicotinic acid (NA, Niacin), respectively, in the diet. De novo biosynthesis, which starts from the amino acid Trp, is considered a minor contributor to the total pool of NAD⁺ [23]. During a multi-step reaction called kynurenine pathway, Trp is firstly transformed in aminocarboxymuconic semialdehyde (ACMS) and is then converted into quinolinic acid (QA). The quinolinic acid phospho-ribosyl-transferase (QaPRT) generates the nicotinic acid mono-nucleotide (NAMN) from QA. In parallel, ACMS can be converted into aminomuconic semialdehyde (AMS) by the alpha-amino-beta-carboxy-muconate-semialdehyde decarboxylase (ACMSD). This reaction allows production of acetyl-CoA through tryptophan degradation, which is ultimately utilized in the tricarboxylic acid (TCA) cycle [24]. It is believed that the use of Trp for the TCA cycle or NAD⁺ synthesis is regulated by ACMS accumulation and, therefore, depends on ACMSD activity. Indeed, ACMSD overactivation prevents efficient NAD⁺ synthesis while low ACMSD activity allows efficient tryptophan-to-NAD⁺ conversion [24]. The Preiss–Handler pathway consists in transformation of NA into NAMN through the nicotinate phospho-ribosyl-transferase (NAPRT). Both de novo and the Preiss–Handler pathways end with nicotinamide mono-nucleotide adenylyl-transferase (NMNAT) enzymes that catalyse the NAMN conversion in nicotinic acid adenine dinucleotide (NAAD). Ultimately, NAD synthases (NADS) produce NAD⁺ from NAAD (reviewed in [25]). These pathways are key for NAD⁺ homeostasis. This is depicted by the human disease pellagra, which is caused by NAD⁺ deficiency subsequent to poor dietary intake of precursors. This disease is caused by deficiency of NAD⁺ and can be easily treated by providing vitamin B3 in the diet [26].

The salvage pathway is considered the most important pathway for maintaining intracellular NAD⁺ levels [27]. It is based on recycling of the degradation products generated by the enzymatic activities of NAD⁺ consumer enzymes such as Poly (ADP-Ribose) polymerase (PARPs), Sirtuins (SIRT) and Poly (Adenosine diphospho-ribose) (ADPR) synthases [28]. Initially, nicotinamide (NAM) released during NAD⁺ consumption reactions is recycled into nicotinamide mononucleotide (NMN) by the nicotinamide phosphoribosyl-transferases (NAMPT). The latter are the limiting enzymes of this pathway in converting NMN to NAD⁺ [29,30]. In parallel, nicotinamide riboside kinases (NRK1/2) transform nicotinamide riboside (NR) into NMN [31]. NMN is then converted in NAD⁺ by nicotinamide mononucleotide adenylyl-transferase 1, 2 and 3 (NMNAT 1, 2 and 3) that are respectively expressed in the nucleus, cytoplasm and mitochondria [32]. Supplementation of NR to cells or mice increases the levels of NAD⁺ and results in the activation of its downstream signalling cascades [31,32].

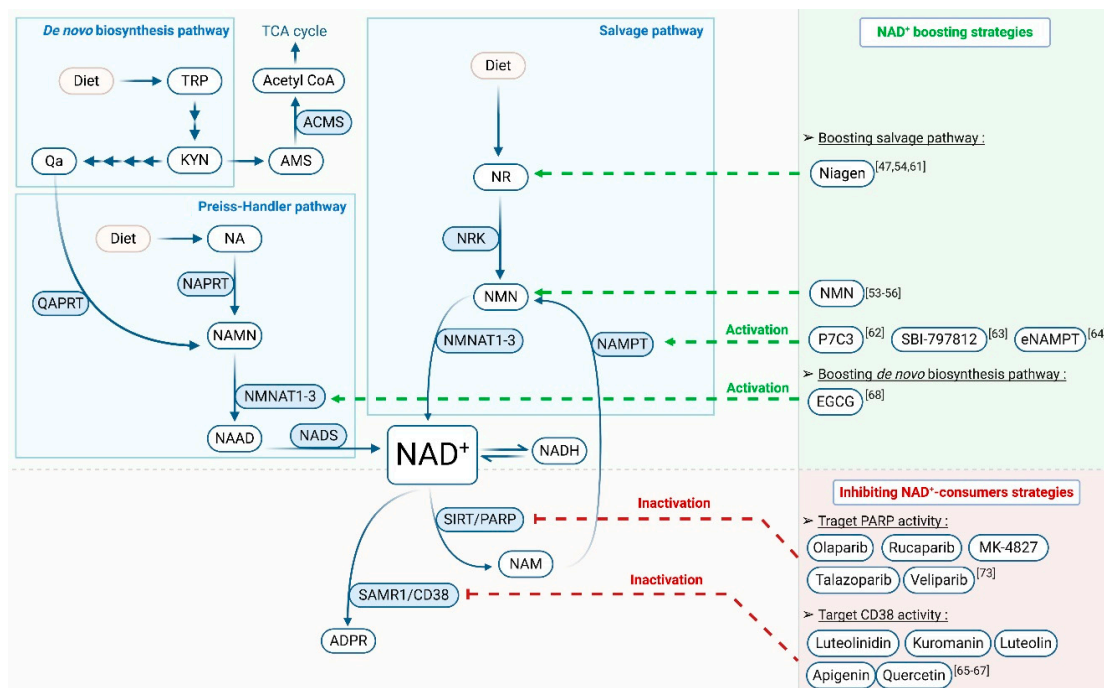


Figure 2. Clinical perspectives targeting altered nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺) metabolism to treat striated muscle laminopathies: strategies allowing a raise in NAD⁺ synthesis or inhibiting its consumption have already proven their effects on NAD⁺ levels. Future studies may confirm the potential of these molecules in the treatment of laminopathies. ADPR: ADP-ribose, ACMS: Aminocarboxymuconic Semialdehyde, AMS: Aminomuconic Semialdehyde, CD38: Cluster of Differentiation 38, EGCG: Epigallocatechin Gallate, eNAMPT: extracellular Nicotinamide phosphoribosyltransferases, KYN: Kynurenine acid, MK-4827: Niraparib, NA: Nicotinic Acid, NAAD: Nicotinic Acid Adenine Dinucleotide, NAD: Nicotinamide Adenine Dinucleotide, NADH: reduced form of NAD, NADS: NAD Synthase, NAM: Nicotinamide, NAMN: Nicotinic Acid Mononucleotide, NAMPT: Nicotinamide Phosphoribosyltransferase, NAPRT: Nicotinic Acid Phosphoribosyltransferase, NMN: Nicotinamide Mononucleotide, NMNAT: Nicotinamide Mononucleotide Adenylyltransferase, NR: Nicotinamide Riboside, NRK: Nicotinamide Riboside Kinase, P7C3: Pool 7 Compound 3, PARP: Poly(ADP-Ribose)Polymerase, QA: Quinolinic Acid, TCA: Tricarboxylic Acid, TRP: Tryptophan, QAPRT: Quinolinic Acid Phosphoribosyltransferases, SAMR1: Sterile Alpha And TIR Motif Containing 1, and SIRT: Sirtuins.

NAD⁺ was recently identified as an important co-substrate for different classes of enzymes, among which is PARPs [33]; 17 PARP enzymes have been discovered, 16 of which bind and cleave NAD⁺ to NAM and ADPR. They catalyse the attachment of one or more ADPR subunits to itself and to multiple acceptor proteins [34]. This reaction is called Poly (ADP-Ribosyl)ation (PARYlation) [35]. PARYlation is known to be attached to glutamate, aspartate, arginine and lysine residues of proteins by PARPs. PARYlation is a reversible reaction, and ADPR units can be removed from acceptor proteins by a series of enzymes such as Poly (ADP-Ribose) glycohydrolase (PARG). The majority of cellular PARP activity is localized to the nucleus. Although PARYlation was identified 50 years ago, surprisingly little is known about the molecular targets and which processes these specifically regulate. The covalent modification of proteins by PARYlation is a biochemical response to deoxyribonucleic acid (DNA) damage induced by oxidation, alkylation and ionizing radiation. PARPs have widespread functions that are vital for cellular homeostasis [36]. The binding of PARP-1 to damaged DNA, including single-strand breaks (SSBs), double-strand breaks (DSBs) and base excision repair (BER), activates PARP-1 enzymatic activity [37,38]. Therefore, PARP-1 can function as a DNA damage sensor. With low levels of DNA damage, PARP-1 acts as a factor involved in DNA damage detection and repair. In contrast, with high

levels of DNA damage, PARP-1 promotes cell death. PARP-1 interacts physically and functionally with various proteins involved in DNA repair pathways and may recruit the repair proteins to sites of DNA damage (e.g., X-ray Repair Cross Complementing 1 (XRCC-1) in BER and DNA-dependent protein kinase in DSB repair). Overall, PARPs contribute not only to DNA repair and cell death but also to carcinogenesis [39], metabolism [40], signalling [41], gene transcription [42] and ageing [43]. Further studies are needed for a better understanding of the role of each PARP isoform and their NAD⁺ consumption quantity.

The most-investigated enzyme that uses NAD⁺ as a co-substrate is Sirt1, a NAD⁺-dependent nuclear deacetylase that removes acetyl groups from lysine residues of a target protein, e.g., the tumour suppressor p53, the myocyte-specific enhancer factor 2 (MEF2), the forkhead box O1 (FoxO1) and peroxisome proliferator-activated receptor gamma co-activator 1-alpha (PGC-1 α), all of which regulate transcriptional programs related to increased mitochondrial function [44]. Sirt1 activity is directly regulated by NAD⁺, raising the hypothesis that NAD⁺ acts as a metabolic sensor. For instance, both NAD⁺ levels and Sirt1 activity increase in mammalian tissues in response to energy/nutrient stresses such as exercise [45,46]. Sirt1 is part of the sirtuin family composed by seven homologs, which all are NAD⁺-dependent enzymes [47]. Ubiquitously expressed, Sirt1, 2 and 6 are located in both the nucleus and cytoplasm; Sirt4 is mitochondrial; Sirt7 is nuclear; and Sirt3 and 5 are found in the mitochondria, nucleus and cytoplasm [48]. Sirtuins have been initially considered as histone deacetylases and are now recognized to have several functions such as deacetylase, demyristoylase, desuccinylase, deglutarylase, demalonylase, lipoamidase, decrotonylase and ADP-ribosyltransferase. Overall, sirtuins are NAD⁺-dependent deacetylases known to regulate key biological processes including chromatin regulation, cell cycle control, DNA repair and mitochondrial function [49].

Other NAD⁺ consumers such as cluster of differentiation 38 (CD38), and sterile α and TIR motif-containing 1 (SARM1) allow ADPR synthesis from NAD⁺ hydrolysis transported into the extracellular compartment [50]. Through their ADP-ribose synthase activity, CD38 and SARM1 are able to convert nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADP) into nicotinic acid-adenine dinucleotide phosphate (NAADP) [51,52]. These cytosolic NAD⁺ metabolites are involved in calcium (Ca²⁺) signalling through regulation of ryanodine receptor (RyR) and transient receptor potential cation channel subfamily M member 2 (TRPM2) essential for contractile functions and several signal transduction events (reviewed by [53]).

5. Effect of NAD⁺ on Health

The initial discovery that NAD⁺ is a master regulator of health [54–56] prompted investigation of NAD⁺ metabolism in disease models (Figure 3).

NAD⁺ signalling is known to protect from fatty liver diseases. Sirt1 is also an important regulator of metabolism, which regulates gluconeogenesis as a result of deacetylation of FoxO1 [57–59]; hence, maintaining NAD⁺ level is critical for liver function. Loss of Sirt1 from the liver accelerates the metabolic disturbances of a high-fat diet [60–62], while Sirt1 overexpression improves many of the metabolic consequences of obesity and diabetes [51,63–65]. Boosting NAD⁺ levels (see part 5) has been effective at preventing and treating obesity and alcoholic steatohepatitis and at improving glucose homeostasis as well as mitochondrial dysfunction. These approaches include the inhibition of NAD⁺ coenzymes such as PARPs [66,67] and CD38 [64]; the activation of nicotinamide N-methyltransferase; [68] and supplementation with NAD⁺ precursors, NR [32] or NMN [65].

Dysfunctional mitochondria are a hallmark of progressive neurodegenerative diseases, including Alzheimer's disease (AD). AD is the most common form of dementia, affecting millions of people worldwide. AD is characterized by progressive cognitive impairment [69,70] resulting from synapse loss and neuronal death that are critical for learning and memory and emotional control. These lead to continuous decline in thinking, behavioural and social skills, altering a person's ability to function independently. One of the identified contributing factors may be NAD⁺ depletion [71]. Since neurons have a high-energy demand, they are very sensitive to NAD⁺ depletion and impairment of ATP

production [72]. A recent study demonstrated that supplementation with NR in a mouse model of AD can target several aspects of AD, setting the stage for future therapeutic perspectives in humans [73]. A deficit in the NAD⁺ pathway has been also linked to amyotrophic lateral sclerosis patients [74]. Wang and colleagues showed that NAMPT plays an essential role in mitochondrial bioenergetics, motor function and survival and identified the NAMPT-mediated NAD⁺ salvage pathway as a potential therapeutic target for degenerative diseases [74]. Along the same line of evidence, a NAMPT enzymatic activity enhancer, P7C3, was reported to prevent neuronal degeneration in amyotrophic lateral sclerosis and Parkinson's disease models [75,76], strongly suggesting that NAMPT may play a key role in neurodegenerative diseases.

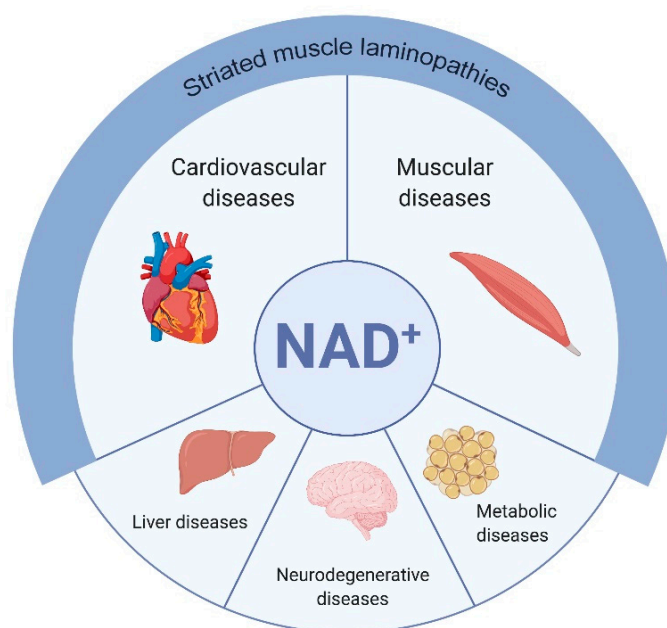


Figure 3. Central role of NAD⁺ in pathological conditions: impaired NAD⁺ levels are involved in the development of pathologies including cardiovascular, muscular, liver, neurodegenerative and metabolic diseases. Given that cardiac and skeletal muscles are the main affected tissues in striated muscle laminopathies, boosting NAD⁺ levels is expected to be an efficient treatment to improve patients health span.

Neurodegeneration in the human retina can lead to Leber congenital amaurosis, a severe form of inherited photoreceptor-neuron degeneration resulting in congenital blindness. Mutations in *NMNAT1* have been recently proposed to be responsible for the disease, by lowering NAD⁺ levels in affected individuals [77]. In addition, NAD⁺ depletion was linked not only in Leber congenital amaurosis but also in a broad spectrum of retinal degenerations, opening up the possibility of using NAD⁺ intermediates as therapeutic agents [78]. Indeed, more recently, oral administration of a NAD⁺ precursor and/or gene therapy using the *Nmnat1* gene has been proven successful to prevent a neurodegenerative disease that causes vision loss [79].

6. “Breaking NAD” in Striated Muscle Laminopathies

At the crossing between mitochondria dysfunction, energetic defect, calcium dysregulation and oxidative stress, NAD⁺ appears as a relevant determinant in striated muscle laminopathies [80,81] (Figure 3).

6.1. NAD⁺ and Cardiomyopathy

The adult mammalian heart requires enormous amounts of energy to sustain contractile function. It has been hypothesized that altered NAD⁺ homeostasis could contribute to the pathogenesis of striated muscle diseases. We recently demonstrated that the NAD⁺ content was significantly decreased in the heart of *Lmna*^{P.H222P/H222P} mice, a model that recapitulates cardiomyopathy associated with *LMNA* mutation, as observed in patients [82,83]. Arimura et al. developed *Lmna* knock-in mice carrying the H222P mutation that was identified in the human *LMNA* gene in a family with typical EDMD. This mutation was also chosen because it putatively dramatically altered the coiled-coil organization of A-type lamins based on in silico analysis. They show that, at adulthood, *Lmna*^{P.H222P/H222P} mice develop muscular dystrophy and dilated cardiomyopathy associated with conduction defects, reminiscent of EDMD in human. This was the first *Lmna* mouse model mimicking human EDMD from gene mutation to clinical features. This alteration is responsible for the decrease in NAMPT expression, which was also observed in the patient’s heart with *LMNA* mutations [84]. NAMPT is known to be responsible for controlling NAD⁺ cellular content [65,85]. Therefore, decreased NAMPT expression is associated with cardiac disease while increased levels appear to be protective, corroborating the work from others [86,87]. Exogenous NAD⁺ supplementation restores intracellular NAD⁺ levels and counteracts hypertrophic cardiac response [87], confirming the key role of NAD⁺ in cardiac function. Recent studies have corroborated that NAD⁺ cell content may be an important determinant for cardiac function [88,89]. Therefore, we expanded the current knowledge by showing that abnormal NAD⁺ salvage causes heart failure and inherited cardiomyopathy associated with rare disease. All of these results using mouse and human models suggest the link between NAD⁺ cardiac content and cardiomyopathy.

6.2. NAD⁺ and Muscular Dystrophy

Skeletal muscle is energetically expensive. Skeletal muscle cells take in glucose and store it as glycogen. When there is a need for more energy within muscle fibres, glycogen is converted to glucose that is used to generate adenosine triphosphate (ATP). As NAD⁺ is required for aerobic cellular metabolism, NAD⁺ localization to mitochondria is important for muscle function. NAD⁺ muscle content alteration and decreased NAMPT expression were observed in the skeletal muscle of *Lmna*^{P.H222P/H222P} mice [90]. Similar observations have been made for Duchenne muscular dystrophy [91]. A decrease in physical performance of *Lmna*^{P.H222P/H222P} mice was demonstrated with a decrease in the mean maximal speed and running distance [90]. These evidences suggest that NAMPT is important for muscle function. A recent study showed that deleting NAMPT in mice leads to a decreased NAD⁺ muscle content and a significant alteration in muscle mass and endurance [92]. This confirms that striated muscle NAD⁺ deficiency contributes directly to a decrease in muscle function, highlighting the role of NAD⁺ in skeletal muscle laminopathies (Figure 4).

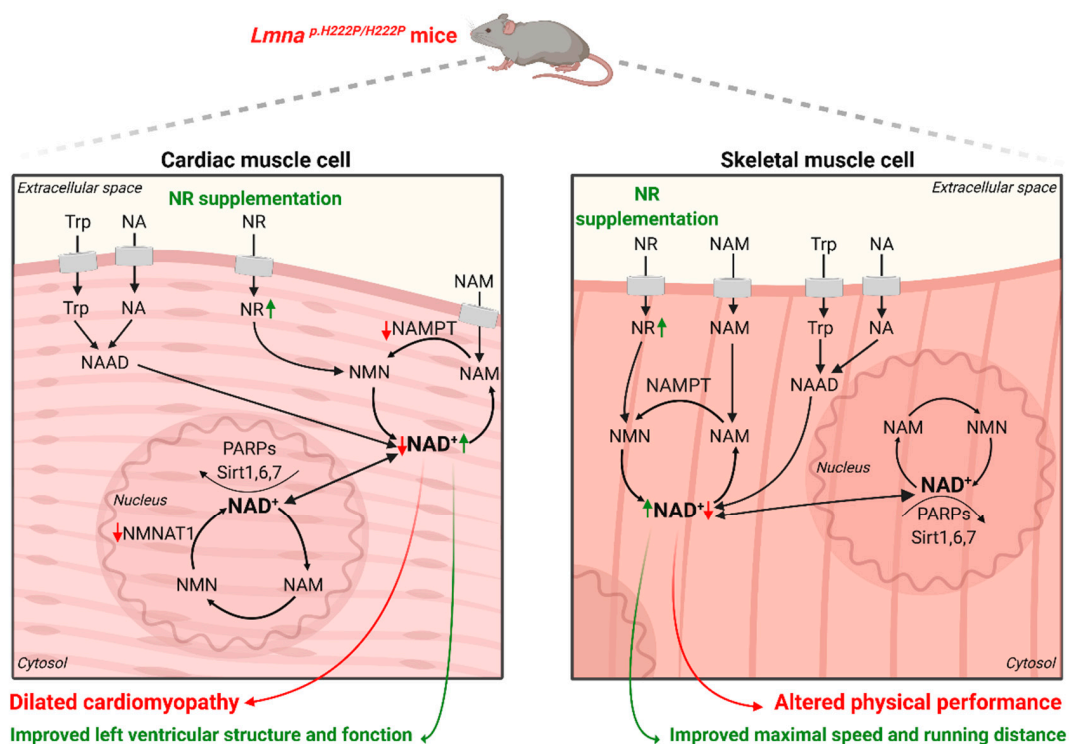


Figure 4. Main reported alterations in the NAD⁺ metabolism in a mouse model of striated muscle laminopathy: in cardiac tissue of *Lmna*^{p.H222P/H222P} mice, an altered NAD⁺ salvage pathway has been observed with decreased NAMPT and NMNAT1 expression. Although many pathways allow maintenance of the NAD⁺ pool, a decrease in intracellular NAD⁺ levels has been described in both heart and skeletal muscle associated with dilated cardiomyopathy as well as altered physical performance. NR supplementation provides a rescue of striated muscles NAD⁺ content leading to a reduction of left ventricular dilatation, improved maximal speed and improved running distance.

7. Clinical Perspectives Targeting NAD⁺ Metabolism

Tissue concentrations of NAD⁺ decline in striated muscles during pathological conditions as described previously [89,90]. In order to compensate this deficit, strategies have been developed either to boost NAD⁺ synthesis or to reduce its consumption and, therefore, to palliate the pathological effects (Figure 2).

7.1. NAD⁺ Synthesis Boosting Strategies

To maintain NAD⁺ cellular content, several NAD⁺ precursors have shown beneficial effects on different pathologies [90,93], affecting either the heart [87,93,94] or the skeletal muscles [91,95]. NR is orally available for both mice and humans, making it the most studied therapeutic strategy [96]. In *Lmna*^{p.H222P/H222P} mice, NR supplementation (Niagen) has been shown to rescue striated muscle NAD⁺ content compared with untreated animals, ensuing an improvement of cardiac function and physical performance [84,90] (Figure 4). Niagen has been recently used in clinical trials for heart failure (ClinicalTrials.gov identifier: NCT03423342). Patients with striated muscle laminopathies could benefit from this therapy if the outcomes are positive. However, treatment of *Lmna*^{p.H222P/H222P} mice with another NAD⁺ precursor, NAM (NAMPT substrate), did not have beneficial effects on the cardiac NAD⁺ content and consequently showed no cardiac function [84]. This is potentially due to an inability to metabolize the intake of NAM by NAMPT and has therefore no beneficial effect on cardiac function [84,90]. In addition, boosting NAD⁺ levels with Niagen administration in a mice model of Duchenne muscular dystrophy improved cardiac and skeletal functions [91]. Recently, a reduced form of NR called

1-((2R,3R,4S,5R)-3,4-Dihydroxy-5-(hydroxymethyl)tetrahydrofuran-2-yl)4H-pyridine-3-carboxamide (NRH) has been identified as a bioavailable NAD⁺ precursor. In mammalian cells treated with NRH, intracellular NAD⁺ levels were significantly superior to cells treated with Niagen [97]. Given that NRH is orally bioavailable and does not degrade in mice plasma, NRH administration could be a potential treatment in order to boost NAD⁺ levels.

As a limiting enzyme of the NAD⁺ salvage pathway, NAMPT has been the preferential target of NAD⁺ boosting strategies. Different studies identified small molecules able to enhance NAMPT expression, such as P7C3, and ultimately NAD⁺ cellular content [98]. More recently, SBI-797812 has been identified as a NAMPT activator, which increased levels of NAD⁺ in the heart of treated mice [99].

Recently, a new target was identified for boosting NAD⁺ synthesis. As mentioned in the previous section, Trp could be degraded for both the TCA cycle and NAD⁺ synthesis. Given the way Trp is regulated by ACMSD activity, this enzyme represents a potential target in order to boost NAD⁺ synthesis. A selective inhibitor of human ACMSD has been discovered and is able to increase intracellular NAD⁺ levels [100]. Moreover, oral administration of ACMSD inhibitors in mice enhances NAD⁺ levels in the liver and kidney, which makes this pharmacological inhibition a potential candidate for clinical trials of striated muscle laminopathies treatment [101].

Increasing the extracellular level of NAMPT (eNAMPT) also appears to boost NAD⁺ synthesis. It has been shown that plasma levels of eNAMPT, which are carried in extracellular vesicles through blood circulation, significantly decline with age in both mice and humans. It has been proposed that supplementation with extracellular vesicle-contained eNAMPT could enhance NAD⁺ synthesis and improve health [102]. This needs to be tested in striated muscle laminopathies. Boosting cardiac NAD⁺ levels can also be achieved by NMN administration [89,93,103]. It has been shown that NMN administration prevents alteration of Sirt1 activity in mice cardiomyocytes, resulting in decreased susceptibility to apoptosis [104]. Metabolic diseases were also prevented by NMN supplementation [65]. These studies collectively indicate that NMN administration seems to be a promising treatment for cardiomyopathies. NMNATs are also interesting targets for raising NAD⁺ because of their contribution of both de novo and salvage pathways [22,105]. The compound has been reported to activate NMNATs, suggesting another potential way to increase NAD⁺ biosynthesis [106].

7.2. Inhibiting NAD⁺-Consumers Strategies

In addition to NAD⁺ boosting strategies, studies have shown that inhibiting NAD⁺ consumers allows increased NAD⁺ levels, resulting in protected tissue function. For instance, increased NAD⁺ levels in major organs including the liver, brain, muscle and heart were observed in CD38 knockout mice [107,108]. Experiments on these mice demonstrated that inhibiting CD38 protects hearts against ischemia and reperfusion. Moreover, glutathione levels were preserved, recovery of the left ventricular contractile function was increased and decreased myocyte enzyme release as well as infarct size were shown [109]. Therefore, inhibiting CD38 could be used as a valid strategy to restore NAD⁺ level. One strategy could consist in the use of flavonoids able to inhibit CD38 such as, luteolinidin, kuromanin luteolin, apigenin [110,111] and quercetin [112].

Although PARPs have vital functions for cellular homeostasis including DNA damage detection and repair, their overactivation can lead to NAD⁺ deficiency, resulting in cell death. Moreover, PARPs are major NAD⁺ consumers, which is why PARP inhibitors have also been developed. Some of them are used for cancers treatment such as olaparib, rucaparib, MK-4827 talazoparib and veliparib (reviewed by [113]). However, the link between these inhibitors and the NAD⁺ level has not been well studied. It has been shown that the microRNA overexpression, miR-149, in C2C12 myotubes inhibits PARP-2, leading to increased cellular NAD⁺ levels and SIRT-1 activity and leading to increased mitochondrial function and biogenesis [114]. Additional evidence implies that inhibition of PARP-2 can be cardioprotective. It has been shown that PARP-2 knockdown with siRNA protects neonatal rat cardiomyocytes from hypertrophy induced by angiotensin II via SIRT1 activation [115]. This could also lead to potential avenues for therapeutic strategies.

According to reviewed studies above, NAD⁺-consumer inhibitors are expected to be beneficial for striated muscle laminopathies as they are thought to improve cardiac or/and skeletal muscle (Figure 3).

8. Conclusions

Autosomal EDMD is caused by mutations in *LMNA* encoding nuclear A-type lamins. Although early initiation of treatments may delay progression and prolong the pretransplantation phase of the disease, more definitive therapies for EDMD await better mechanistic understanding of the molecular basis for this disease to develop specific treatments. To explain how mutations in proteins of the nuclear envelope can cause EDMD, it has been proposed that nuclear envelope abnormalities cause cellular fragility and a decrease in the mechanical resistance to stress. However, the mechanism through which mutated lamins cause striated muscle dysfunction remains obscure. NAD⁺ has emerged as a critical regulator of metabolism impacting human health through different NAD⁺ dependent signalling pathways. Studies have highlighted the role of NAD⁺ depletion in striated muscle laminopathies. This correlation would clearly identify the role of NAD⁺ on striated muscle laminopathies in order to develop therapeutic strategies. Different molecules have already proven their ability to increase NAD⁺ levels either by boosting its synthesis or by decreasing its degradation (Figure 2). In the future, elevation of NAD⁺ may offer viable therapeutic strategies to treat striated muscle laminopathies that remain uncured.

Author Contributions: Conceptualization, D.C. and A.M.; resources, D.C. and A.M.; writing—original draft preparation, D.C.; writing—review and editing, A.M.; illustration, D.C. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Acknowledgments: Figures were created with BioRender.com.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Lin, F.; Worman, H.J. Structural organization of the human gene encoding nuclear lamin A and nuclear lamin C. *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 16321–16326.
2. Worman, H.J.; Lazaridis, I.; Georgatos, S.D. Nuclear lamina heterogeneity in mammalian cells. Differential expression of the major lamins and variations in lamin B phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*, 12135–12141.
3. Kang, S.M.; Yoon, M.H.; Park, B.J. Laminopathies; Mutations on single gene and various human genetic diseases. *BMB Rep.* **2018**, *51*, 327–337. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Bonne, G.; Di Barletta, M.R.; Varnous, S.; Bécane, H.-M.; Hammouda, E.-H.; Merlini, L.; Muntoni, F.; Greenberg, C.R.; Gary, F.; Urtizberea, J.-A.; et al. Mutations in the gene encoding lamin A/C cause autosomal dominant Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Nat. Genet.* **1999**, *21*, 285–288. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Brull, A.; Rodriguez, B.M.; Bonne, G.; Muchir, A.; Bertrand, A.T. The Pathogenesis and Therapies of Striated Muscle Laminopathies. *Front. Physiol.* **2018**, *9*, 1533. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Worman, H.J.; Bonne, G. “Laminopathies”: A wide spectrum of human diseases. *Exp. Cell Res.* **2007**, *313*, 2121–2133. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Cao, H. Nuclear lamin A/C R482Q mutation in Canadian kindreds with Dunnigan-type familial partial lipodystrophy. *Hum. Mol. Genet.* **2000**, *9*, 109–112. [[CrossRef](#)]
8. Dhe-Paganon, S.; Werner, E.D.; Chi, Y.-I.; Shoelson, S.E. Structure of the Globular Tail of Nuclear Lamin. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 17381–17384. [[CrossRef](#)]
9. Krimm, I.; Östlund, C.; Gilquin, B.; Couprie, J.; Hossenlopp, P.; Mornon, J.-P.; Bonne, G.; Courvalin, J.-C.; Worman, H.J.; Zinn-Justin, S. The Ig-like Structure of the C-Terminal Domain of Lamin A/C, Mutated in Muscular Dystrophies, Cardiomyopathy, and Partial Lipodystrophy. *Structure* **2002**, *10*, 811–823. [[CrossRef](#)]
10. 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. Recurrent de novo point mutations in lamin A cause Hutchinson–Gilford progeria syndrome. *Nat. Cell Biol.* **2003**, *423*, 293–298. [[CrossRef](#)]

11. De Sandre-Giovannoli, A.; Bernard, R.; Cau, P.; Navarro, C.; Amiel, J.; Boccaccio, I.; Lyonnet, S.; Stewart, C.L.; Munnich, A.; Le Merrer, M.; et al. Lamin A Truncation in Hutchinson-Gilford Progeria. *Science* **2003**, *300*, 2055. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Strandgren, C.; Revêchon, G.; Carvajal, A.S.; Eriksson, M. Emerging candidate treatment strategies for Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Biochem. Soc. Trans.* **2017**, *45*, 1279–1293. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Nissan, X.; Blondel, S.; Navarro, C.L.; Maury, Y.; Denis, C.; Girard, M.; Martinat, C.; De Sandre-Giovannoli, A.; Levy, N.; Peschanski, M. Unique Preservation of Neural Cells in Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome Is Due to the Expression of the Neural-Specific miR-9 MicroRNA. *Cell Rep.* **2012**, *2*, 666–673. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Dreifuss, F.E.; Hogan, G.R. Survival in X-chromosomal muscular dystrophy. *Neurology* **1961**, *11*, 734. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Di Barletta, M.R.; Ricci, E.; Galluzzi, G.; Tonali, P.; Mora, M.; Morandi, L.; Romorini, A.; Voit, T.; Orstavik, K.H.; Merlini, L.; et al. Different Mutations in the LMNA Gene Cause Autosomal Dominant and Autosomal Recessive Emery-Dreifuss Muscular Dystrophy. *Am. J. Hum. Genet.* **2000**, *66*, 1407–1412. [[CrossRef](#)]
16. Van Der Kooi, A.J.; Van Meegen, M.; Ledderhof, T.M.; McNally, E.M.; De Visser, M.A.; Bolhuis, P. Genetic localization of a newly recognized autosomal dominant limb-girdle muscular dystrophy with cardiac involvement (LGMD1B) to chromosome 1q11-21. *Am. J. Hum. Genet.* **1997**, *60*, 891–895.
17. Muchir, A.; Bonne, G.; van der Kooi, A.J.; van Meegen, M.; Baas, F.; Bolhuis, P.A.; de Visser, M.; Schwartz, K. 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.* **2000**, *9*, 1453–1459. [[CrossRef](#)]
18. Quijano-Roy, S.; Mbieleu, B.; Bönnemann, C.G.; Jeannet, P.-Y.; Colomer, J.; Clarke, N.F.; Cuisset, J.-M.; Roper, H.; De Meirleir, L.; D'Amico, A.; et al. De novo LMNA mutations cause a new form of congenital muscular dystrophy. *Ann. Neurol.* **2008**, *64*, 177–186. [[CrossRef](#)]
19. Fatkin, D.; Macrae, C.; Sasaki, T.; Wolff, M.R.; Porcu, M.; Frenneaux, M.; Atherton, J.; Vidaillet, H.J.; Spudich, S.; De Girolami, U.; et al. 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.* **1999**, *341*, 1715–1724. [[CrossRef](#)]
20. Maggi, L.; Carboni, N.; Bernasconi, P. Skeletal Muscle Laminopathies: A Review of Clinical and Molecular Features. *Cells* **2016**, *5*, 33. [[CrossRef](#)]
21. Berger, F.; Ramírez-Hernández, M.H.; Ziegler, M. The new life of a centenarian: Signalling functions of NAD(P). *Trends Biochem. Sci.* **2004**, *29*, 111–118. [[CrossRef](#)]
22. Rajman, L.; Chwalek, K.; Sinclair, D.A. Therapeutic Potential of NAD-Boosting Molecules: The In Vivo Evidence. *Cell Metab.* **2018**, *27*, 529–547. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Houtkooper, R.H.; Cantó, C.; Wanders, R.J.; Auwerx, J. The Secret Life of NAD⁺: An Old Metabolite Controlling New Metabolic Signaling Pathways. *Endocr. Rev.* **2010**, *31*, 194–223. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Palzer, L.; Bader, J.J.; Angel, F.; Witzel, M.; Blaser, S.; McNeil, A.; Wandersee, M.K.; Leu, N.A.; Lengner, C.J.; Cho, C.E.; et al. Alpha-Amino-Beta-Carboxy-Muconate-Semialdehyde Decarboxylase Controls Dietary Niacin Requirements for NAD⁺ Synthesis. *Cell Rep.* **2018**, *25*, 1359–1370.e4. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Yaku, K.; Okabe, K.; Nakagawa, T. NAD metabolism: Implications in aging and longevity. *Ageing Res. Rev.* **2018**, *47*, 1–17. [[CrossRef](#)]
26. Elvehjem, C.A.; Madden, R.J.; Strong, F.M.; Woolley, D.W. Relation of nicotinic acid and nicotinic acid amide to canine black tongue. *J. Am. Chem. Soc.* **1937**, *59*, 1767–1768. [[CrossRef](#)]
27. Revollo, J.R.; Grimm, A.A.; Imai, S.-I. The NAD Biosynthesis Pathway Mediated by Nicotinamide Phosphoribosyltransferase Regulates Sir2 Activity in Mammalian Cells. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 50754–50763. [[CrossRef](#)]
28. Magni, G.; Amici, A.; Emanuelli, M.; Raffaelli, N.; Ruggieri, S. Enzymology of NAD⁺ Synthesis. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* **2006**, *73*, 135–182. [[CrossRef](#)]
29. Bogan, K.L.; Brenner, C. Nicotinic Acid, Nicotinamide, and Nicotinamide Riboside: A Molecular Evaluation of NAD⁺ Precursor Vitamins in Human Nutrition. *Annu. Rev. Nutr.* **2008**, *28*, 115–130. [[CrossRef](#)]
30. Ummarino, S.; Mozzon, M.; Zamporlini, F.; Amici, A.; Mazzola, F.; Orsomando, G.; Ruggieri, S.; Raffaelli, N. Simultaneous quantitation of nicotinamide riboside, nicotinamide mononucleotide and nicotinamide adenine dinucleotide in milk by a novel enzyme-coupled assay. *Food Chem.* **2017**, *221*, 161–168. [[CrossRef](#)]

31. Ratajczak, J.; Joffraud, M.; Trammell, S.A.J.; Ras, R.; Canela, N.; Boutant, M.; Kulkarni, S.S.; Rodrigues, M.; Redpath, P.; Migaud, M.E.; et al. NRK1 controls nicotinamide mononucleotide and nicotinamide riboside metabolism in mammalian cells. *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 13103. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Cantó, C.; Houtkooper, R.H.; Pirinen, E.; Youn, D.Y.; Oosterveer, M.H.; Cen, Y.; Fernandez-Marcos, P.J.; Yamamoto, H.; Andreux, P.A.; Cettour-Rose, P.; et al. The NAD⁺ Precursor Nicotinamide Riboside Enhances Oxidative Metabolism and Protects against High-Fat Diet-Induced Obesity. *Cell Metab.* **2012**, *15*, 838–847. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Cantó, C.; Auwerx, J. Targeting Sirtuin 1 to Improve Metabolism: All You Need Is NAD⁺? *Pharmacol. Rev.* **2011**, *64*, 166–187. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Cohen, M.S. Interplay between compartmentalized NAD⁺ synthesis and consumption: A focus on the PARP family. *Genes Dev.* **2020**, *34*, 254–262. [[CrossRef](#)]
35. Chambon, P.; Weill, J.; Mandel, P. Nicotinamide mononucleotide activation of a new DNA-dependent polyadenylic acid synthesizing nuclear enzyme. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1963**, *11*, 39–43. [[CrossRef](#)]
36. Hottiger, M.O.; Paul, O.H.; Lüscher, B.; Schüler, H.; Koch-Nolte, F. Toward a unified nomenclature for mammalian ADP-ribosyltransferases. *Trends Biochem. Sci.* **2010**, *35*, 208–219. [[CrossRef](#)]
37. D'Amours, D.; Desnoyers, S.; D'Silva, I.; Poirier, G.G. Poly(ADP-ribose)ylation reactions in the regulation of nuclear functions. *Biochem. J.* **1999**, *342*, 249–268. [[CrossRef](#)]
38. El-Khamisy, S.F.; Masutani, M.; Suzuki, H.; Caldecott, K.W. A requirement for PARP-1 for the assembly or stability of XRCC1 nuclear foci at sites of oxidative DNA damage. *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31*, 5526–5533. [[CrossRef](#)]
39. Bryant, H.E.; Schultz, N.; Thomas, H.D.; Parker, K.M.; Flower, D.; Lopez, E.; Kyle, S.; Meuth, M.; Curtin, N.J.; Helleday, T. Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase. *Nat. Cell Biol.* **2005**, *434*, 913–917. [[CrossRef](#)]
40. Szántó, M.; Bai, P. The role of ADP-ribose metabolism in metabolic regulation, adipose tissue differentiation, and metabolism. *Genes Dev.* **2020**, *34*, 321–340. [[CrossRef](#)]
41. Gupte, R.; Liu, Z.; Kraus, W.L. PARPs and ADP-Ribosylation: Recent Advances Linking Molecular Functions to Biological Outcomes. 2017. Available online: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5322727/> (accessed on 10 September 2020).
42. Jubin, T.; Kadam, A.; Gani, A.R.; Singh, M.; Dwivedi, M.; Begum, R. Poly ADP-ribose polymerase-1: Beyond transcription and towards differentiation. *Semin. Cell Dev. Biol.* **2017**, *63*, 167–179. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Vida, A.; Abdul-Rahman, O.; Mikó, E.; Brunyánszki, A.; Bai, P. Poly(ADP-ribose) polymerases in aging—friend or foe?. *Curr. Protein Pept. Sci.* **2016**, *17*, 705–712. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Andreux, P.A.; Houtkooper, R.H.; Auwerx, J. Pharmacological approaches to restore mitochondrial function. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2013**, *12*, 465–483. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Cantó, C.; Auwerx, J. PGC-1 α , SIRT1 and AMPK, an energy sensing network that controls energy expenditure. *Curr. Opin. Lipidol.* **2009**, *20*, 98–105. [[CrossRef](#)]
46. Cantó, C.; Jiang, L.Q.; Deshmukh, A.S.; Matak, C.; Coste, A.; Lagouge, M.; Zierath, J.R.; Auwerx, J. Interdependence of AMPK and SIRT1 for Metabolic Adaptation to Fasting and Exercise in Skeletal Muscle. *Cell Metab.* **2010**, *11*, 213–219. [[CrossRef](#)]
47. Dali-Youcef, N.; Lagouge, M.; Froelich, S.; Koehl, C.; Schoonjans, K.; Auwerx, J. Sirtuins: The ‘magnificent seven’, function, metabolism and longevity. *Ann. Med.* **2007**, *39*, 335–345. [[CrossRef](#)]
48. Zhao, L.; Cao, J.; Hu, K.; He, X.; Yun, D.; Tong, T.; Han, L. Sirtuins and their Biological Relevance in Aging and Age-Related Diseases. *Aging Dis.* **2020**, *11*, 927–945. [[CrossRef](#)]
49. Zheng, W. Review: The plant sirtuins. *Plant Sci.* **2020**, *293*, 110434. [[CrossRef](#)]
50. Song, E.-K.; Rah, S.-Y.; Lee, Y.-R.; Yoo, C.-H.; Kim, Y.-R.; Yeom, J.-H.; Park, K.-H.; Kim, J.-S.; Kim, U.-H.; Han, M.-K. Connexin-43 Hemichannels Mediate Cyclic ADP-ribose Generation and Its Ca²⁺-mobilizing Activity by NAD⁺/Cyclic ADP-ribose Transport. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 44480–44490. [[CrossRef](#)]
51. Summers, D.W.; Gibson, D.A.; DiAntonio, A.; Milbrandt, J. SARM1-specific motifs in the TIR domain enable NAD⁺ loss and regulate injury-induced SARM1 activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2016**, *113*, E6271–E6280. [[CrossRef](#)]
52. Guse, A.H. Biochemistry, biology, and pharmacology of cyclic adenosine diphosphoribose (cADPR). *Curr. Med. Chem.* **2004**, *11*, 847–855. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

53. Fliegert, R.; Gasser, A.; Guse, A.H. Regulation of calcium signalling by adenine-based second messengers. *Biochem. Soc. Trans.* **2007**, *35*, 109–114. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Anderson, R.M.; Bitterman, K.J.; Wood, J.G.; Medvedik, O.; Cohen, H.; Lin, S.S.; Manchester, J.K.; Gordon, J.I.; Sinclair, D.A. Manipulation of a Nuclear NAD⁺ Salvage Pathway Delays Aging without Altering Steady-state NAD⁺ Levels. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 18881–18890. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Anderson, R.M.; Bitterman, K.J.; Wood, J.G.; Medvedik, O.; Sinclair, D.A. Nicotinamide and PNC1 govern lifespan extension by calorie restriction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nat. Cell Biol.* **2003**, *423*, 181–185. [[CrossRef](#)]
56. Balan, V.; Miller, G.S.; Kaplun, L.; Balan, K.; Chong, Z.-Z.; Li, F.; Kaplun, A.; VanBerkum, M.F.A.; Arking, R.; Freeman, D.C.; et al. Life Span Extension and Neuronal Cell Protection by *Drosophila* Nicotinamidase. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 27810–27819. [[CrossRef](#)]
57. Rodgers, J.T.; Lerin, C.; Haas, W.; Gygi, S.P.; Spiegelman, B.M.; Puigserver, P. Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1 α and Sirt1. *Cell Biol.* **2005**, *434*, 113–118. [[CrossRef](#)]
58. Nemoto, S.; Fergusson, M.M.; Finkel, T. SIRT1 Functionally Interacts with the Metabolic Regulator and Transcriptional Coactivator PGC-1 α . *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 16456–16460. [[CrossRef](#)]
59. Nemoto, S.; Fergusson, M.M.; Finkel, T. Nutrient Availability Regulates SIRT1 Through a Forkhead-Dependent Pathway. *Sci.* **2004**, *306*, 2105–2108. [[CrossRef](#)]
60. Xu, F.; Gao, Z.; Zhang, J.; Rivera, C.A.; Yin, J.; Weng, J.; Ye, J. Lack of SIRT1 (Mammalian Sirtuin 1) Activity Leads to Liver Steatosis in the SIRT1^{+/-} Mice: A Role of Lipid Mobilization and Inflammation. *Endocrinology* **2010**, *151*, 2504–2514. [[CrossRef](#)]
61. Purushotham, A.; Schug, T.T.; Xu, Q.; Surapureddi, S.; Guo, X.; Li, X. Hepatocyte-Specific Deletion of SIRT1 Alters Fatty Acid Metabolism and Results in Hepatic Steatosis and Inflammation. *Cell Metab.* **2009**, *9*, 327–338. [[CrossRef](#)]
62. Wang, R.-H.; Kim, H.-S.; Xiao, C.; Xu, X.; Gavrilova, O.; Deng, C.-X. Hepatic Sirt1 deficiency in mice impairs mTORC2/Akt signaling and results in hyperglycemia, oxidative damage, and insulin resistance. *J. Clin. Investig.* **2011**, *121*, 4477–4490. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Banks, A.S.; Kon, N.; Knight, C.; Matsumoto, M.; Gutierrez-Juarez, R.; Rossetti, L.; Gu, W.; Accili, D. Sirt1 Gain of Function Increases Energy Efficiency and Prevents Diabetes in Mice. *Cell Metab.* **2008**, *8*, 333–341. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Pfluger, P.T.; Herranz, D.; Velasco-Miguel, S.; Serrano, M.; Tschöp, M.H. Sirt1 protects against high-fat diet-induced metabolic damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 9793–9798. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Yoshino, J.; Mills, K.F.; Yoon, M.J.; Imai, S. Nicotinamide Mononucleotide, a Key NAD⁺ Intermediate, Treats the Pathophysiology of Diet- and Age-Induced Diabetes in Mice. *Cell Metab.* **2011**, *14*, 528–536. [[CrossRef](#)]
66. Bai, P.; Cantó, C.; Oudart, H.; Brunyánszki, A.; Cen, Y.; Thomas, C.; Yamamoto, H.; Huber, A.; Kiss, B.; Houtkooper, R.H.; et al. PARP-1 Inhibition Increases Mitochondrial Metabolism through SIRT1 Activation. *Cell Metab.* **2011**, *13*, 461–468. [[CrossRef](#)]
67. Gariani, K.; Ryu, D.; Menzies, K.J.; Yi, H.; Stein, S.; Zhang, H.; Perino, A.; Lemos, V.; Katsyuba, E.; Jha, P.; et al. Inhibiting poly ADP-ribosylation increases fatty acid oxidation and protects against fatty liver disease. *J. Hepatol.* **2017**, *66*, 132–141. [[CrossRef](#)]
68. Hong, S.; Moreno-Navarrete, J.M.; Wei, X.; Kikukawa, Y.; Tzamelis, I.; Prasad, D.; Lee, Y.; Asara, J.M.; Fernández-Real, J.M.; Maratos-Flier, E.; et al. Nicotinamide N-methyltransferase regulates hepatic nutrient metabolism through Sirt1 protein stabilization. *Nat. Med.* **2015**, *21*, 887–894. [[CrossRef](#)]
69. Hardy, J.; Selkoe, D.J. The amyloid hypothesis of Alzheimer’s disease: Progress and problems on the road to therapeutics. *Science* **2002**, *297*, 353–356. [[CrossRef](#)]
70. Selkoe, D.J. Deciphering the genesis and fate of amyloid β -protein yields novel therapies for Alzheimer disease. *J. Clin. Investig.* **2002**, *110*, 1375–1381. [[CrossRef](#)]
71. Verdin, E. NAD⁺ in aging, metabolism, and neurodegeneration. *Science* **2015**, *350*, 1208–1213. [[CrossRef](#)]
72. Kerr, J.S.; Adriaanse, B.A.; Greig, N.H.; Mattson, M.P.; Cader, M.Z.; Bohr, V.A.; Fang, E.F. Mitophagy and Alzheimer’s Disease: Cellular and Molecular Mechanisms. *Trends Neurosci.* **2017**, *40*, 151–166. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

73. Hou, Y.; Lautrup, S.H.; Cordonnier, S.; Wang, Y.; Croteau, D.L.; Zavala, E.; Zhang, Y.; Moritoh, K.; O'Connell, J.F.; Baptiste, B.A.; et al. NAD⁺ supplementation normalizes key Alzheimer's features and DNA damage responses in a new AD mouse model with introduced DNA repair deficiency. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2018**, *115*, E1876–E1885. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Wang, X.; Zhang, Q.; Bao, R.; Zhang, N.; Wang, Y.; Polo-Parada, L.; Tarim, A.; Alemifar, A.; Han, X.; Wilkins, H.M.; et al. Deletion of Nampt in Projection Neurons of Adult Mice Leads to Motor Dysfunction, Neurodegeneration, and Death. *Cell Rep.* **2017**, *20*, 2184–2200. [[CrossRef](#)]
75. De Jesús-Cortés, H.; Xu, P.; Drawbridge, J.; Estill, S.J.; Huntington, P.; Tran, S.; Britt, J.; Tesla, R.; Morlock, L.; Naidoo, J.; et al. Neuroprotective efficacy of aminopropyl carbazoles in a mouse model of Parkinson disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, 17010–17015. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. Tesla, R.; Wolf, H.P.; Xu, P.; Drawbridge, J.; Estill, S.J.; Huntington, P.; McDaniel, L.; Knobbe, W.; Burket, A.; Tran, S.; et al. Neuroprotective efficacy of aminopropyl carbazoles in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, 17016–17021. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
77. Koenekoop, R.K.; Finding of Rare Disease Genes (FORGE) Canada Consortium; Wang, H.; Majewski, J.; Wang, X.; Lopez, I.; Ren, H.; Chen, Y.; Li, Y.; Fishman, G.A.; et al. Mutations in NMNAT1 cause Leber congenital amaurosis and identify a new disease pathway for retinal degeneration. *Nat. Genet.* **2012**, *44*, 1035–1039. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
78. Lin, J.B.; Kubota, S.; Ban, N.; Yoshida, M.; Santeford, A.; Séne, A.; Nakamura, R.; Zapata, N.; Kubota, M.; Tsubota, K.; et al. NAMPT-Mediated NAD(+) Biosynthesis Is Essential for Vision In Mice. *Cell Rep.* **2016**, *17*, 69–85. [[CrossRef](#)]
79. Williams, P.A.; Harder, J.M.; Foxworth, N.E.; Cochran, K.E.; Philip, V.M.; Porciatti, V.; Smithies, O.; John, S.W.M. Vitamin B3 modulates mitochondrial vulnerability and prevents glaucoma in aged mice. *Science* **2017**, *355*, 756–760. [[CrossRef](#)]
80. Garrido, A.; Djouder, N. NAD⁺ Deficits in Age-Related Diseases and Cancer. *Trends Cancer* **2017**, *3*, 593–610. [[CrossRef](#)]
81. Strømland, Ø.; Niere, M.; Nikiforov, A.; Vanlinden, M.R.; Heiland, I.; Ziegler, M. Keeping the balance in NAD metabolism. *Biochem. Soc. Trans.* **2019**, *47*, 119–130. [[CrossRef](#)]
82. Vignier, N.; Mougnot, N.; Bonne, G.; Muchir, A. Effect of genetic background on the cardiac phenotype in a mouse model of Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Biochem. Biophys. Rep.* **2019**, *19*, 100664. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
83. Arimura, T.; Helbling-Leclerc, A.; Massart, C.; Varnous, S.; Niel, F.; Lacène, E.; Fromes, Y.; Toussaint, M.; Mura, A.-M.I.; Keller, D.; et al. Mouse model carrying H222P- Lmna mutation develops muscular dystrophy and dilated cardiomyopathy similar to human striated muscle laminopathies. *Hum. Mol. Genet.* **2004**, *14*, 155–169. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
84. Vignier, N.; Chatzifrangkeskou, M.; Rodriguez, B.M.; Mericksay, M.; Mougnot, N.; Wahbi, K.; Bonne, G.; Muchir, A. Rescue of biosynthesis of nicotinamide adenine dinucleotide protects the heart in cardiomyopathy caused by lamin A/C gene mutation. *Hum. Mol. Genet.* **2018**, *27*, 3870–3880. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
85. Mouchiroud, L.; Houtkooper, R.H.; Moullan, N.; Katsyuba, E.; Ryu, D.; Cantó, C.; Mottis, A.; Jo, Y.-S.; Viswanathan, M.; Schoonjans, K.; et al. The NAD⁺/Sirtuin Pathway Modulates Longevity through Activation of Mitochondrial UPR and FOXO Signaling. *Cell* **2013**, *154*, 430–441. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
86. Karamanlidis, G.; Lee, C.F.; Garcia-Menendez, L.; Kolwicz, S.C.; Suthamarak, W.; Gong, G.; Sedensky, M.M.; Morgan, P.G.; Wang, W.; Tian, R. Mitochondrial Complex I Deficiency Increases Protein Acetylation and Accelerates Heart Failure. *Cell Metab.* **2013**, *18*, 239–250. [[CrossRef](#)]
87. Pillai, V.B.; Sundaresan, N.R.; Kim, G.H.; Gupta, M.; Rajamohan, S.B.; Pillai, J.B.; Samant, S.; Ravindra, P.; Isbatan, A.; Gupta, M.P. Exogenous NAD Blocks Cardiac Hypertrophic Response via Activation of the SIRT3-LKB1-AMP-activated Kinase Pathway. *J. Biol. Chem.* **2009**, *285*, 3133–3144. [[CrossRef](#)]
88. Diguët, N.; Trammell, S.A.J.; Tannous, C.; Deloux, R.; Piquereau, J.; Mougnot, N.; Gouge, A.; Gressette, M.; Manoury, B.; Blanc, J.; et al. Nicotinamide riboside preserves cardiac function in a mouse model of dilated cardiomyopathy. *Circulation* **2017**, *137*, 2256–2273. [[CrossRef](#)]
89. Lee, C.F.; Chavez, J.D.; Garcia-Menendez, L.; Choi, Y.S.; Roe, N.D.; Chiao, Y.A.; Edgar, J.S.; Goo, Y.A.; Goodlett, D.R.; Bruce, J.E.; et al. Normalization of NAD⁺ Redox Balance as a Therapy for Heart Failure. *Circulation* **2016**, *134*, 883–894. [[CrossRef](#)]

90. Thomasson, R.; Vignier, N.; Peccate, C.; Mougenot, N.; Noirez, P.; Muchir, A. Alteration of performance in a mouse model of Emery–Dreifuss muscular dystrophy caused by A-type lamins gene mutation. *Hum. Mol. Genet.* **2019**, *28*, 2237–2244. [[CrossRef](#)]
91. Ryu, D.; Zhang, H.; Ropelle, E.R.; Sorrentino, V.; Mázala, D.A.G.; Mouchiroud, L.; Marshall, P.L.; Campbell, M.D.; Ali, A.S.; Knowels, G.M.; et al. NAD⁺ repletion improves muscle function in muscular dystrophy and counters global PARylation. *Sci. Transl. Med.* **2016**, *8*, 361ra139. [[CrossRef](#)]
92. Frederick, D.W.; Loro, E.; Liu, L.; Davila, A.; Chellappa, K.; Silverman, I.M.; Quinn, W.J.; Gosai, S.J.; Tichy, E.D.; Davis, J.G.; et al. Loss of NAD Homeostasis Leads to Progressive and Reversible Degeneration of Skeletal Muscle. *Cell Metab.* **2016**, *24*, 269–282. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
93. Yamamoto, T.; Byun, J.; Zhai, P.; Ikeda, Y.; Oka, S.; Sadoshima, J. Nicotinamide Mononucleotide, an Intermediate of NAD⁺ Synthesis, Protects the Heart from Ischemia and Reperfusion. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e98972. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
94. Xu, W.; Barrientos, T.; Mao, L.; Rockman, H.A.; Sauve, A.A.; Andrews, N.C. Lethal Cardiomyopathy in Mice Lacking Transferrin Receptor in the Heart. *Cell Rep.* **2015**, *13*, 533–545. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
95. Khan, A.N.; Auranen, M.; Paetau, I.; Pirinen, E.; Euro, L.; Forsström, S.; Pasila, L.; Velagapudi, V.; Carroll, C.J.; Auwerx, J.; et al. Effective treatment of mitochondrial myopathy by nicotinamide riboside, a vitamin B. *EMBO Mol. Med.* **2014**, *6*, 721–731. [[CrossRef](#)]
96. Trammell, S.A.J.; Schmidt, M.S.; Weidemann, B.J.; Redpath, P.; Jaksch, F.; Dellinger, R.W.; Li, Z.; Abel, E.D.; Migaud, M.E.; Brenner, C. Nicotinamide riboside is uniquely and orally bioavailable in mice and humans. *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 12948. [[CrossRef](#)]
97. Giroud-Gerbetant, J.; Joffraud, M.; Giner, M.P.; Cercillieux, A.; Bartova, S.; Makarov, M.V.; Zapata-Pérez, R.; Sánchez-García, J.L.; Houtkooper, R.H.; Migaud, M.E.; et al. A reduced form of nicotinamide riboside defines a new path for NAD⁺ biosynthesis and acts as an orally bioavailable NAD⁺ precursor. *Mol. Metab.* **2019**, *30*, 192–202. [[CrossRef](#)]
98. Wang, G.; Han, T.; Nijhawan, D.; Theodoropoulos, P.; Naidoo, J.; Yadavalli, S.; Mirzaei, H.; Pieper, A.A.; Ready, J.M.; McKnight, S.L. P7C3 Neuroprotective Chemicals Function by Activating the Rate-Limiting Enzyme in NAD Salvage. *Cell* **2014**, *158*, 1324–1334. [[CrossRef](#)]
99. Gardell, S.J.; Hopf, M.; Khan, A.; Dispagna, M.; Sessions, E.H.; Falter, R.; Kapoor, N.; Brooks, J.; Culver, J.; Petucci, C.; et al. Boosting NAD⁺ with a small molecule that activates NAMPT. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 3241. [[CrossRef](#)]
100. Pellicciari, R.; Liscio, P.; Giacchè, N.; De Franco, F.; Carotti, A.; Robertson, J.; Cialabrini, L.; Katsyuba, E.; Raffaelli, N.; Auwerx, J. α -Amino- β -carboxymuconate- ϵ -semialdehyde Decarboxylase (ACMSD) Inhibitors as Novel Modulators of De Novo Nicotinamide Adenine Dinucleotide (NAD⁺) Biosynthesis. *J. Med. Chem.* **2018**, *61*, 745–759. [[CrossRef](#)]
101. Katsyuba, E.; Mottis, A.; Zietak, M.; De Franco, F.; Van Der Velpen, V.; Gariani, K.; Ryu, D.; Cialabrini, L.; Matilainen, O.; Liscio, P.; et al. De novo NAD⁺ synthesis enhances mitochondrial function and improves health. *Nat. Cell Biol.* **2018**, *563*, 354–359. [[CrossRef](#)]
102. Yoshida, M.; Satoh, A.; Lin, J.B.; Mills, K.F.; Sasaki, Y.; Rensing, N.; Wong, M.; Apte, R.S.; Imai, S.-I. Extracellular Vesicle-Contained eNAMPT Delays Aging and Extends Lifespan in Mice. *Cell Metab.* **2019**, *30*, 329–342.e5. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
103. Zhang, R.; Shen, Y.; Zhou, L.; Sangwung, P.; Fujioka, H.; Zhang, L.; Liao, X. Short-term administration of Nicotinamide Mononucleotide preserves cardiac mitochondrial homeostasis and prevents heart failure. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **2017**, *112*, 64–73. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
104. Yano, M.; Akazawa, H.; Oka, T.; Yabumoto, C.; Kudo-Sakamoto, Y.; Kamo, T.; Shimizu, Y.; Yagi, H.; Naito, A.T.; Lee, J.-K.; et al. Monocyte-derived extracellular Nampt-dependent biosynthesis of NAD⁺ protects the heart against pressure overload. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 15857. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
105. Zhou, T.; Kurnasov, O.; Tomchick, D.R.; Binns, D.D.; Grishin, N.V.; Marquez, V.E.; Osterman, A.L.; Zhang, H. Structure of Human Nicotinamide/Nicotinic Acid Mononucleotide Adenylyltransferase. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 13148–13154. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
106. Berger, F.; Lau, C.; Dahlmann, M.; Ziegler, M. Subcellular Compartmentation and Differential Catalytic Properties of the Three Human Nicotinamide Mononucleotide Adenylyltransferase Isoforms. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 36334–36341. [[CrossRef](#)]

107. Bu, X.; Kato, J.A.; Hong, J.; Merino, M.J.; Schrupp, D.S.E.; Lund, F.; Moss, J. CD38 knockout suppresses tumorigenesis in mice and clonogenic growth of human lung cancer cells. *Carcinogenesis* **2017**, *39*, 242–251. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
108. Aksoy, P.; White, T.A.; Thompson, M.; Chini, E.N. Regulation of intracellular levels of NAD: A novel role for Cdbiochem. *Biophys. Res. Commun.* **2006**, *345*, 1386–1392. [[CrossRef](#)]
109. Boslett, J.; Helal, M.; Chini, E.; Zweier, J.L. Genetic deletion of CD38 confers post-ischemic myocardial protection through preserved pyridine nucleotides. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **2018**, *118*, 81–94. [[CrossRef](#)]
110. Kellenberger, E.; Kuhn, I.; Schuber, F.; Muller-Steffner, H. Flavonoids as inhibitors of human Cdbioorganic. *Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 3939–3942. [[CrossRef](#)]
111. Escande, C.; Nin, V.; Price, N.L.; Capellini, V.; Gomes, A.P.; Barbosa, M.T.; O’Neil, L.; White, T.A.; Sinclair, D.A.; Chini, E.N. Flavonoid Apigenin Is an Inhibitor of the NAD⁺ase CD: Implications for cellular NAD⁺ metabolism, protein acetylation, and treatment of metabolic syndrome. *Diabetes* **2013**, *62*, 1084–1093. [[CrossRef](#)]
112. Dower, I.J.; Geleijnse, J.M.; Gijsbers, L.; Zock, P.L.; Kromhout, D.; Hollman, P.C.H. Effects of the pure flavonoids epicatechin and quercetin on vascular function and cardiometabolic health: A randomized, double-blind, placebo-controlled, crossover trial. *Am. J. Clin. Nutr.* **2015**, *101*, 914–921. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
113. Slade, D. PARP and PARG inhibitors in cancer treatment. *Genes Dev.* **2020**, *34*, 360–394. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
114. Mohamed, J.S.; Hajira, A.; Pardo, P.S.; Boriek, A.M. MicroRNA-149 Inhibits PARP-2 and Promotes Mitochondrial Biogenesis via SIRT-1/PGC-1 α Network in Skeletal Muscle. *Diabetes* **2014**, *63*, 1546–1559. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
115. Geng, B.; Cai, Y.; Gao, S.; Lu, J.; Zhang, L.; Zou, J.; Liu, M.; Yu, S.; Ye, J.; Liu, P. PARP-2 knockdown protects cardiomyocytes from hypertrophy via activation of SIRT1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2013**, *430*, 944–950. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

5.2. Article n°4 (REVUE)

Hutchinson-Gilford progeria syndrome: Rejuvenating old drugs to fight accelerated ageing

Solenn M. Guilbert, **Déborah Cardoso**, Nicolas Lévy, Antoine Muchir, Xavier Nissan

Parue le 7 avril 2020 dans le journal Methods

Facteur d'impact de Methods (2018) : 3.7



Contents lists available at ScienceDirect

Methods

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ymeth

Hutchinson-Gilford progeria syndrome: Rejuvenating old drugs to fight accelerated ageing

Solemn M. Guilbert^a, Déborah Cardoso^b, Nicolas Lévy^c, Antoine Muchir^b, Xavier Nissan^{a,*}

^a CECS, I-STEM AFM, Institute for Stem Cell Therapy and Exploration of Monogenic Diseases, 28 rue Henri Desbrières, 91100 Corbeil-Essonnes, France

^b Sorbonne Université, UPMC Paris 06, INSERM UMRS974, Center of Research in Myology, Institut de Myologie, F-75013 Paris, France

^c Aix-Marseille Université, UMRS910: Génétique médicale et Génomique fonctionnelle, Faculté de médecine Timone, Marseille, France

ARTICLE INFO

Keywords:

Progeria
Aging
Pluripotent stem cells
Drug repurposing
High-throughput screening

ABSTRACT

What if the next generation of successful treatments was hidden in the current pharmacopoeia? Identifying new indications for existing drugs, also called the drug repurposing or drug rediscovery process, is a highly efficient and low-cost strategy. First reported almost a century ago, drug repurposing has emerged as a valuable therapeutic option for diseases that do not have specific treatments and rare diseases, in particular. This review focuses on Hutchinson-Gilford progeria syndrome (HGPS), a rare genetic disorder that induces accelerated and precocious aging, for which drug repurposing has led to the discovery of several potential treatments over the past decade.

1. Hutchinson-Gilford progeria syndrome

1.1. A premature aging disease

With a prevalence of 1 in 20 million births, Hutchinson-Gilford progeria syndrome (HGPS) is an extremely rare and consistently fatal genetic disorder characterized by accelerated aging. Clinical symptoms usually appear in the first 18 months after birth, and include growth retardation, facial dysmorphic changes (long narrow nose, prominent outer ears, wrinkled skin), alopecia, loss of subcutaneous fat, bone and joint abnormalities and cardiovascular pathology. Death occurs at a median age of 14.6 years, mainly due to atherosclerosis, cardiovascular failure and stroke [1,2] (Fig. 1).

The genetic origin of HGPS was identified in 2003 by two independent research groups led by Nicolas Lévy and Francis S. Collins, respectively [3,4]. This autosomal dominant disease is caused by a *de novo* mutation in the LMNA gene which encodes A-type lamins, inner nuclear membrane proteins represented mainly by lamins A and C. A-type lamins play crucial roles in nuclear structure and shape, as well as

in chromatin organization, nuclear pore and cytoskeleton organization [5], and mutations in LMNA were reported to cause various genetic disorders known as laminopathies. They include a wide spectrum of diseases, with or without overlapping symptoms, such as lipodystrophies, Emery-Dreifuss muscular dystrophy, Charcot-Marie-Tooth disease, dilated cardiomyopathies and progeroid syndromes, including HGPS [6].

Over the past decade, several groups have explored the molecular causes of HGPS, ultimately leading to the identification of the first therapeutic strategies. In physiological conditions, lamin A is produced from its prelamin A precursor, which undergoes complex post-translational modifications (Fig. 2). A cysteine in the C-terminal of prelamin A is first farnesylated, cleaved and finally carboxymethylated by the metalloprotease STE24 (ZMPSTE24) and isoprenylcysteine carboxyltransferase (ICTM). The farnesyl group is then removed through cleavage of the 15C-terminal amino acids, leading to the production of the mature lamin A. The most common mutation in HGPS (c.1824C>T), although apparently silent (LMNA p.G608G), activates an alternative splice site, leading to the deletion of 150 nucleotides at the end of exon

Abbreviations: HGPS, Hutchinson-Gilford progeria syndrome; ZMPSTE24, metalloprotease STE24; ICTM, isoprenylcysteine carboxyltransferase; hES, human embryonic stem cells; IPS, induced-pluripotent stem cells; MSC, mesenchymal stem cell; VSMC, vascular smooth muscle cell; miRNA, micro ribonucleic acid; DNA, Deoxyribonucleic acid; mRNA, messenger ribonucleic acid; FTI, farnesyl-transferase inhibitor; NPY, Neuropeptide Y; HMGCR, 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase; SRFS1, splicing factor serine/arginine-rich splicing factor 1; ROS, reactive oxygen species; SIRT1, NAD⁺-dependent sirtuin 1; HSP, heat shock protein; NAC, N-acetyl cysteine drug; HTS, high throughput screening; AON, antisense oligonucleotide; Mono-AP, mono-aminopyrimidine; FPPS, farnesyl pyrophosphate synthase; FT, farnesyl-transferase.

* Corresponding author.

E-mail address: xnissan@istem.fr (X. Nissan).

<https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2020.04.005>

Received 15 November 2019; Received in revised form 6 April 2020; Accepted 7 April 2020

Available online 9 April 2020

1046-2023/© 2020 The Authors.

Published by Elsevier Inc.

This is an open access article under the CC BY-NC-ND license

(<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Please cite this article as: Solemn M. Guilbert, *Methods*, <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2020.04.005>

11, which encode the endoprotease cleavage site. As a result, a prelamin A variant lacking 50 aa residues is produced in a permanently farnesylated form, and the resultant protein, called progerin, exerts toxic effects in HGPS cells [7,8].

1.2. Phenotypic characteristics of HGPS

Due to the structural role of lamins in the nucleus, accumulation of progerin is accompanied by dramatic changes in nuclear structure and function (Fig. 1). In contrast to the mature lamin A, progerin remains anchored to the inner nuclear membrane, leading to shape abnormalities with the appearance of “blebs”, disorganization of the heterochromatin (e.g. tri-methylation on lysine 47 of histone (H3K27)) [7–9], as well as abnormal chromosome segregation and telomere degradation [10–12]. Among the cellular phenotypes reported in HGPS, premature senescence as a result of genomic instability [10,13,14] and accumulation of DNA double-strand breaks, notably through the decrease in recruitment of major DNA repair factors [7,15–17], have been widely described. Cells expressing progerin also exhibit mitochondrial defects [18], increased oxidative stress [19–21], decreased stress tolerance [9], stem cell exhaustion [22], alteration of proteolysis [23–25] and inflammation [26,27]. Since these phenotypes are commonly observed in physiological ageing [28], HGPS is considered a genetically induced model of accelerated ageing. First evidence came from the observation that progerin was expressed at low levels in physiologically aged-cells [29–32], but its possible role in tissue dysfunction during physiological aging has not been demonstrated and its role or its contribution toward tissue dysfunction remains unanswered.

1.3. In vitro models to study HGPS

For almost a decade, the main biological material available for the *in vitro* study of HGPS were fibroblasts isolated from skin biopsies or generated following progerin overexpression [7,29,33,34]. Even though skin fibroblasts were useful to assess pathological phenotypes, their limited proliferation capacities and lack of clinical relevance have delayed the identification of the tissue-specific mechanism of action and specific treatments. The discovery of human embryonic stem cells (hES) and, more recently, the possibility of reprogramming somatic cells into

pluripotent stem cells (iPS) [35], have opened up the possibility of studying some of the phenotypes associated with diseases “*in a dish*”. Pluripotent stem cells have the unique properties of being able to self-renew and to differentiate into any cell type, allowing the production of an “unlimited” quantity of cells for disease modeling and drug screening [36]. In 2011, the groups led by J.C Belmonte and A. Colman pioneered the derivation of the first HGPS iPS cell lines [15,37]. Interestingly, in agreement with previous studies conducted with human embryonic stem cells [38], these two groups reported that neither lamin A nor progerin were expressed in undifferentiated HGPS iPS cells, making it possible to expand and differentiate these cells with no bias relating to the disease. Through a mechanism that remains unknown, these two groups have also reported that lamin A and progerin were re-expressed upon differentiation into different cell types, inducing pathological features such as nuclear abnormalities, reduced telomere length and premature senescence [15,37]. In addition to these findings, Zhang et al. also demonstrated that progerin was mainly expressed in mesenchymal stem cells (MSC) and vascular smooth muscle cells (VSMC), two cell types of particular relevance for the disease, but was absent in neuronal cells [37]. In 2012, our group discovered the origin of this specificity, identifying that miR-9, a miRNA predominantly expressed in neural cells, was capable to target the 3' UTR of progerin and decrease its expression in neurons [39]. Later, several other studies have subsequently elucidated some pathological mechanisms occurring in progerin-expressing cells in different cell types using iPS cells [15,17,27,37,40,41]. For example, Zhang et al. proposed in 2014 that the loss of proliferation in VSMCs could be attributed to a decrease in PARP-1 expression through an increase in chromosomal aberrations [17] and Xiong et al. demonstrated in 2013 a role of progerin in the deregulation of PPAR γ 2 and C/EBP α expression, two factors implicated in the differentiation in adipocytes [41].

1.4. In vivo models of HGPS

Several animal models have been developed to elucidate the pathological mechanisms of HGPS and to evaluate potential therapeutic strategies. The first living HGPS model was developed in 2002 through the depletion of *ZMPSTE24* (FACE-1), which encodes the enzyme responsible for the cleavage of the prelamin A farnesylated residue.

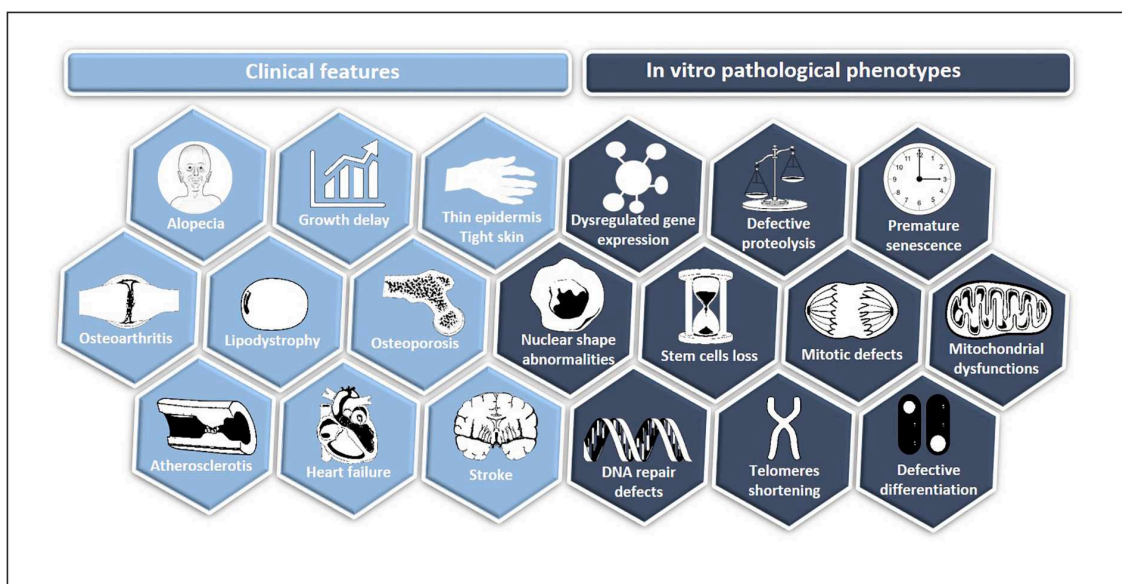


Fig. 1. Hallmarks of HGPS. In light blue, the principal clinical features of HGPS are recapitulated whereas in dark blue, the major *in vitro* pathological phenotypes are represented.

Zmpste24^{-/-} mice display several progeroid features, such as growth retardation, alopecia, cardiomyopathy, lipodystrophy, muscular dystrophy and premature death [42,43]. This model was used as the gold standard for HGPS and related disorders for almost a decade, demonstrating that the accumulation of the farnesylated protein induces nuclear abnormalities in vascular and osteogenic tissues, as well as p53 hyperactivation, defective DNA repair, cellular senescence and stem cell dysfunction [14,16,44]. Since this model expresses the full-length version of farnesylated prelamin A, 2nd generation models were based on the knock-in of a mutant allele of *LMNA* using selective or ubiquitous promoters, leading to the specific expression of progerin with or without lamin A and C [45,46]. More recently, Osorio et al. generated a knock-in mouse strain carrying the HGPS mutation in *LMNA*. This mouse model produces progerin through aberrant splicing of its endogenous *LMNA* mRNA and recapitulates the main features of HGPS disease at both molecular and clinical levels, including reduced lifespan, as well as vascular calcification, and cardiovascular and bone defects [47,48]. Even though mouse models are essential and widely used to depict molecular mechanisms of the disease and to test different therapeutic strategies, some key differences remain between these models and humans. To bridge the gap between mice and humans, and thanks to new gene editing methodologies, the group led by Vicente Andrés has recently reported the generation of a minipig model of HGPS carrying, by knock-in, the heterozygous *LMNA* c1824C > T mutation. This model has the advantage of having a cardiovascular system with strong similarities to that in humans and is therefore particularly relevant to HGPS [49].

2. Repurposing of old drugs for HGPS

2.1. Why we should consider repositioning drugs for ultra-rare diseases

HGPS is one of the rare or orphan diseases, defined as disorders affecting less than 5/100,000 people in Europe or fewer than 200,000 Americans at any point in time (around 650 in 1 million people). Mostly genetic in origin, more than 7,000 disorders were classified as rare, with no available treatment for most of them. In this context, “drug repurposing” represents a valuable strategy for bridging the gap between the need for treatment for patients with HGPS and the limited profits expected by pharmaceutical companies from developing new chemical entities. Drug repurposing – also called repositioning – consists of identifying new indications for existing or abandoned pharmacological drugs. This strategy takes advantage of previous data collected for a

compound during clinical trials, notably on its bioavailability and safety, thus reducing the risks linked to the development of an entirely new product, which consequently accelerates access to the market. While these strategies present clear advantages, some challenges remain. The principle of repurposing depends not only on knowledge of the nature of the drugs, but also on knowledge on the disease, with the latter condition that is not always fulfilled in rare diseases.

2.2. Different strategies for pharmacological repositioning

The principle of drug repurposing is not novel. First successes were historically due to serendipity, as described with sildenafil, that was initially indicated as an anti-hypertensive drug before its successful use in erectile dysfunction, or with thalidomide, initially developed for insomnia or morning sickness treatment and then repurposed for multiple myeloma, other forms of cancer or leprosy [50]. One of the most striking example of successful repurposing based on drugs’ side effects observations was recently described when french physicians located in Bordeaux observed the unexpected effect of Propranolol on the hemangioma present in the patient’s face [51] whereas it was initially used to treat his heart condition. Ever since, other approaches have led to the development of more systematic strategies of drug repurposing, which can be classified into two groups: experimental and computational approaches. Experimental approaches mainly comprise two kinds of assays, binding assays to identify target interactions (not described here) or assays to rescue a phenotype.

In computational approaches, knowledge about the drug and diseases, and the analysis of data from a variety of origins, form the basis for the discovery of potential new drug-disease associations [52]. First, a “target-centric approach” could be envisaged in repurposing a drug, by focusing on the biological role that a specific component plays in disease. This requires the identification of potential genes implicated in the pathological phenotypes and searching in the pharmacopeia for existing drugs known to target them. Another relevant strategy is “pathway or network mapping”, which consists of targeting a pathway upstream or downstream from the causative gene, but with strong relevance for the disease. The identification of such pathways could arise from the study of *in vitro* or *in vivo* models, with the development of “omics” data and transcriptomic analysis, in particular, being of great interest to the discovery of new deregulated genes. Transcriptomic data generated to identify misregulated pathways in the context of disease or drug treatment might also be useful for another approach called “signature mapping”. Other methods exist and rely mostly on similarities between drugs

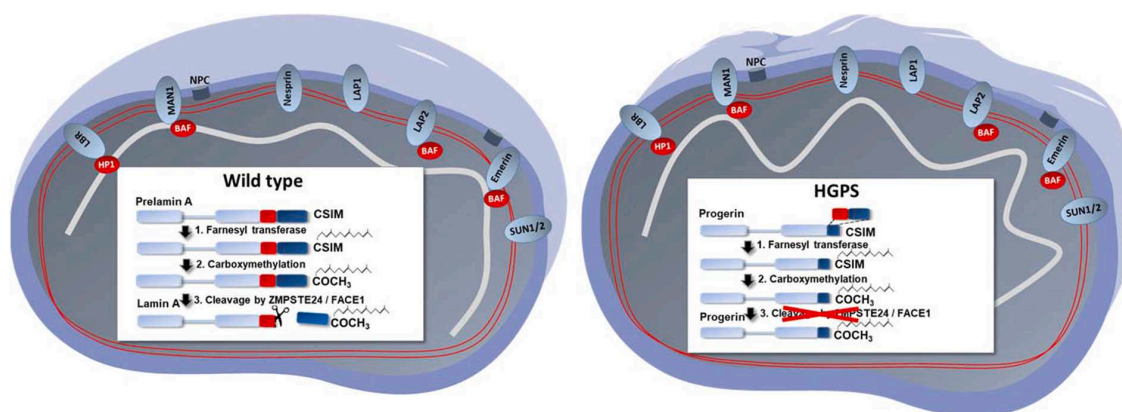


Fig. 2. Defective processing of prelamin A in HGPS and associated nuclear shape disorganization. Lamin A protein is obtained after several post-translational modifications, including the addition of a farnesyl group at the C-terminal and further cleavage by ZMPSTE24 endonuclease. The mutation on the *LMNA* gene that causes HGPS is responsible for the activation of an alternative splicing site that results in the deletion of 50 amino acids from a lamin A protein, including the cleavage site for ZMPSTE24. Consequently, the resulting mutant protein, called progerin, remains permanently farnesylated and thus induces nuclear shape abnormalities and disorganization.

to identify new possible indications. For example, a comparable chemical structure in different drugs suggests a shared biological activity and therefore the possibility to be repurposed. The search for similarities in side effects has also been reported as a possible approach to drug repurposing, based on the hypothesis that similar side effects result from shared target or protein pathways and could thus lead to the discovery of new drug indications. These various strategies are not exhaustive, but reflect the major *in silico* methods that are currently being used in repurposing. Because several of these strategies have been successfully applied to HGPS, we will discuss the main findings of these reports below.

2.3. Repurposing old drugs in HGPS: From the first “success” with farnesylation inhibitors to promising compounds targeting progerin

Farnesylation, and more generally prenylation, is a common cellular mechanism that concerns a large number of proteins, including small GTPases, proteins implicated in the regulation of important cellular events like proliferation or cell motility. Targeting of the farnesylation process, which is required for the malignant activities of the RAS oncogenic family, has led to the development of farnesyl-transferase inhibitors (FTIs) as anti-cancer drugs [53]. Since 2000, several clinical trials using FTIs (lonafarnib, tipifarnib, BMS-214662 and L-778123) have evaluated their toxicity and efficacy in various cancer indications and revealed acceptable tolerance in humans [54–56]. Based on this knowledge, several FTIs were tested *in vitro* for HGPS, where an improvement in the nuclear shape was demonstrated [57–60], and also *in vivo*, revealing an improvement in the symptoms of the disease, in addition to a decrease in nuclear blebbing, [46,61–63] and an extension to lifespan [62] (Figs. 3 and 4).

In 2008, a similar pharmacological approach targeting the entire prenylation pathway was employed in repurposing for HGPS using the combination of zoledronate, a member of the amino-bisphosphonates class mainly used to treat osteoporosis [64], and pravastatin, that belongs to a class of inhibitors of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase (HMGCR) used to reduce cholesterol levels and prevent cardiovascular disease [65]. Treatment of the *Zmpste24^{-/-}* mouse model with this combination led to an improvement in several hallmarks of HGPS, including lifespan [66].

These pioneering preclinical studies have successfully led to the design of several clinical trials, highlighting the efficiency of the repurposing of these drugs. The first ever clinical trial was launched in 2007 (ClinicalTrials.gov, NCT00425607) using the FTI lonafarnib on a cohort of 25 patients for a minimum period of 2 years, showing encouraging results with an improvement in weight gain, vascular stiffness and bone density [67]. In 2008, following the identification of the zoledronate and pravastatin effect, a second clinical trial was initiated using these two drugs in 12 patients (ClinicalTrials.gov, NCT00731016) followed by a tri-therapy clinical trial combining lonafarnib, zoledronate and pravastatin in 37 patients (ClinicalTrials.gov, NCT00879034). Results of this last clinical trial was reported describing no additional improvement of the tri-therapy as compared to lonafarnib alone [68]. More recently, in late 2015, another phase I/II clinical trial combining the existing drugs lonafarnib and everolimus (ClinicalTrials.gov, NCT02579044) was started in 60 patients, for which results are expected in October 2020 (<https://www.progeriaresearch.org/clinical-trials/>). Everolimus is an analog of the antibiotic macrolide drug rapamycin, an mTOR inhibitor, already used against cancer or for immunosuppression and implicated in the regulation of several cellular functions such as cell proliferation, protein synthesis, transcription, cytoskeleton rearrangement and autophagy [69]. Previous studies had suggested that rapamycin improved lifespan, notably in aged mice, through activation of autophagy, a process that is down-regulated during ageing [70–74]. This led to the hypothesis that autophagy induction could decrease the accumulation of the toxic progerin through a complementary mechanism to lonafarnib and improve cell phenotypes in

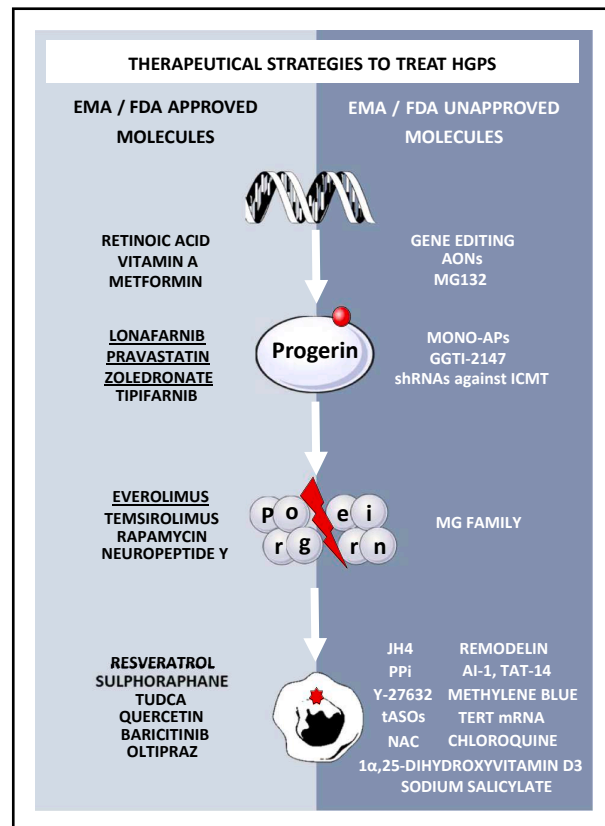


Fig. 3. Therapeutic strategies in HGPS. Several therapeutic strategies to treat HGPS has been proposed targeting either the production of the mutant protein progerin, its degradation or its pathological consequences. Here are represented all the therapeutic strategies, FDA or EMA approved or not, that have been investigated for the treatment of HGPS. The underlined compounds have been clinically tested.

progeria. Indeed, in HGPS fibroblasts treated with rapamycin or with temsirolimus, a decrease was observed in progerin through autophagy activation, accompanied by an improvement in abnormal nuclear shape, a decrease in senescence [75] and a reduction in DNA damage [76]. More recently, Neuropeptide Y (NPY), a neuronal peptide evaluated in Humans to treat feeding difficulties, acute stress disorders or post-traumatic stress disorders, was also shown to decrease progerin expression and alleviate several *in vitro* hallmarks of HGPS through autophagy induction [77]. In parallel to the evaluation of autophagy activators, several other studies have investigated the possibility to induce progerin clearance by modulating other degradation processes. To date, the most advanced and promising strategy to target this process is the use of proteasome inhibition. First evidence was described in 2017 by the group led by Nicolas Lévy, showing that MG132 treatment could lead to progerin clearance by an indirect induction of autophagy [78]. Finally, modulating alternative splicing regulation was also described to be a valuable strategy to target progerin content. Successfully applied to HGPS, the main target of these studies is the splicing factor serine/arginine-rich splicing factor 1 (SRSF1), previously shown to enhance the aberrant splicing of lamin A pre-mRNA involved in the production of progerin [79]. The first results were reported in 2016, when our group demonstrated that treatment with metformin, an antidiabetic drug with a good safety profile, could lead to a decrease in SRSF1 and progerin in both iPSC cell-derived MSCs and HGPS fibroblasts. In this study, we also reported that metformin treatment was associated with a reduction in several defects, such as a decrease in nuclear shape abnormalities, in

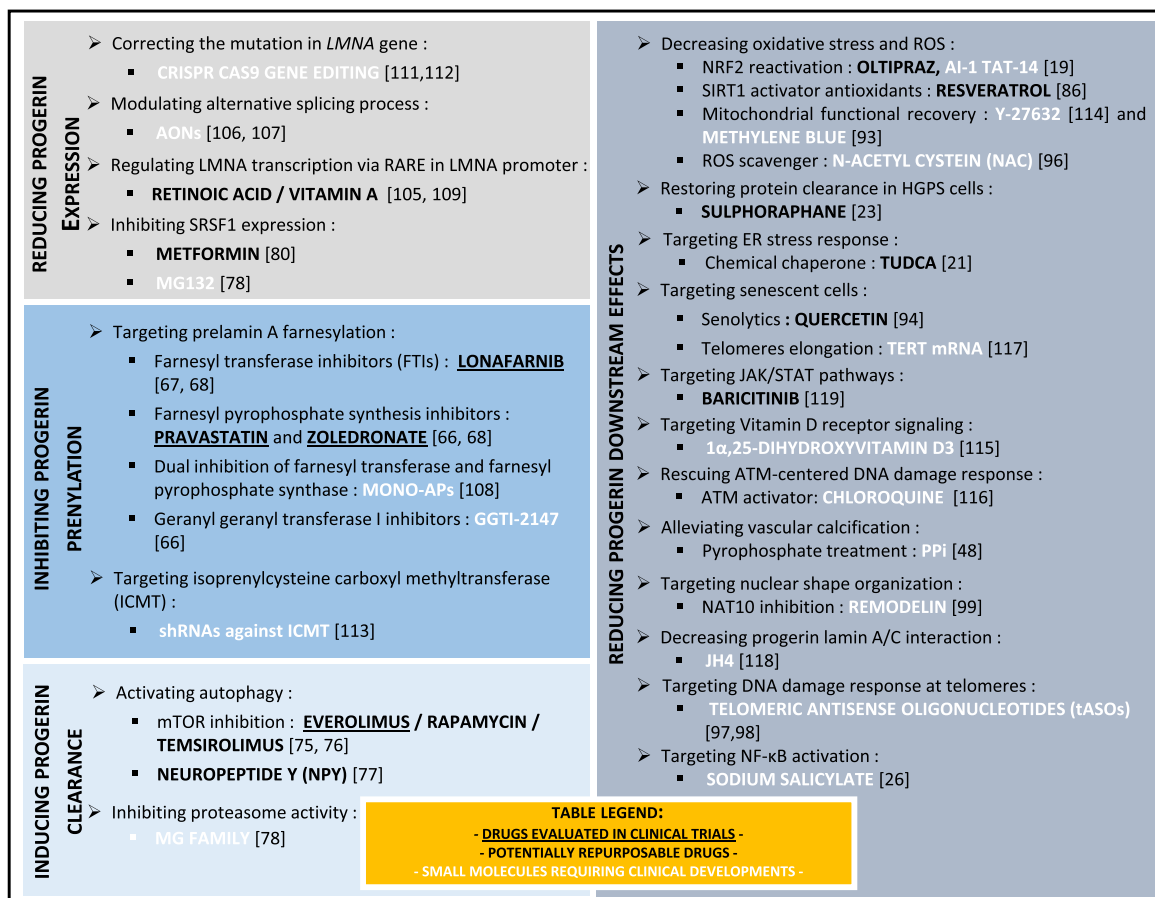


Fig. 4. Recapitulation of the therapeutic compounds described in HGPS. This scheme recapitulates the therapeutic approaches for the treatment of HGPS depending on their target. Non-repurposable strategies are represented in white, whereas repurposable drugs are highlighted in bold or underlined for the one used in clinical trials for HGPS. Progerin expression was decreased directly at gene level through gene therapy (CRISPR Cas 9 and AON) or through small molecules like retinoids and metformin. Strategies targeting progerin at a protein level or its prenylation have also been evaluated, among them small molecules that have reached the clinic, such as FTIs like lonafarnib, and rapamycin analogs like everolimus. Finally, targeting the downstream effects of progerin has been described as a valuable strategy for HGPS, with some repurposable drugs that have proven effective in correcting the disease-associated phenotypes in cellular and/or animal models. (See above-mentioned references for further information.)

premature osteoblastic differentiation and in DNA damage [80]. Interestingly, MG-132 was also reported to induce the downregulation of *SRSF1*, suggesting a second additive level of regulation of progerin expression [78].

2.4. Rescue of progerin-downstream pathological phenotypes

Among repurposing strategies, targeting the phenotypic consequences of progerin expression is another possibility that could indirectly reduce the burden caused by the aberrant protein in HGPS cells. The recent development of a mouse model for HGPS and of more relevant cellular models, such as based on iPS-derived cells, has allowed the identification of such pathological phenotypes and pathways and thus led to the identification of other possible drugs for repurposing (Figs. 3, 4).

First evidences came from the identification of the beneficial effect of resveratrol in HGPS, an anti-ageing polyphenol compound reported to have antioxidant properties [81–83]. Resveratrol is an activator of the NAD^+ -dependent sirtuin 1 (*SIRT1*), a histone deacetylase protein with implied involvement in several cell processes, such as antioxidant and stress responses, mitochondrial biogenesis and metabolism [84] that was initially tested for the treatment of cancer, diabetes, obesity,

neurological or cardiovascular disorders [85]. Using the *Zmpste24*^{-/-} mouse model treated with resveratrol, Liu et al demonstrated a decrease in the abnormal lamin A-*SIRT1* association observed in HGPS, which was thus accompanied by a restoration of HGPS defects, including a decrease in stem cell loss and an extension to lifespan [86]. Whereas the clinical use of resveratrol is currently limited because of its poor bioavailability, a micronized form with a good safety profile was developed (SRT501) [87] opening new perspectives for HGPS.

In 2015, another example was reported by Gabriel et al [23]. With the goal of restoring proteolytic machinery activity in HGPS cells [24,25] and consequently inducing progerin degradation, authors has evaluated the effect of sulforaphane, an antioxidant molecule found in cruciferous vegetables clinically used for its capability to improve symptoms of chronic inflammatory diseases and for the treatment of cancer [88]. Sulforaphane’s mechanism of action was reported to be mediated by an improvement in proteostasis, including an increase in heat shock protein (HSP) and components of the proteasome and autophagy machineries [89,90], and through the targeting of *Keap1/Nrf2* pathways [91]. As described in this study, treatment of HGPS cells with this compound was accompanied by an increase in proteolytic activity, a reduction in progerin, a decrease in DNA damage, and an increase in cell proliferation, suggesting its possible use as a therapy for HGPS [23,92].

Attempts to target the reactive oxygen species (ROS) accumulation were also made with several compounds, such as methylene blue [93], that improve mitochondrial dysfunction, and oltipraz, an antiparasitic drug that targets the antioxidant Nrf2 pathways and was also evaluated for its effect against cancer cells [19]. Interestingly, in relation to this second compound, both sulforaphane and resveratrol, mentioned above, also depend at least partially on Nrf2 for their beneficial antioxidant effects, suggesting a common mechanism of action.

Senolytics represents a promising anti-ageing therapeutic strategy that targets senescent cells. Recently, a study performed in the context of Werner syndrome, another premature ageing disease, identified the benefits of quercetin, a polyphenol derived from plants and known for its anti-inflammatory and antioxidant properties. Authors of this study reported that quercetin treatment was able to rescue the replicative senescence in Werner syndrome MSCs through the transcriptional regulation of several cellular processes, such as cell cycle and anti-oxidation pathways. Interestingly, a similar effect on senescence were observed in HGPS cells, suggesting a common geroprotective effect of quercetin that could be relevant for premature and physiological aging [94].

In the past decade, several other pharmacological compounds have been reported to decrease progerin-induced pathological phenotypes (see review [95]) by several ways, such as a decrease in ROS production through N-acetyl cysteine drugs [96], decreasing vascular calcification through pyrophosphate treatment [48], targeting telomere dysfunction [97,98] or the restoration of nuclear organization through SUN1-associated acetyl transferase protein NAT10 inhibition with Remodelin [99] (Figs. 3 and 4). Recently, a promising strategy was reported by Hamczyk et al [21] showing that the treatment with a chemical chaperone tauroursodeoxycholic acid (TUDCA), successfully used in humans to treat cholestatic liver disease [100–103], was able to alleviate endoplasmic reticulum stress delaying medial VSMC loss and extending lifespan of progeroid mice.

3. Drug repurposing by drug screening

Even if previous research has led to the identification of a large number of potential therapeutic interventions by small molecules to correct HGPS defects, there is still a need for the discovery of new drugs that are suitable for trials in humans. To this end, another approach is to use high throughput screening (HTS) to evaluate the effect of old drugs on new phenotypes. This drug discovery strategy corresponds to the unbiased experimental testing of a compound library in order to find positive “hits” capable of correcting a defective mechanism of action or phenotype. This strategy will be discussed below in the light of three different studies reported in recent years.

3.1. Challenges in drug screening for HGPS

The first and most obvious challenge in high-throughput drug screening is the need for a robust and relevant assay that can be used to test the compounds. Such strategies could be developed based on several ways, with either “target-based”, also called “mechanism-based”, or “phenotypic-based” screening. A second challenge that has to be taken into consideration in drug screening is the choice of the cellular model. High-throughput screening requires a large quantity of stable cells that are relevant to the disease in order to work in reproducible conditions. In the case of HGPS, the use of primary cells from patients is challenging, firstly, because their growth, and thus the production of large quantities of cells, is limited by premature senescence and, secondly, because they are also associated with a phenotypic heterogeneity that could interfere with the identification of drugs of interest. Consequently, immortalized fibroblasts are generally preferred for HTS to bypass the use of primary cells. However, as it has been demonstrated in HGPS, progerin expression is progressively lost following immortalization, thus limiting its use for pharmacological interventions in HGPS [104]. Alternative strategies

have been described to overcome this obstacle, involving inducing progerin in non-HGPS cell lines by overexpression [105] or using anti-sense oligonucleotides (AON) [106,107]. Finally, in this context, iPS cell derivatives have emerged as a model of choice for drug screening, in addition to their role in disease modeling. Their high capacity for proliferation and the possibility of differentiating iPS cells into different cell types allows the generation of large banks of cells that recapitulate the main phenotypes of HGPS. To date, only three drug screening processes have been performed to identify new drugs using different cell models in the case of HGPS. These are described in more detailed in the following section.

3.2. Use of HTS to repurpose old drugs for HGPS

In 2016, our group reported the first high-throughput screening conducted on HGPS cells using MSCs derived from iPS cells. This screening led to the identification of a new class of compounds that decreases the farnesylation of prelamin A [108]. In this study, HGPS iPS-derived MSCs were used to evaluate the effects of 21,608 compounds on the subcellular localization of prelamin A by immunofluorescence, assuming that this would reflect a decrease in its farnesylation. From an initial list of 59 hits, 11 were ultimately validated regarding their efficacy in relation to increasing prelamin A staining in the nuclear membrane, their safety and the correction of HGPS phenotypic defects, as assessed in a secondary assay. Among these, a statin was identified, which highlights the relevance of screening as this class of compounds was previously shown to target progerin prenylation [66]. Most importantly, a new class of compounds with a common monoaminopyrimidine group (Mono-AP) was found to improve osteogenic differentiation and nuclear shape organization. Thanks to docking experiments, it was later proposed that Mono-AP decreases farnesylation by simultaneously inhibiting farnesyl pyrophosphate synthase (FPPS) and FTs. Therefore, even if this class of drugs is not directly repurposable, it could represent an advantageous form of treatment for HGPS by targeting farnesylation at different stages.

In 2016, Tom Misteli’s group reported on further high-throughput screening conducted on HGPS, using immortalized skin fibroblasts that overexpressed progerin in an inducible manner [105]. Several phenotypes of HGPS, such as reduced levels of the nuclear protein lamin B1, and LAP2, disorganization of the heterochromatin and an increase in DNA damage, were assessed at different points in time. Detection of lamin B1 and of γ H2AX foci, a DNA damage marker, was selected to develop a multi-parametric assay and screen 2,816 FDA-approved drugs and bioactives. Among these, 27 compounds were identified as potential hits, including two members of the retinoids, previously used for the treatment of acne or psoriasis, which exhibited strong and significant effects on all parameters that were tested.

Retinoids were also identified independently by our group in a third high-throughput screening performed on HGPS iPS-derived MSCs [109]. In this study, the premature osteogenic differentiation observed in HGPS iPS-derived MSCs [110] was used as a readout to screen a chemical library of 2800 drugs. 10 compounds were identified and, ultimately, the retinoids emerged as potential drug candidates. Results of this screening also confirmed the anti-progeroid effect of this class of drugs that was previously identified by Kubben et al. using another cellular model [105], also demonstrating its efficiency in reducing other pathological defects in HGPS MSCs. Furthermore, this work has added a proof of concept, showing that drug screening using iPSC-derived cells could be helpful in the discovery of drugs that target cell-types specific to phenotypes in HGPS.

4. Conclusions

Since the discovery of the genetic origin of HGPS in 2003, much progress has been made, leading to greater in-depth knowledge on the disease, its mechanisms of action and the cellular consequences that

ultimately drive the disease phenotypes. Given this short period of time, it is very surprising to see that several successful clinical translations of drug repurposing have already been reported, as shown for Isoniazid, zoledronate and pravastatin. Drug repurposing allowed researchers to progress rapidly to phase II clinical trials and to evaluate the efficacy of a limited number of drugs in a time and cost-effective manner. As discussed in this review, identification of these treatments was mainly based on hypothesis-driven approaches and unbiased high-throughput screening. To date, around 35 molecules have been reported to have a positive effect on HGPS by either limiting progerin expression, modulating alternative splicing, decreasing progerin accumulation or its pathological consequences. This situation is almost unique making impossible to evaluate the clinical benefit of all these individual drugs because of a limited number of patients. In the future, the systematic evaluation of the combination of drugs targeting in one hand progerin and in the other hand its downstream consequences appears to be a valuable strategy to identify an efficient treatment for this disease that remains uncured.

Acknowledgements

I-Stem and the Center of Research in Myology are part of the Biotherapies Institute for Rare Diseases (BIRD), supported by the Association Française contre les Myopathies (AFM-Téléthon). This research was funded by grants from INSERM, the domaine d'intérêt majeur (DIM) Biothérapies, Genopole and the European Commission: the laboratoire d'Excellence Revive (Investissement d'Avenir; ANR-10-LABX-73), NeurATRIS: A Translational Research Infrastructure for Biotherapies in Neurosciences (Investissement d'Avenir - ANR-11-INBS-0011), INGEMEM: the National Infrastructure Engineering for Pluripotent and differentiated Stem cells (Investissement d'Avenir - ANR-11-INBS-0009), the University of Paris-Saclay (BiotherAlliance) and the French National Agency (ANR-18-CE14-0036).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2020.04.005>.

References

- M. Gerhard-Herman, L.B. Smoot, N. Wake, M.W. Kieran, M.E. Kleinman, D. T. Miller, A. Schwartzman, A. Giobbie-Hurder, D. Neuberg, L.B. Gordon, Mechanisms of premature vascular aging in children with hutchinson-gilford progeria syndrome, *Hypertension* 59 (2012) 92–97, <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.180919>.
- M.A. Merideth, V. Sachdev, C.C. Brewer, B. Solomon, M.L. Turner, J. Graf, J. A. Yanovski, F.S. Collins, W.A. Gahl, Phenotype and course of hutchinson-gilford progeria syndrome, *N Engl. J. Med.* (2008) 13.
- A. De Sandre-Giovannoli, Lamin A truncation in hutchinson-gilford progeria, *Science* 300 (2003) 2055, <https://doi.org/10.1126/science.1084125>.
- M. Eriksson, W.T. Brown, L.B. Gordon, M.W. Glynn, J. Singer, L. Scott, M. R. Erdos, C.M. Robbins, T.Y. Moses, P. Berglund, A. Dutra, E. Pak, S. Durkin, A. B. Csoka, M. Boehnke, T.W. Glover, F.S. Collins, Recurrent de novo point mutations in lamin A cause Hutchinson-Gilford progeria syndrome, *Nature* 423 (2003) 293–298, <https://doi.org/10.1038/nature01629>.
- C.Y. Ho, J. Lammerding, Lamins at a glance, *J. Cell Sci.* 125 (2012) 2087–2093, <https://doi.org/10.1242/jcs.087288>.
- S. Kang, M.-H. Yoon, B.-J. Park, Laminopathies; Mutations on single gene and various human genetic diseases, *BMB Rep.* 51 (2018) 327–337, <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2018.51.7.113>.
- R.D. Goldman, D.K. Shumaker, M.R. Erdos, M. Eriksson, A.E. Goldman, L. B. Gordon, Y. Gruenbaum, S. Khuon, M. Mendez, R. Varga, F.S. Collins, Accumulation of mutant lamin A causes progressive changes in nuclear architecture in Hutchinson-Gilford progeria syndrome, *PNAS* 101 (2004) 8963–8968, <https://doi.org/10.1073/pnas.0402943101>.
- P. Scaffidi, T. Misteli, Reversal of the cellular phenotype in the premature aging disease Hutchinson-Gilford progeria syndrome, *Nat Med.* 11 (2005) 440–445, <https://doi.org/10.1038/nm1204>.
- M. Paradisi, D. McClintock, R.L. Boguslavsky, C. Pedicelli, H.J. Worman, K. Djabali, 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 (2005) 27, <https://doi.org/10.1186/1471-2121-6-27>.
- E.K. Benson, S.W. Lee, S.A. Aaronson, Role of progerin-induced telomere dysfunction in HGPS premature cellular senescence, *J. Cell Sci.* 123 (2010) 2605–2612, <https://doi.org/10.1242/jcs.067306>.
- T. Dechat, T. Shimi, S.A. Adam, A.E. Rusinol, D.A. Andres, H.P. Spielmann, M. S. Sinensky, R.D. Goldman, Alterations in mitosis and cell cycle progression caused by a mutant lamin A known to accelerate human aging, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104 (2007) 4955–4960, <https://doi.org/10.1073/pnas.0700854104>.
- M.L. Decker, E. Chavez, I. Vulto, P.M. Lansdorp, Telomere length in Hutchinson-Gilford progeria syndrome, *Mech. Ageing Dev.* 130 (2009) 377–383, <https://doi.org/10.1016/j.mad.2009.03.001>.
- S. Gonzalo, R. Kreienkamp, DNA repair defects and genome instability in Hutchinson-Gilford progeria syndrome, *Curr. Opin. Cell Biol.* 34 (2015) 75–83, <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2015.05.007>.
- I. Varela, J. Cadiñanos, A.M. Pendás, A. Gutiérrez-Fernández, A.R. Folgueras, L. M. Sánchez, Z. Zhou, F.J. Rodríguez, C.L. Stewart, J.A. Vega, K. Tryggvason, J.M. P. Freije, C. López-Otín, Accelerated ageing in mice deficient in Zmpste24 protease is linked to p53 signalling activation, *Nature* 437 (2005) 564–568, <https://doi.org/10.1038/nature04019>.
- G.-H. Liu, B.Z. Barkho, S. Ruiz, D. Diep, J. Qu, S.-L. Yang, A.D. Panopoulos, K. Suzuki, L. Kurian, C. Walsh, J. Thompson, S. Boue, H.L. Fung, I. Sancho-Martinez, K. Zhang, J.Y. Iii, J.C.I. Belmonte, Recapitulation of premature ageing with iPSCs from Hutchinson-Gilford progeria syndrome, *Nature* 472 (2011) 221–225, <https://doi.org/10.1038/nature09879>.
- Y. Liu, A. Rusinol, M. Sinensky, Y. Wang, Y. Zou, DNA damage responses in progeroid syndromes arise from defective maturation of prelamin A, *J. Cell Sci.* 119 (2006) 4644–4649, <https://doi.org/10.1242/jcs.03263>.
- H. Zhang, Z.-M. Xiong, K. Cao, Mechanisms controlling the smooth muscle cell death in progeria via down-regulation of poly(ADP-ribose) polymerase 1, *Proc. Nat. Acad. Sci.* 111 (2014) E2261–E2270, <https://doi.org/10.1073/pnas.1320843111>.
- J. Rivera-Torres, R. Acín-Perez, P. Cabezas-Sánchez, F.G. Osorio, C. Gonzalez-Gómez, D. Megias, C. Cámara, C. López-Otín, J.A. Enriquez, J.L. Luque-García, V. Andrés, Identification of mitochondrial dysfunction in Hutchinson-Gilford progeria syndrome through use of stable isotope labeling with amino acids in cell culture, *J. Proteomics* 91 (2013) 466–477, <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2013.08.008>.
- N. Kubben, W. Zhang, L. Wang, T.C. Voss, J. Yang, J. Qu, G.-H. Liu, T. Misteli, Repression of the antioxidant NRF2 pathway in premature aging, *Cell* 165 (2016) 1361–1374, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.05.017>.
- Y. Ao, J. Zhang, Z. Liu, M. Qian, Y. Li, Z. Wu, P. Sun, J. Wu, W. Bei, J. Wen, X. Wu, F. Li, Z. Zhou, W.-G. Zhu, B. Liu, Z. Wang, Lamin A buffers CK2 kinase activity to modulate aging in a progeria mouse model, *Science Advances* 5 (2019), <https://doi.org/10.1126/sciadv.aav5078> eav5078.
- M.R. Hamczyk, R. Villa-Bellosta, V. Quesada, P. Gonzalo, S. Vidak, R.M. Nevado, M.J. Andrés-Manzano, T. Misteli, C. López-Otín, V. Andrés, Progerin accelerates atherosclerosis by inducing endoplasmic reticulum stress in vascular smooth muscle cells, *EMBO Mol Med.* 11 (2019), <https://doi.org/10.15252/emmm.201809736>.
- J. Halaschek-Wiener, A. Brooks-Wilson, Progeria of stem cells: stem cell exhaustion in Hutchinson-Gilford progeria syndrome, *J. Gerontol. Ser. A* 62 (2007) 3–8, <https://doi.org/10.1093/gerona/62.1.3>.
- D. Gabriel, D. Roedel, L.B. Gordon, K. Djabali, Sulforaphane enhances progerin clearance in Hutchinson-Gilford progeria fibroblasts, *Aging Cell* 14 (2015) 78–91, <https://doi.org/10.1111/acer.12300>.
- G. Mariño, A.P. Ugalde, N. Salvador-Montoliu, I. Varela, P.M. Quirós, J. Cadiñanos, I. van der Pluijm, J.M.P. Freije, C. López-Otín, Premature aging in mice activates a systemic metabolic response involving autophagy induction, *Hum. Mol. Genet.* 17 (2008) 2196–2211, <https://doi.org/10.1093/hmg/ddn120>.
- G. Viteri, Y.W. Chung, E.R. Stadtman, Effect of progerin on the accumulation of oxidized proteins in fibroblasts from Hutchinson Gilford progeria patients, *Mech. Ageing Dev.* 131 (2010) 2–8, <https://doi.org/10.1016/j.mad.2009.11.006>.
- F.G. Osorio, C. Barcena, C. Soria-Valles, A.J. Ramsay, F. de Carlos, J. Cobo, A. Fueyo, J.M.P. Freije, C. Lopez-Otin, Nuclear lamina defects cause ATM-dependent NF- κ B activation and link accelerated aging to a systemic inflammatory response, *Genes Dev.* 26 (2012) 2311–2324, <https://doi.org/10.1101/gad.197954.112>.
- J. Ribas, Y.S. Zhang, P.R. Pitrez, J. Leijten, M. Miscuglio, J. Rouwkema, M. R. Dokmeci, X. Nissan, L. Ferreira, A. Khademhosseini, Biomechanical strain exacerbates inflammation on a progeria-on-a-chip model, *Small* 13 (2017) 1603737, <https://doi.org/10.1002/sml.201603737>.
- C. López-Otín, M.A. Blasco, L. Partridge, M. Serrano, G. Kroemer, The hallmarks of aging, *Cell* 153 (2013) 1194–1217, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.05.039>.
- P. Scaffidi, Lamin A-dependent nuclear defects in human aging, *Science* 312 (2006) 1059–1063, <https://doi.org/10.1126/science.1127168>.
- D. McClintock, D. Ratner, M. Lokuge, D.M. Owens, L.B. Gordon, F.S. Collins, K. Djabali, The mutant form of lamin A that causes Hutchinson-Gilford progeria is a biomarker of cellular aging in human skin, *PLoS ONE* 2 (2007), e1269, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001269>.
- M.I. Miyamoto, K. Djabali, L.B. Gordon, Atherosclerosis in ancient humans, accelerated aging syndromes and normal aging, *Global Heart* 9 (2014) 211–218, <https://doi.org/10.1016/j.heart.2014.04.001>.
- S. Rodríguez, F. Coppède, H. Sagelius, M. Eriksson, Increased expression of the Hutchinson-Gilford progeria syndrome truncated lamin A transcript during cell aging, *Eur. J. Hum. Genet.* 17 (2009) 928–937, <https://doi.org/10.1038/ejhg.2008.270>.

- [33] D. Constantinescu, A.B. Csoka, C.S. Navara, G.P. Schatten, Defective DSB repair correlates with abnormal nuclear morphology and is improved with FTI treatment in Hutchinson-Gilford progeria syndrome fibroblasts, *Exp. Cell Res.* 316 (2010) 2747–2759, <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2010.05.015>.
- [34] D.K. Shumaker, T. Dechat, A. Kohlmaier, S.A. Adam, M.R. Bozovsky, M.R. Erdos, M. Eriksson, A.E. Goldman, S. Khun, F.S. Collins, T. Jenuwein, R.D. Goldman, Mutant nuclear lamin A leads to progressive alterations of epigenetic control in premature aging, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103 (2006) 8703–8708, <https://doi.org/10.1073/pnas.0602569103>.
- [35] K. Takahashi, S. Yamanaka, Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors, *Cell* 126 (2006) 663–676, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.024>.
- [36] Y. Shi, H. Inoue, J.C. Wu, S. Yamanaka, Induced pluripotent stem cell technology: a decade of progress, *Nat. Rev. Drug Discov.* 16 (2017) 115–130, <https://doi.org/10.1038/nrd.2016.245>.
- [37] J. Zhang, Q. Lian, G. Zhu, F. Zhou, L. Sui, C. Tan, R.A. Mitalif, R. Navasankari, Y. Zhang, H.-F. Tse, C.L. Stewart, A. Colman, A human iPSC model of Hutchinson-Gilford progeria reveals vascular smooth muscle and mesenchymal stem cell defects, *Cell Stem Cell* 8 (2011) 31–45, <https://doi.org/10.1016/j.stem.2010.12.002>.
- [38] D. Constantinescu, H.L. Gray, P.J. Sarnak, G.P. Schatten, A.B. Csoka, Lamin A/C expression is a marker of mouse and human embryonic stem cell differentiation, *Stem Cells* 24 (2006) 177–185, <https://doi.org/10.1634/stemcells.2004-0159>.
- [39] X. Nissan, S. Blondel, C. Navarro, Y. Maury, C. Denis, M. Girard, C. Martinat, A. De Sandre-Giovannoli, N. Levy, M. Peschanski, Unique Preservation of neural cells in Hutchinson-Gilford progeria syndrome is due to the expression of the neural-specific miR-9 MicroRNA, *Cell Reports* 2 (2012) 1–9, <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2012.05.015>.
- [40] L. Atchison, H. Zhang, K. Cao, G.A. Truskey, A tissue engineered blood vessel model of Hutchinson-Gilford Progeria syndrome using human iPSC-derived smooth muscle cells, *Sci Rep.* 7 (2017) 8168, <https://doi.org/10.1038/s41598-017-08632-4>.
- [41] Z.-M. Xiong, C. LaDana, D. Wu, K. Cao, An inhibitory role of progerin in the gene induction network of adipocyte differentiation from iPS cells, *Aging* 5 (2013) 288–303, <https://doi.org/10.18632/aging.100550>.
- [42] M.O. Bergho, B. Gavino, J. Ross, W.K. Schmidt, C. Hong, L.V. Kendall, A. Mohr, M. Meta, H. Genant, Y. Jiang, E.R. Wisner, N. van Bruggen, R.A.D. Carano, S. Michaelis, S.M. Griffey, S.G. Young, Zmpste24 deficiency in mice causes spontaneous bone fractures, muscle weakness, and a prelamina A processing defect, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99 (2002) 13049–13054, <https://doi.org/10.1073/pnas.192460799>.
- [43] A.M. Pendas, Z. Zhou, J. Cadiñanos, J.M.P. Freije, J. Wang, K. Hulthenby, A. Astudillo, A. Wernerson, F. Rodríguez, K. Tryggvason, C. López-Otín, Defective prelamina A processing and muscular and adipocyte alterations in Zmpste24 metalloproteinase-deficient mice, *Nat. Genet.* 31 (2002) 94–99, <https://doi.org/10.1038/ng871>.
- [44] F.G. Osorio, A.J. Obaya, C. López-Otín, J.M.P. Freije, Accelerated ageing: from mechanism to therapy through animal models, *Transgenic Res.* 18 (2009) 7–15, <https://doi.org/10.1007/s11248-008-9226-z>.
- [45] R. Varga, M. Eriksson, M.R. Erdos, M. Olive, I. Harten, F. Kolodgie, B.C. Capell, J. Cheng, D. Faddah, S. Perkins, H. Avallone, H. San, X. Qu, S. Ganesh, L. B. Gordon, R. Virmani, T.N. Wight, E.G. Nabel, F.S. Collins, Progressive vascular smooth muscle cell defects in a mouse model of Hutchinson-Gilford progeria syndrome, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103 (2006) 3250–3255, <https://doi.org/10.1073/pnas.0600012103>.
- [46] S.H. Yang, A farnesyltransferase inhibitor improves disease phenotypes in mice with a Hutchinson-Gilford progeria syndrome mutation, *J. Clin. Invest.* 116 (2006) 2115–2121, <https://doi.org/10.1172/JCI28968>.
- [47] F.G. Osorio, C.L. Navarro, J. Cadiñanos, I.C. López-Mejía, P.M. Quirós, C. Bartoli, J. Rivera, J. Tazi, G. Guzmán, I. Varela, D. Depetris, F. de Carlos, J. Cobo, V. Andrés, A. De Sandre-Giovannoli, J.M.P. Freije, N. Lévy, C. López-Otín, Splicing-directed therapy in a new mouse model of human accelerated aging, *Sci. Transl. Med.* 3 (2011), <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3002847>, 106ra107.
- [48] R. Villa-Bellota, J. Rivera-Torres, F.G. Osorio, R. Acín-Pérez, J.A. Enriquez, C. López-Otín, V. Andrés, Defective extracellular pyrophosphate metabolism promotes vascular calcification in a mouse model of Hutchinson-Gilford progeria syndrome that is ameliorated on pyrophosphate treatment, *Circulation* 127 (2013) 2442–2451, <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.112.000571>.
- [49] B. Dorado, G.G. Ploen, A. Barettono, A. Macías, P. Gonzalo, M.J. Andrés-Manzano, C. González-Gómez, C. Galán-Arriola, J.M. Alfonso, M. Lobo, G.J. López-Martín, A. Molina, R. Sánchez-Sánchez, J. Gadea, J. Sánchez-González, Y. Liu, H. Callesen, D. Filgueiras-Rama, B. Ibáñez, C.B. Sørensen, V. Andrés, Generation and characterization of a novel knockin minipig model of Hutchinson-Gilford progeria syndrome, *Cell Discov.* 5 (2019) 16, <https://doi.org/10.1038/s41421-019-0084-z>.
- [50] S. Pushpakom, F. Iorio, P.A. Eyers, K.J. Escott, S. Hopper, A. Wells, A. Doig, T. Guilliams, J. Latimer, C. McNamee, A. Norris, P. Sanseau, D. Cavalla, M. Pirmohamed, Drug repurposing: progress, challenges and recommendations, *Nat. Rev. Drug Discov.* 18 (2019) 41–58, <https://doi.org/10.1038/nrd.2018.168>.
- [51] L.-L. Christine, Propranolol for severe Hemangiomas of infancy, *N. Engl. J. Med.* (2008) 3.
- [52] R.A. Hodos, B.A. Kidd, K. Shameer, B.P. Readhead, J.T. Dudley, *In silico* methods for drug repurposing and pharmacology: Computational approaches to drug repurposing and pharmacology, *WIREs Syst. Biol. Med.* 8 (2016) 186–210, <https://doi.org/10.1002/wsbm.1337>.
- [53] N. Berndt, A.D. Hamilton, S.M. Sebti, Targeting protein prenylation for cancer therapy, *Nat. Rev. Cancer* 11 (2011) 775–791, <https://doi.org/10.1038/nrc3151>.
- [54] M.W. Kieran, R.J. Packer, A. Onar, S.M. Blaney, P. Phillips, I.F. Pollack, J. R. Geyer, S. Gururangan, A. Banerjee, S. Goldman, C.D. Turner, J.B. Belasco, A. Broniscer, Y. Zhu, E. Frank, P. Kirschmeier, P. Statkevich, A. Yver, J.M. Boyett, L.E. Kun, 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, *JCO* 25 (2007) 3137–3143, <https://doi.org/10.1200/JCO.2006.09.4243>.
- [55] E. Van Cutsem, H. van de Velde, P. Karasek, H. Oettle, W.L. Vervenne, A. Szawlowski, P. Schöffski, S. Post, C. Verslype, H. Neumann, H. Safran, Y. Humblet, J. Perez Ruixo, Y. Ma, D. Von Hoff, Phase III trial of gemcitabine plus tipifarnib compared with gemcitabine plus placebo in advanced pancreatic cancer, *JCO* 22 (2004) 1430–1438, <https://doi.org/10.1200/JCO.2004.10.112>.
- [56] B.C. Widemann, R.J. Arceci, N. Jayaprakash, E. Fox, P. Zannikos, W. Goodspeed, A. Goodwin, J.J. Wright, S.M. Blaney, P.C. Adamson, F.M. Balis, Phase I trial and pharmacokinetic study of the farnesyl transferase inhibitor tipifarnib in children and adolescents with refractory leukemias: a report from the Children's Oncology Group, *Pediatr. Blood Cancer* 56 (2011) 226–233, <https://doi.org/10.1002/pbc.22775>.
- [57] B.C. Capell, M.R. Erdos, J.P. Madigan, J.J. Fiordalisi, R. Varga, K.N. Conneely, L. B. Gordon, C.J. Der, A.D. Cox, F.S. Collins, Inhibiting farnesylation of progerin prevents the characteristic nuclear blebbing of Hutchinson-Gilford progeria syndrome, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102 (2005) 12879–12884, <https://doi.org/10.1073/pnas.0506001102>.
- [58] M.W. Glynn, T.W. Glover, Incomplete processing of mutant lamin A in Hutchinson-Gilford progeria leads to nuclear abnormalities, which are reversed by farnesyltransferase inhibition, *Hum. Mol. Genet.* 14 (2005) 2959–2969, <https://doi.org/10.1093/hmg/ddi326>.
- [59] M.P. Mallampalli, G. Huyer, P. Bendale, M.H. Gelb, S. Michaelis, Inhibiting farnesylation reverses the nuclear morphology defect in a HeLa cell model for Hutchinson-Gilford progeria syndrome, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102 (2005) 14416–14421, <https://doi.org/10.1073/pnas.0503712102>.
- [60] J.I. Toth, S.H. Yang, X. Qiao, A.P. Beigneux, M.H. Gelb, C.L. Moulson, J.H. Miner, S.G. Young, L.G. Fong, Blocking protein farnesyltransferase improves nuclear shape in fibroblasts from humans with progeroid syndromes, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102 (2005) 12873–12878, <https://doi.org/10.1073/pnas.0505767102>.
- [61] B.C. Capell, A farnesyltransferase inhibitor prevents both the onset and late progression of cardiovascular disease in a progeria mouse model, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106 (2009) 13143, <https://doi.org/10.1073/pnas.0907672106>.
- [62] S. Yang, Treatment with a farnesyltransferase inhibitor improves survival in mice with a Hutchinson-Gilford progeria syndrome mutation, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Mol. Cell Biol. Lipids* 1781 (2008) 36–39, <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2007.11.003>.
- [63] S.H. Yang, M.O. Bergho, J.I. Toth, X. Qiao, Y. Hu, S. Sandoval, M. Meta, P. Bendale, M.H. Gelb, S.G. Young, L.G. Fong, Blocking protein farnesyltransferase improves nuclear blebbing in mouse fibroblasts with a targeted Hutchinson-Gilford progeria syndrome mutation, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102 (2005) 10291–10296, <https://doi.org/10.1073/pnas.0504641102>.
- [64] R.G.G. Russell, Bisphosphonates: mode of action and pharmacology, *Pediatrics* 119 (2007) S150–S162, <https://doi.org/10.1542/peds.2006-2023H>.
- [65] J.K. Liao, Isoprenoids as mediators of the biological effects of statins, *J. Clin. Invest.* 110 (2002) 285–288, <https://doi.org/10.1172/JCI0216421>.
- [66] I. Varela, S. Pereira, A.P. Ugalde, C.L. Navarro, M.F. Suárez, P. Cau, J. Cadiñanos, F.G. Osorio, N. Foray, J. Cobo, F. de Carlos, N. Lévy, J.M.P. Freije, C. López-Otín, Combined treatment with statins and aminobisphosphonates extends longevity in a mouse model of human premature aging, *Nat. Med.* 14 (2008) 767–772, <https://doi.org/10.1038/nm1786>.
- [67] L.B. Gordon, M.E. Kleinman, D.T. Miller, D.S. Neuberger, A. Giobbie-Hurder, M. Gerhard-Herman, L.B. Smoot, C.M. Gordon, R. Cleveland, B.D. Snyder, B. Fligor, W.R. Bishop, P. Statkevich, A. Regen, A. Sonis, S. Riley, C. Ploski, A. Correia, N. Quinn, N.J. Ullrich, A. Nazarian, M.G. Liang, S.Y. Huh, A. Schwartzman, M.W. Kieran, Clinical trial of a farnesyltransferase inhibitor in children with Hutchinson-Gilford progeria syndrome, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109 (2012) 16666–16671, <https://doi.org/10.1073/pnas.1202529109>.
- [68] L.B. Gordon, M.E. Kleinman, J. Massaro, R.B. D'Agostino, H. Shappell, M. Gerhard-Herman, L.B. Smoot, C.M. Gordon, R.H. Cleveland, A. Nazarian, B. D. Snyder, N.J. Ullrich, V.M. Silvera, M.G. Liang, N. Quinn, D.T. Miller, S.Y. Huh, A.A. Dowton, K. Littlefield, M.M. Greer, M.W. Kieran, Clinical trial of the protein farnesylation inhibitors lonafarnib, pravastatin, and zoledronic acid in children with Hutchinson-Gilford progeria syndrome, *Circulation* 134 (2016) 114–125, <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.116.022188>.
- [69] F. Boutouja, C.M. Stiehm, H.W. Platta, mTOR: a cellular regulator interface in health and disease, *Cells* 8 (2019) 18, <https://doi.org/10.3390/cells8010018>.
- [70] J.J. Graziotto, K. Cao, F.S. Collins, D. Krainc, Rapamycin activates autophagy in Hutchinson-Gilford progeria syndrome: implications for normal aging and age-dependent neurodegenerative disorders, *Autophagy* 8 (2012) 147–151, <https://doi.org/10.4161/auto.8.1.18331>.
- [71] D.E. Harrison, R. Strong, Z.D. Sharp, J.F. Nelson, C.M. Astle, K. Flurkey, N. L. Nadon, J.E. Wilkinson, K. Frenkel, C.S. Carter, M. Pahor, M.A. Javors, E. Fernandez, R.A. Miller, Rapamycin fed late in life extends lifespan in genetically heterogeneous mice, *Nature* 460 (2009) 392–395, <https://doi.org/10.1038/nature08221>.
- [72] C.-Y. Liao, S.S. Anderson, N.H. Chicoine, J.R. Mayfield, E.C. Academia, J. A. Wilson, C. Pongkietisak, M.A. Thompson, E.P. Lagmay, D.M. Miller, Y.-M. Hsu,

- M.A. McCormick, M.N. O'Leary, B.K. Kennedy, Rapamycin reverses metabolic deficits in Lamin A/C-deficient mice, *Cell Rep.* 17 (2016) 2542–2552, <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.10.040>.
- [73] R.A. Miller, D.E. Harrison, C.M. Astle, J.A. Baur, A.R. Boyd, R. de Cabo, E. Fernandez, K. Flurkey, M.A. Javors, J.F. Nelson, C.J. Orihuela, S. Pletcher, Z. D. Sharp, D. Sinclair, J.W. Starnes, J.E. Wilkinson, N.L. Nadon, R. Strong, Rapamycin, but not resveratrol or simvastatin, extends life span of genetically heterogeneous mice, *J. Gerontol. Ser. A* 66A (2011) 191–201, <https://doi.org/10.1093/gerona/glq178>.
- [74] F. Neff, D. Flores-Dominguez, D.P. Ryan, M. Horsch, S. Schröder, T. Adler, L. C. Afonso, J.A. Aguilar-Pimentel, L. Becker, L. Garrett, W. Hans, M.M. Hettlich, R. Holtmeier, S.M. Hölter, K. Moreth, C. Prehn, O. Puk, I. Rácz, B. Rathkolb, J. Rozman, B. Naton, R. Ordemann, J. Adamski, J. Beckers, R. Bekeredjian, D. H. Busch, G. Ehninger, J. Graw, H. Höfler, M. Klingenspor, T. Klopstock, M. Ollert, J. Stypmann, E. Wolf, W. Wurst, A. Zimmer, H. Fuchs, V. Gailus-Durner, M. Hrabec de Angelis, D. Ehninger, Rapamycin extends murine lifespan but has limited effects on aging, *J. Clin. Invest.* 123 (2013) 3272–3291, <https://doi.org/10.1172/JCI67674>.
- [75] K. Cao, J.J. Graziotto, C.D. Blair, J.R. Mazzulli, M.R. Erdos, D. Krainc, F.S. Collins, Rapamycin reverses cellular phenotypes and enhances mutant protein clearance in Hutchinson-Gilford progeria syndrome cells, *89ra58-89ra58*, *Sci. Transl. Med.* 3 (2011), <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3002346>.
- [76] D. Gabriel, L.B. Gordon, K. Djabali, Temsirolimus partially rescues the hutchinson-gilford progeria cellular phenotype, e0168988, *PLoS ONE* 11 (2016), <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0168988>.
- [77] C.A. Avelaira, M. Ferreira-Marques, L. Cortes, J. Valero, D. Pereira, L. Pereira de Almeida, C. Cavadas, Neuropeptide Y enhances progerin clearance and ameliorates the senescent phenotype of human Hutchinson-Gilford progeria syndrome cells, *glz280*, *J. Gerontol. Ser. A* (2020), <https://doi.org/10.1093/gerona/glz280>.
- [78] K. Harhouri, C. Navarro, D. Depetris, M. Mattei, X. Nissan, P. Cau, A. De Sandre-Giovannoli, N. Lévy, MG132-induced progerin clearance is mediated by autophagy activation and splicing regulation, *EMBO Mol. Med.* 9 (2017) 1294–1313, <https://doi.org/10.15252/emmm.201607315>.
- [79] I.C. Lopez-Mejia, V. Vautrot, M. De Toledo, I. Behm-Ansmant, C.F. Bourgeois, C. L. Navarro, F.G. Osorio, J.M.P. Freije, J. Stévenin, A. De Sandre-Giovannoli, C. Lopez-Otin, N. Lévy, C. Brantant, J. Tazi, A conserved splicing mechanism of the LMNA gene controls premature aging, *Hum. Mol. Genet.* 20 (2011) 4540–4555, <https://doi.org/10.1093/hmg/ddr385>.
- [80] A.-L. Egesipe, S. Blondel, A.L. Cicero, A.-L. Jaskowiak, C. Navarro, A.D. Sandre-Giovannoli, N. Levy, M. Peschanski, X. Nissan, Metformin decreases progerin expression and alleviates pathological defects of Hutchinson-Gilford progeria syndrome cells, *NPJ Aging Mech. Dis.* 2 (2016), <https://doi.org/10.1038/npjamd.2016.26>.
- [81] J.L. Barger, T. Kayo, J.M. Vann, E.B. Arias, J. Wang, T.A. Hacker, Y. Wang, D. Raederstorff, J.D. Morrow, C. Leeuwenburgh, D.B. Allison, K.W. Saupe, G. D. Cartee, R. Weindruch, T.A. Prolla, A low dose of dietary resveratrol partially mimics caloric restriction and retards aging parameters in mice, *PLoS ONE* 3 (2008), e2264, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002264>.
- [82] C.-L. Kao, L.-K. Chen, Y.-L. Chang, M.-C. Yung, C.-C. Hsu, Y.-C. Chen, W.-L. Lo, S.-J. Chen, H.-H. Ku, S.-J. Hwang, Resveratrol protects human endothelium from H2O2-induced oxidative stress and senescence via SirT1 activation, *JAT.* 17 (2010) 970–979, <https://doi.org/10.5551/jat.4333>.
- [83] R.S. Khan, Z. Fonseca-Kelly, C. Callinan, L. Zuo, M.M. Sachdeva, K.S. Shindler, SIRT1 activating compounds reduce oxidative stress and prevent cell death in neuronal cells, *Front. Cell. Neurosci.* 6 (2012), <https://doi.org/10.3389/fncel.2012.00063>.
- [84] H.-C. Chang, L. Guarente, SIRT1 and other sirtuins in metabolism, *Trends Endocrinol. Metab.* 25 (2014) 138–145, <https://doi.org/10.1016/j.tem.2013.12.001>.
- [85] A.P. Singh, R. Singh, S.S. Verma, V. Rai, C.H. Kaschula, P. Maiti, S.C. Gupta, Health benefits of resveratrol: evidence from clinical studies, *Med Res Rev.* 39 (2019) 1851–1891, <https://doi.org/10.1002/medr.21565>.
- [86] B. Liu, S. Ghosh, X. Yang, H. Zheng, X. Liu, Z. Wang, G. Jin, B. Zheng, B. Kennedy, Y. Suh, M. Kaerberlein, K. Tryggvason, Z. Zhou, Resveratrol rescues SIRT1-dependent adult stem cell decline and alleviates progerin features in laminopathy-based progeria, *Cell Metab.* 16 (2012) 738–750, <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.11.007>.
- [87] L.M. Howells, D.P. Berry, P.J. Elliott, E.W. Jacobson, E. Hoffmann, B. Hegarty, K. Brown, W.P. Steward, A.J. Gescher, Phase I Randomized, Double-Blind Pilot Study of Micronized Resveratrol (SRT501) in patients with hepatic metastases-safety, pharmacokinetics, and pharmacodynamics, *Cancer Prevention Res.* 4 (2011) 1419–1425, <https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-11-0148>.
- [88] N. Mazarakis, K. Snibson, P.V. Licciardi, T.C. Karagiannis, The potential use of l-sulforaphane for the treatment of chronic inflammatory diseases: a review of the clinical evidence, *S0261561419301360*, *Clin. Nutrition.* (2019), <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2019.03.022>.
- [89] N. Gan, Y.-C. Wu, M. Brunet, C. Garrido, F.-L. Chung, C. Dai, L. Mi, Sulforaphane activates heat shock response and enhances proteasome activity through up-regulation of Hsp27, *J. Biol. Chem.* 285 (2010) 35528–35536, <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.152686>.
- [90] M.-K. Kwak, J.-M. Cho, B. Huang, S. Shin, T.W. Kensler, Role of increased expression of the proteasome in the protective effects of sulforaphane against hydrogen peroxide-mediated cytotoxicity in murine neuroblastoma cells, *Free Radical. Biol. Med.* 43 (2007) 809–817, <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2007.05.029>.
- [91] E. Kubo, B. Chhunchha, P. Singh, H. Sasaki, D.P. Singh, Sulforaphane reactivates cellular antioxidant defense by inducing Nrf2/ARE/Prdx6 activity during aging and oxidative stress, *Sci Rep.* 7 (2017) 14130, <https://doi.org/10.1038/s41598-017-14520-8>.
- [92] D. Gabriel, D.D. Shafry, L.B. Gordon, K. Djabali, Intermittent treatment with farnesyltransferase inhibitor and sulforaphane improves cellular homeostasis in Hutchinson-Gilford progeria fibroblasts, *Oncotarget.* 8 (2017), <https://doi.org/10.18632/oncotarget.19363>.
- [93] Z.-M. Xiong, J.Y. Choi, K. Wang, H. Zhang, Z. Tariq, D. Wu, E. Ko, C. LaDana, H. Sesaki, K. Cao, Methylene blue alleviates nuclear and mitochondrial abnormalities in progeria, *Aging Cell* 15 (2016) 279–290, <https://doi.org/10.1111/ace1.12434>.
- [94] L. Geng, Z. Liu, W. Zhang, W. Li, Z. Wu, W. Wang, R. Ren, Y. Su, P. Wang, L. Sun, Z. Ju, P. Chan, M. Song, J. Qu, G.-H. Liu, Chemical screen identifies a geroprotective role of quercetin in premature aging, *Protein Cell.* 10 (2019) 417–435, <https://doi.org/10.1007/s13238-018-0567-y>.
- [95] K. Harhouri, D. Frankel, C. Bartoli, P. Roll, A. De Sandre-Giovannoli, N. Lévy, An overview of treatment strategies for Hutchinson-Gilford Progeria syndrome, *Nucleus.* 9 (2018) 265–276, <https://doi.org/10.1080/19491034.2018.1460045>.
- [96] S.A. Richards, J. Muter, P. Ritchie, G. Lattanzi, C.J. Hutchison, 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 (2011) 3997–4004, <https://doi.org/10.1093/hmg/ddr327>.
- [97] J. Aguado, A. Sola-Carvajal, V. Cancila, G. Revéchon, P.F. Ong, C.W. Jones-Weinert, E. Wallén Arzt, G. Lattanzi, O. Dreesen, C. Tripodo, F. Rossiello, M. Eriksson, F. d'Adda di Fagagna, Inhibition of DNA damage response at telomeres improves the detrimental phenotypes of Hutchinson-Gilford progeria syndrome, *Nat Commun.* 10 (2019) 4990, <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13018-3>.
- [98] Y. Li, G. Zhou, I.G. Bruno, N. Zhang, S. Sho, E. Tedone, T. Lai, J.P. Cooke, J. W. Shay, Transient introduction of human telomerase mRNA improves hallmarks of progeria cells, *Aging Cell* 18 (2019), <https://doi.org/10.1111/ace1.12979>.
- [99] D. Larrieu, S. Britton, M. Demir, R. Rodriguez, S.P. Jackson, Chemical inhibition of NAT10 corrects defects of laminopathic cells, *Science* 344 (2014) 527–532, <https://doi.org/10.1126/science.1252651>.
- [100] A. Crosignani, P.M. Battezzati, K.D. Setchell, P. Invernizzi, G. Covini, M. Zuin, M. Podda, Tauroursodeoxycholic acid for treatment of primary biliary cirrhosis. A dose-response study, *Dig. Dis. Sci.* 41 (1996) 809–815, <https://doi.org/10.1007/bf02213140>.
- [101] A. Larghi, A. Crosignani, P.M. Battezzati, G. De Valle, M. Allocca, P. Invernizzi, M. Zuin, M. Podda, Ursodeoxycholic and tauro-ursodeoxycholic acids for the treatment of primary biliary cirrhosis: a pilot crossover study, *Aliment. Pharmacol. Ther.* 11 (1997) 409–414, <https://doi.org/10.1046/j.1365-2036.1997.124295000.x>.
- [102] oneyear pilot study for TUDCA-Angelico M.ris, (n.d.).
- [103] P. Invernizzi, K.D. Setchell, A. Crosignani, P.M. Battezzati, A. Larghi, N. O'Connell, M. Podda, Differences in the metabolism and disposition of ursodeoxycholic acid and of its taurine-conjugated species in patients with primary biliary cirrhosis, *Hepatology* 29 (1999) 320–327, <https://doi.org/10.1002/hep.510290220>.
- [104] K. Cao, C.D. Blair, D.A. Faddah, J.E. Kieckhafer, M. Olive, M.R. Erdos, E. G. Nabel, F.S. Collins, Progerin and telomere dysfunction collaborate to trigger cellular senescence in normal human fibroblasts, *J. Clin. Invest.* 121 (2011) 2833–2844, <https://doi.org/10.1172/JCI43578>.
- [105] N. Kubben, K.R. Brimacombe, M. Donegan, Z. Li, T. Misteli, A high-content imaging-based screening pipeline for the systematic identification of anti-progeroid compounds, *Methods* 96 (2016) 46–58, <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2015.08.024>.
- [106] L.G. Fong, T.A. Vickers, E.A. Farber, C. Choi, U.J. Yun, Y. Hu, S.H. Yang, C. Coffinier, R. Lee, L. Yin, B.S.J. Davies, D.A. Andres, H.P. Spielmann, C. E. Bennett, S.G. Young, Activating the synthesis of progerin, the mutant prelamina A in Hutchinson-Gilford progeria syndrome, with antisense oligonucleotides, *Hum. Mol. Genet.* 18 (2009) 2462–2471, <https://doi.org/10.1093/hmg/ddp184>.
- [107] K. Harhouri, C. Navarro, C. Baquerre, N. Da Silva, C. Bartoli, F. Casey, G. Mawuse, Y. Doubaj, N. Lévy, A. De Sandre-Giovannoli, Antisense-based progerin downregulation in HGPS-like patients' cells, *Cells.* 5 (2016) 31, <https://doi.org/10.3390/cells5030031>.
- [108] S. Blondel, A.-L. Egesipe, P. Picardi, A.-L. Jaskowiak, M. Notarnicola, J. Ragot, J. Tournais, A. Le Corf, B. Brinon, P. Poydenot, P. Georges, C. Navarro, P.R. Pitrez, L. Ferreira, G. Bollot, C. Bauvais, D. Laustriat, A. Mejat, A. De Sandre-Giovannoli, N. Levy, M. Bifulco, M. Peschanski, X. Nissan, Drug screening on Hutchinson Gilford progeria pluripotent stem cells reveals aminopyrimidines as new modulators of farnesylation, *Cell Death Dis.* 7 (2016), <https://doi.org/10.1038/cddis.2015.374> e2105–e2105.
- [109] A. Lo Cicero, A.-L. Jaskowiak, A.-L. Egesipe, J. Tournais, B. Brinon, P.R. Pitrez, L. Ferreira, A. de Sandre-Giovannoli, N. Levy, X. Nissan, A High Throughput phenotypic screening reveals compounds that counteract premature osteogenic differentiation of HGPS iPS-derived mesenchymal stem cells, *Sci Rep.* 6 (2016) 34798, <https://doi.org/10.1038/srep34798>.
- [110] S. Blondel, A.-L. Jaskowiak, A.-L. Egesipe, A. Le Corf, C. Navarro, V. Cordette, C. Martinat, Y. Laabi, K. Djabali, A. de Sandre-Giovannoli, N. Levy, M. Peschanski, X. Nissan, Induced pluripotent stem cells reveal functional differences between drugs currently investigated in patients with Hutchinson-Gilford progeria syndrome, *STEM CELLS Transl. Med.* 3 (2014) 510–519, <https://doi.org/10.5966/sctm.2013-0168>.

ARTICLE IN PRESS

S.M. Guilbert et al.

Methods xxx (xxxx) xxx

- [111] O. Santiago-Fernández, F.G. Osorio, V. Quesada, F. Rodríguez, S. Basso, D. Maeso, L. Rolas, A. Barkaway, S. Nourshargh, A.R. Folgueras, J.M.P. Freije, C. López-Otín, Development of a CRISPR/Cas9-based therapy for Hutchinson-Gilford progeria syndrome, *Nat. Med.* 25 (2019) 423–426, <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0338-6>.
- [112] E. Beyret, H.-K. Liao, M. Yamamoto, R. Hernandez-Benitez, Y. Fu, G. Erikson, P. Reddy, J.C. Izpisua Belmonte, Single-dose CRISPR–Cas9 therapy extends lifespan of mice with Hutchinson-Gilford progeria syndrome, *Nat. Med.* 25 (2019) 419–422, <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0343-4>.
- [113] M.X. Ibrahim, V.I. Sayin, M.K. Akula, M. Liu, L.G. Fong, S.G. Young, M.O. Bergo, Targeting isoprenylcysteine methylation ameliorates disease in a mouse model of progeria, *Science* 340 (2013) 1330–1333, <https://doi.org/10.1126/science.1238880>.
- [114] H.T. Kang, J.T. Park, K. Choi, H.J.C. Choi, C.W. Jung, G.R. Kim, Y.-S. Lee, S. C. Park, Chemical screening identifies ROCK as a target for recovering mitochondrial function in Hutchinson-Gilford progeria syndrome, *Aging Cell* 16 (2017) 541–550, <https://doi.org/10.1111/acer.12584>.
- [115] R. Kreienkamp, M. Croke, M.A. Neumann, G. Bedia-Diaz, S. Graziano, A. Dusso, D. Dorsett, C. Carlberg, S. Gonzalo, Vitamin D receptor signaling improves Hutchinson-Gilford progeria syndrome cellular phenotypes, *Oncotarget* 7 (2016), <https://doi.org/10.18632/oncotarget.9065>.
- [116] M. Qian, Z. Liu, L. Peng, X. Tang, F. Meng, Y. Ao, M. Zhou, M. Wang, X. Cao, B. Qin, Z. Wang, Z. Zhou, G. Wang, Z. Gao, J. Xu, B. Liu, Boosting ATM activity alleviates aging and extends lifespan in a mouse model of progeria, *ELife* 7 (2018), e34836, <https://doi.org/10.7554/eLife.34836>.
- [117] B.A. Kudlow, M.N. Stanfel, C.R. Burtner, E.D. Johnston, B.K. Kennedy, Suppression of proliferative defects associated with processing-defective lamin A mutants by hTERT or Inactivation of p53, *MBoC* 19 (2008) 5238–5248, <https://doi.org/10.1091/mbc.e08-05-0492>.
- [118] S.-J. Lee, Y.-S. Jung, M.-H. Yoon, S. Kang, A.-Y. Oh, J.-H. Lee, S.-Y. Jun, T.-G. Woo, H.-Y. Chun, S.K. Kim, K.J. Chung, H.-Y. Lee, K. Lee, G. Jin, M.-K. Na, N. C. Ha, C. Bárcena, J.M.P. Freije, C. López-Otín, G.Y. Song, B.-J. Park, Interruption of progerin–lamin A/C binding ameliorates Hutchinson-Gilford progeria syndrome phenotype, *J. Clin. Invest.* 126 (2016) 3879–3893, <https://doi.org/10.1172/JCI84164>.
- [119] Arnold Liu, Henriques Djabali, Inhibition of JAK-STAT signaling with baricitinib reduces inflammation and improves cellular homeostasis in progeria cells, *Cells* 8 (2019) 1276, <https://doi.org/10.3390/cells8101276>.

Chapitre 6

APPENDICES

6.1. Article n°5

The non-muscle ADF/cofilin-1 controls sarcomeric actin filament integrity and force production in striated muscle laminopathies

Nicolas Vignier, Maria Chatzifrangkeskou, Luca Pinton, Hugo Wioland, Thibaut Marais, Mégane Lemaitre, Caroline Le Dour, Cécile Peccate, **Déborah Cardoso**, Alain Schmitt, Wei Wu, Maria-Grazia Biferi, Naïra Naouar, Coline Macquart, Maud Beuvin, Valérie Decostre, Gisèle Bonne, Guillaume Romet-Lemonne Howard J. Worman, Francesco Saverio Tedesco, Antoine Jégou, and Antoine Muchir

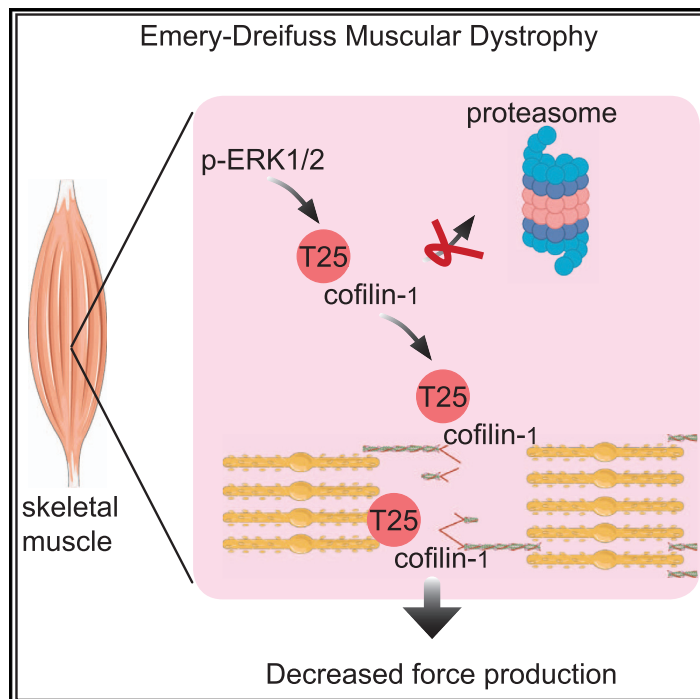
Parue le 24 août 2021 dans le journal Cell Reports

Facteur d'impact de Cell Reports (2020) : 9.4

Cell Reports

The non-muscle ADF/cofilin-1 controls sarcomeric actin filament integrity and force production in striated muscle laminopathies

Graphical abstract



Authors

Nicolas Vignier, Maria Chatzifrangkeskou, Luca Pinton, ..., Francesco Saverio Tedesco, Antoine Jégou, Antoine Muchir

Correspondence

a.muchir@institut-myologie.org

In brief

Extracellular signal-regulated kinase (ERK) 1/2 has been shown to be important for the development of muscular dystrophy. Vignier et al. find that active ERK1/2 catalyzes phosphorylation of cofilin-1 on Thr25 and protects it from proteasomal degradation, which physically disrupts sarcomeric organization and causes loss of muscle force generation.

Highlights

- Phosphorylation of cofilin-1 on Thr25 by p-ERK1/2 protects it from degradation by the UPS
- Phospho(T25)-cofilin-1 localizes on I-bands in sarcomeres
- Phosphorylation of cofilin-1 on Thr25 alters sarcomeric organization
- Phospho(T25)-cofilin-1 alter skeletal muscle force and lead to muscular dystrophy



Vignier et al., 2021, Cell Reports 36, 109601
August 24, 2021 © 2021 The Author(s).
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109601>



Article

The non-muscle ADF/cofilin-1 controls sarcomeric actin filament integrity and force production in striated muscle laminopathies

Nicolas Vignier,^{1,11} Maria Chatzifrangkeskou,^{1,11,12} Luca Pinton,^{2,3} Hugo Wioland,⁴ Thibaut Marais,¹ Mégane Lemaitre,⁵ Caroline Le Dour,¹ Cécile Peccate,¹ Déborah Cardoso,¹ Alain Schmitt,⁶ Wei Wu,^{7,8} Maria-Grazia Biferi,¹ Naira Naouar,¹ Coline Macquart,¹ Maud Beuvin,¹ Valérie Decostre,¹ Gisèle Bonne,¹ Guillaume Romet-Lemonne,⁴ Howard J. Worman,^{7,8} Francesco Saverio Tedesco,^{2,9,10} Antoine Jégou,⁴ and Antoine Muchir^{1,13,*}

¹Sorbonne Université, INSERM, Institut de Myologie, Centre de Recherche en Myologie, 75013 Paris, France

²Department of Cell and Developmental Biology, University College London, London, UK

³Randall Centre for Cell and Molecular Biophysics, King's College London, London, UK

⁴Université de Paris, CNRS, Institut Jacques Monod, 75013 Paris, France

⁵Sorbonne Université, UMS28, Phénotypage du Petit Animal, Paris, France

⁶Université de Paris, INSERM, CNRS, Institut Cochin, 75005 Paris, France

⁷Department of Medicine, Vagelos College of Physicians and Surgeons, Columbia University, New York, NY, USA

⁸Department of Pathology and Cell Biology, Vagelos College of Physicians and Surgeons, Columbia University, New York, NY, USA

⁹Dubowitz Neuromuscular Centre, UCL Great Ormond Street Institute of Child Health and Great Ormond Street Hospital for Children, London, UK

¹⁰The Francis Crick Institute, London, UK

¹¹These authors contributed equally

¹²Present address: Department of Oncology, University of Oxford, Oxford, UK

¹³Lead contact

*Correspondence: a.muchir@institut-myologie.org

<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109601>

SUMMARY

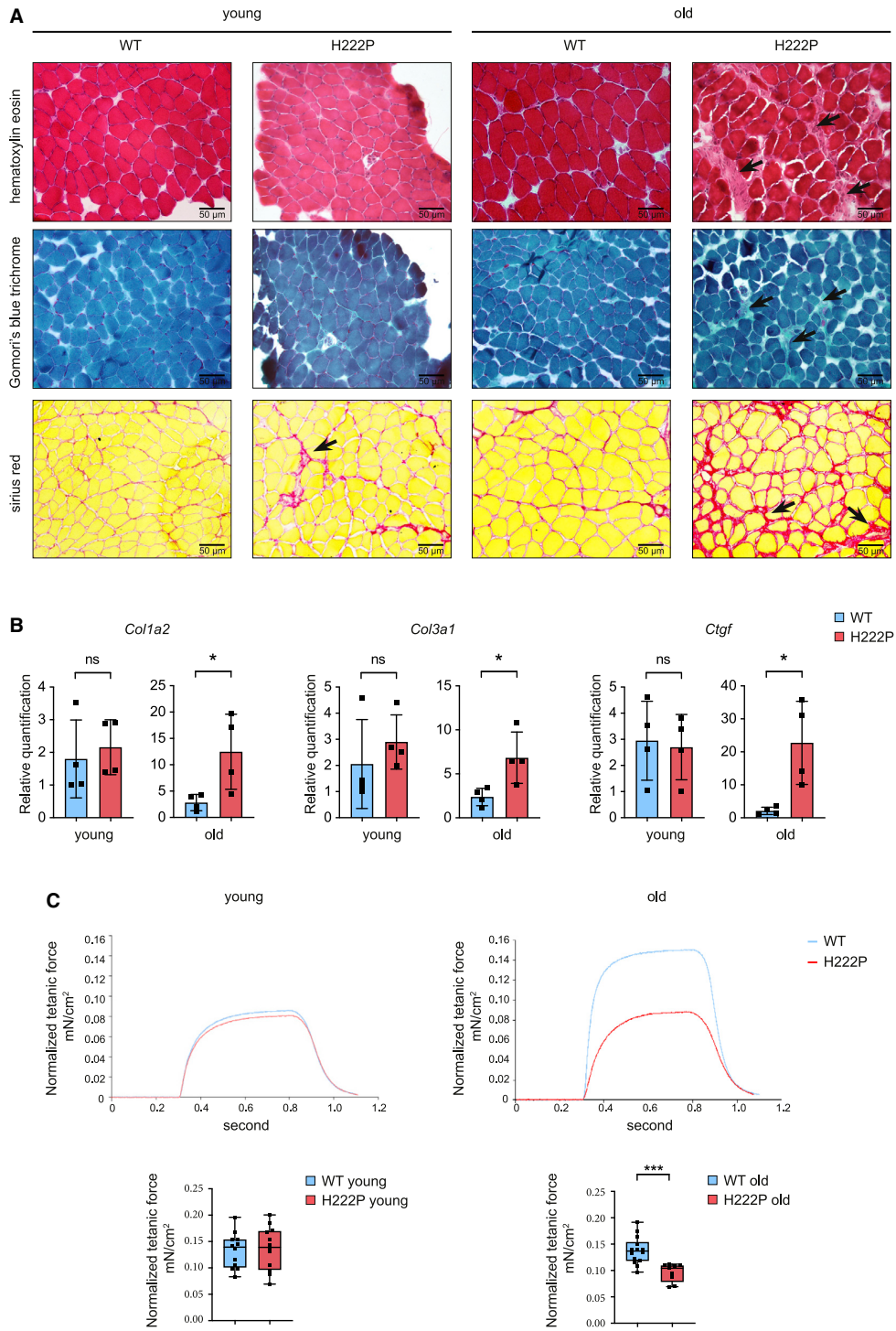
Cofilins are important for the regulation of the actin cytoskeleton, sarcomere organization, and force production. The role of cofilin-1, the non-muscle-specific isoform, in muscle function remains unclear. Mutations in *LMNA* encoding A-type lamins, intermediate filament proteins of the nuclear envelope, cause autosomal Emery-Dreifuss muscular dystrophy (EDMD). Here, we report increased cofilin-1 expression in *LMNA* mutant muscle cells caused by the inability of proteasome degradation, suggesting a protective role by ERK1/2. It is known that phosphorylated ERK1/2 directly binds to and catalyzes phosphorylation of the actin-depolymerizing factor cofilin-1 on Thr25. *In vivo* ectopic expression of cofilin-1, as well as its phosphorylated form on Thr25, impairs sarcomere structure and force generation. These findings present a mechanism that provides insight into the molecular pathogenesis of muscular dystrophies caused by *LMNA* mutations.

INTRODUCTION

LMNA encodes lamin A and lamin C, two components of the nuclear lamina that are essential for nuclear architecture and regulation of chromatin organization (Aebi et al., 1986; Dechat et al., 2008; Lin and Worman, 1993). *LMNA* mutations are responsible for autosomal forms of Emery-Dreifuss muscular dystrophy (EDMD) (Bonne et al., 1999), a disorder characterized by progressive muscle weakness and wasting associated with early contractures and dilated cardiomyopathy (Emery, 1987). *LMNA* mutations also cause limb girdle muscular dystrophy (Muchir et al., 2000), congenital muscular dystrophy (Quijano-Roy et al., 2008), or isolated cardiomyopathy without skeletal muscle involvement (Fatkin et al., 1999), expanding the phenotypic spectrum of striated muscle diseases linked to mutant A-type nuclear lamins.

Each skeletal muscle cell is composed of a repeated array of sarcomeres, the fundamental contractile units. Skeletal muscle cells are highly organized cells and necessary for voluntary movement induced by the somatic nervous system and to maintain posture. The coordinated contraction of all sarcomeres shortens the entire muscle cell and produces mechanical force. Despite the recent advances in deciphering the clinical description of muscular dystrophy caused by *LMNA* mutations (Madej-Pilarczyk, 2018), the molecular mechanisms leading to skeletal muscle damage remain to be determined. Loss of structural function and altered activation of tissue-specific signaling pathways have been proposed to partially explain the striated muscle dysfunction in these diseases (Brull et al., 2018). We have previously shown that the extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2) activity was altered in the affected skeletal muscles expressing disease-causing A-type lamins variants, thus participating in





(legend on next page)

pathogenesis (Muchir et al., 2013). However, insights into the mechanisms bridging abnormal ERK1/2 activation and defective skeletal muscle function are lacking.

The actin cytoskeleton contributes to the functional and structural organization of cells. Actin filaments are also a main component of sarcomeres, which play an active role in the contractile force of muscle. The ADF/cofilin family comprises small actin-binding proteins with key roles in tissue homeostasis and disease. In mammals, three isoforms of the cofilin family have been described: ADF, cofilin-1, and cofilin-2 (Maciver and Hussey, 2002). The functions of each ADF/cofilin are not clearly defined, mostly because many of them may overlap. Cofilin-1 is a protein known to enhance actin filament turnover by severing and promoting dissociation of filamentous actin (F-actin) polymers into globular actin (G-actin) monomers (Bamburg and Bernstein, 2008). However, cofilin-2 was the only isoform reported to control the actin filaments turnover in mature muscle sarcomeres (Kremneva et al., 2014; Vartiainen et al., 2002). Here, we have uncovered a function of ERK1/2 signaling that catalyzes the phosphorylation of the cofilin-1 on Thr25, to protect it from degradation by the ubiquitination-proteasome pathway. This tight regulation of phospho(T25)-cofilin-1 protein levels by ERK1/2 signaling is important for the maintenance of sarcomere structure and force generation, which participate in the development of muscular dystrophy caused by *LMNA* mutations.

RESULTS

Skeletal muscle pathology in soleus from *Lmna*^{p.H222P/H222P} mice

Severe cytoarchitectural abnormalities of skeletal muscles, particularly in soleus muscle, associated with increased connective tissue have been previously observed in *Lmna*^{p.H222P/H222P} mice, a mouse model of muscular dystrophy caused by *LMNA* mutations (Arimura et al., 2005). We confirmed these findings by histological analyses in soleus muscles from young and old *Lmna*^{p.H222P/H222P} mice (Figure 1A). We also showed that the transcript levels of *Col1a2* and *Col3a1* encoding type I and III collagens, and *Ctgf* encoding connective tissue growth factor, were all correlated with the presence of interstitial fibrosis in the soleus muscle from old *Lmna*^{p.H222P/H222P} mice (Figure 1B). We next determined whether these changes in structural organization of soleus muscle could impede force generation. In conjunction with the dystrophic pattern, maximal force production was reduced in soleus muscle from old *Lmna*^{p.H222P/H222P} mice compared with wild-type (WT) mice (Table S1; Figure 1C). These structural and functional abnormalities were not observed in the

fast twitch extensor digitorum longus (EDL) muscle from old *Lmna*^{p.H222P/H222P} mice (Figures S1A and S1B).

Altered skeletal muscle actin dynamics in EDMD

To identify the molecular mechanisms that underlie skeletal muscle alterations, we performed transcriptomic analysis on soleus muscle along the course of the muscular dystrophy in *Lmna*^{p.H222P/H222P} mice. A principal-component analysis (Figure S2A) and a heatmap of unsupervised hierarchical cluster analysis (Figure S2B) performed on all the probes sets showed clear separation between young and old *Lmna*^{p.H222P/H222P} mice and WT mice. We next used a supervised learning method to distinguish probe sets representing genes with significant differences in expression. This analysis identified up and downregulated genes between young and old *Lmna*^{p.H222P/H222P} mice and WT mice and also along the progression of the disease for *Lmna*^{p.H222P/H222P} mice (Figures S2C and S2D; Table S2). These results were validated by reverse transcription quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) (Figure S2E). We then analyzed functional class scoring, which improves sensitivity by statistically evaluating genes in biologically meaningful groups. Alteration of transcripts encoding genes relating to sarcomeric structure and structural organization of the muscle fiber was strongly correlated with the progression of the muscular dystrophy in *Lmna*^{p.H222P/H222P} mice (Figure S2F).

We and others recently reported defective actin dynamics in cardiac muscle of mouse models of EDMD (Antoku et al., 2019; Chatzifrangkeskou et al., 2018; Ho et al., 2013). Therefore, we analyzed the expression of cofilin-1, cofilin-2, Neural Wiskott-Aldrich syndrome protein (N-WASP), actin-related protein 2 (ARP2), and profilin-1, proteins involved in the regulation of actin dynamics in soleus muscle (Figure 2A). We found increased cofilin-1 as well as decreased profilin-1 expression in the soleus muscle of old *Lmna*^{p.H222P/H222P} mice (Figures 2B and 2C). The expression of these proteins was not significantly affected at younger age (Figures S3A and S3B). Importantly, we also observed an activation of cofilin-1 expression in skeletal muscle from a patient with EDMD carrying the p.E358K *LMNA* mutation (Figure 2D). When examined by immunoblotting, the ratio of F-actin to G-actin was significantly lower in soleus muscle from old *Lmna*^{p.H222P/H222P} mice compared with WT mice (Figure 2E). These data indicate an actin filament disassembly in autosomal EDMD.

Activated ERK1/2 signaling affects the stability of cofilin-1

These results raised the question whether the abnormal skeletal muscle activation of ERK1/2 signaling in muscular dystrophy

Figure 1. Abnormal soleus muscle structure and function in *Lmna*^{p.H222P/H222P} mice

(A) Histochemical analysis of soleus from young and old wild-type (WT) and *Lmna*^{p.H222P/H222P} (H222P) mice. Sections of soleus muscles were stained with hematoxylin and eosin, modified Gomori's trichrome, and Sirius red, showing an increase of fibrosis (arrows) in the old *Lmna*^{p.H222P/H222P} (H222P) mice. Scale bar, 50 μ m.

(B) Expression of fibrosis-related genes (*Col1a2*, *Col3a1*, and *Ctgf*) in the soleus from young and old WT (n = 4) and *Lmna*^{p.H222P/H222P} (H222P) (n = 4) mice. *p \leq 0.01. Data are represented as mean \pm SD.

(C) Top: representative curves of tetanic forces of soleus from young and old, WT and *Lmna*^{p.H222P/H222P} (H222P) mice. Bottom: box-and-whisker plots showing median of tetanic forces of soleus from young, WT (n = 12) and *Lmna*^{p.H222P/H222P} (H222P) (n = 12) mice and old, WT (n = 14) and *Lmna*^{p.H222P/H222P} (H222P) (n = 9) mice.

*p \leq 0.01, ***p \leq 0.0001 between old WT and *Lmna*^{p.H222P/H222P} (H222P). Data are represented as mean \pm SD.

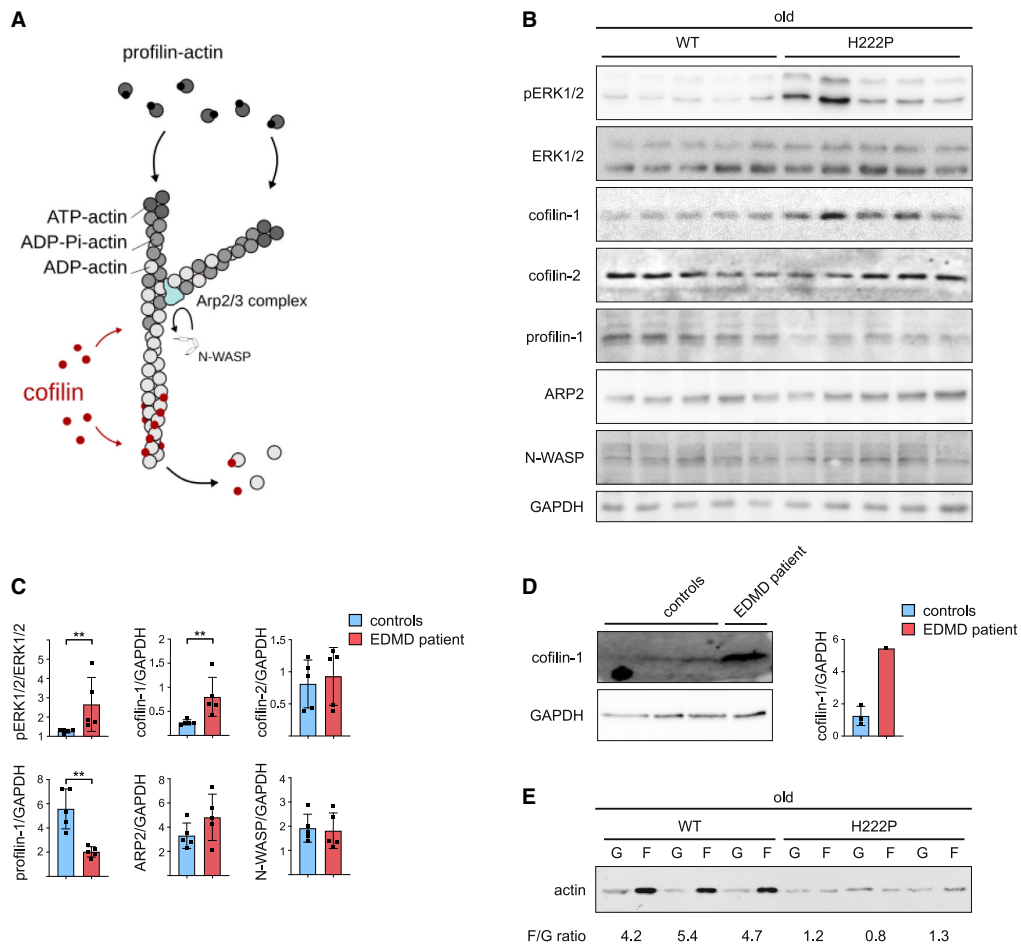


Figure 2. Increased cofilin-1 expression alters actin dynamics in Emery-Dreifuss muscular dystrophy (EDMD)

(A) Schematic representation of actin dynamics mechanisms.

(B) Immunoblots showing pERK1/2, ERK1/2, cofilin-1, profilin-1, ARP2, and N-WASP protein level in soleus from old WT (n = 5) and *Lmna*^{p.H222P/H222P} (H222P) (n = 5) mice. GAPDH is shown as loading control.

(C) Quantification of pERK1/2, ERK1/2, cofilin-1, profilin-1, ARP2, and N-WASP protein expression level in soleus from old WT (n = 5) and *Lmna*^{p.H222P/H222P} (H222P) (n = 5) mice. **p < 0.001 between old WT and *Lmna*^{p.H222P/H222P} (H222P). Data are represented as mean ± SD.

(D) Immunoblots showing cofilin-1 protein level in skeletal muscle from EDMD patient carrying *LMNA* mutation. GAPDH is shown as loading control. Data are represented as mean ± SD.

(E) Immunoblot showing G-actin and F-actin protein levels in soleus from old WT (n = 3) and *Lmna*^{p.H222P/H222P} (H222P) (n = 3) mice.

caused by *LMNA* mutations was responsible for the increased cofilin-1 expression. We used stably transfected C2C12 mouse myoblasts expressing either WT (C2-WT) or the p.H222P lamin A variant (C2-H222P) (Choi et al., 2012), a simple model system where activation of ERK1/2 signaling has been well characterized (Chatzifrangkeskou et al., 2018; Choi et al., 2012; Muchir et al., 2013). We first investigated the levels of proteins involved in actin dynamics. We showed that cofilin-1 expression was increased in C2-H222P myoblasts compared with C2-WT cells (Figure 3A). Pharmacological inhibition of the ERK1/2 cascade with selumetinib, a selective MEK1/2 inhibitor, decreased cofilin-1 expression and increased N-WASP, ARP2, and profilin-1 levels (Figure 3A).

Selumetinib washout experiments on C2-H222P cells suggested that regulation of cofilin-1, N-WASP, ARP2, and profilin-1 expression was related to ERK1/2 activity (Figure 3B). To further validate whether ERK1/2 regulated directly the protein levels of cofilin-1, we transiently transfected C2-WT cells with WT ERK2 or MEK1 constructs. This led to increased cofilin-1 protein levels compared with non-transfected cells (Figure 3C). Conversely, the inhibition of endogenous ERK2 in C2-H222P cells, upon transfection of kinase-dead (ERK2-K52R) or dominant-negative ERK2 (ERK2-T183A/Y185F) mutants constructs, led to decreased cofilin-1 expression compared with non-transfected C2-H222P cells (Figure 3C). Next, we analyzed the effect of ERK1/2 activity on

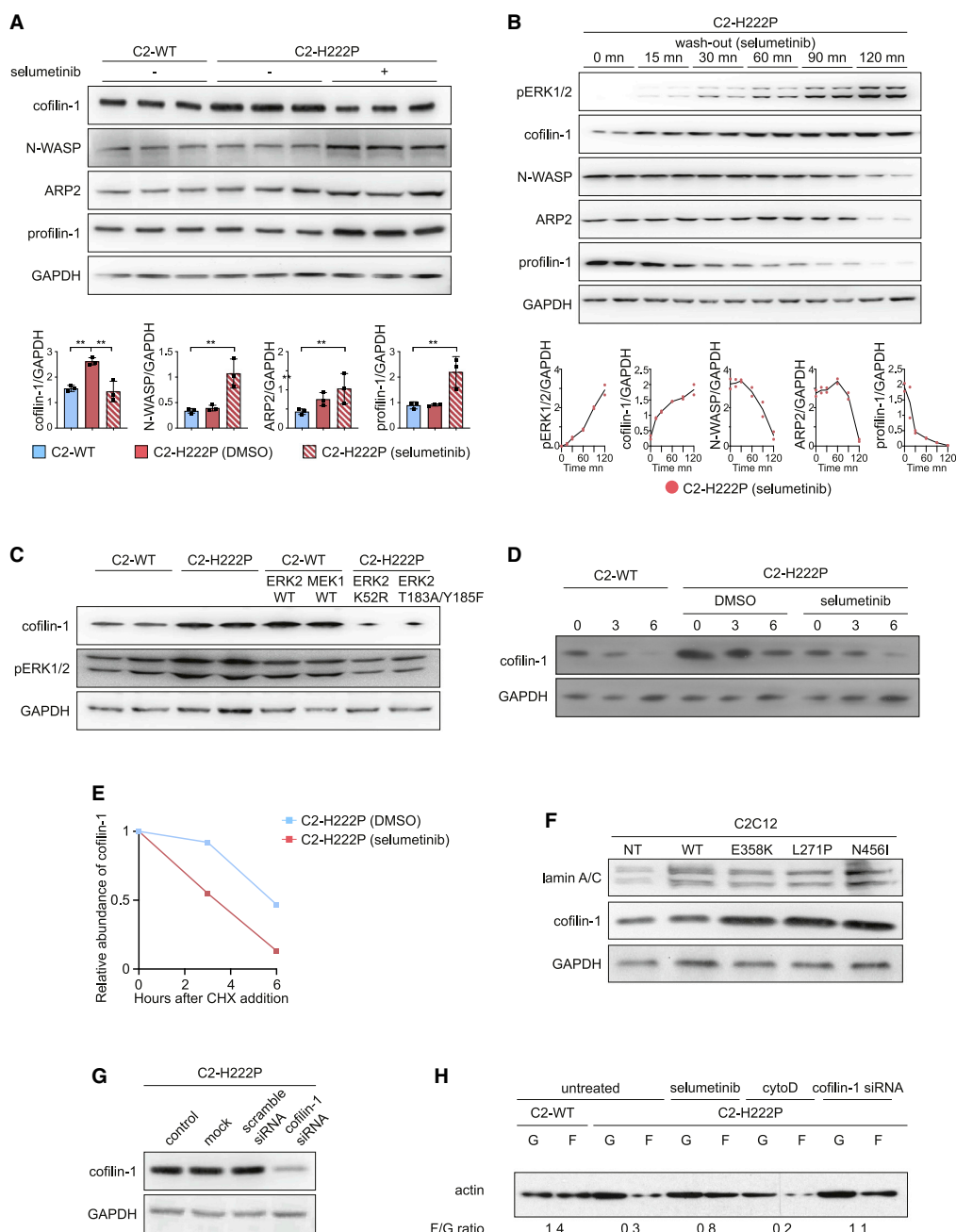


Figure 3. Increased cofilin-1 expression is under the control of ERK1/2 signaling

(A) Representative immunoblots and quantification of cofilin-1, N-WASP, ARP2, and profilin-1 protein expression in C2C12 cells stably expressing WT (C2-WT) ($n = 3$) or p.H222P (C2-H222P) ($n = 3$) lamin A. GAPDH is shown as loading control. C2-H222P cells were either untreated or treated with selumetinib. $**p \leq 0.001$ between C2-WT and C2-H222P \pm selumetinib. Data are represented as mean \pm SD.

(B) Representative immunoblot and quantification of effects of washout of selumetinib on cofilin-1, N-WASP, ARP2 and profilin-1 protein expression level in C2-H222P cells. Data are represented as mean \pm SD.

(C) Representative immunoblot showing effects of transfection with ERK2 and MEK1 constructs on cofilin-1 protein expression in C2-WT and C2-H222P cells. GAPDH is shown as loading control.

(legend continued on next page)

cofilin-1 protein stability in a cycloheximide chase assay (Figures 3D and 3E). Cofilin-1 levels decreased at 6 h after the cycloheximide-mediated inhibition of protein synthesis in C2-H222P cells, indicating that cofilin-1 becomes unstable. We further showed that cofilin-1 protein levels decreased faster after the cycloheximide-mediated inhibition of protein synthesis in C2-H222P cells when the cells were treated with selumetinib. These results suggest that ERK1/2 signaling enhances cofilin-1 protein stability. We then assessed the role of ERK1/2 signaling on cofilin-1 expression *in vivo* using *Lmna*^{p.H222P/H222P} mice lacking Erk1 (Wu et al., 2014). We showed that the soleus muscles from these mice have a reduction of interstitial fibrosis compared with *Lmna*^{p.H222P/H222P} mice (Figure S4A and S4B). The inhibition of ERK1/2 cascade in *Lmna*^{p.H222P/H222P} mice lacking Erk1 led to a decreased cofilin-1 expression (Figures S4C and S4D). These data suggest that phosphorylation of ERK1/2 modulates cofilin-1 protein level. To identify whether other *LMNA* mutations have the same effect on cofilin-1 expression through pERK1/2 activation, we transiently transfected C2C12 cells with plasmids encoding lamin A variants found in EDMD (i.e., E358K, L271P, and N456I), which caused pERK1/2 activation (Figure 3F). The expression of these lamin A variants led to an elevated cofilin-1 protein level. These results suggest that *LMNA* mutations lead to increased cofilin-1 as a result of ERK1/2 hyperactivation. We next showed that depleting cofilin-1 by small interfering RNA (siRNA) in C2-H222P cells (Figure 3G) rescued the actin dynamics, as evidenced by normalization of the F/G-actin ratio compared with control (Figure 3H). This result demonstrates that the increased of cofilin-1 protein level in cells expressing disease-causing lamin A variants is responsible for actin depolymerization.

Activated ERK1/2 signaling prevents cofilin-1 degradation through the proteasome

We next sought to identify the underlying mechanism that regulates cofilin-1 expression in cells expressing pathogenic lamin A variants. The ubiquitin proteasome pathway is responsible for the targeted degradation of proteins, such as cofilin-1 (Goldberg, 2003; Yoo et al., 2010). We thus speculated that pERK1/2 might protect cofilin-1 from proteasomal degradation. To test our hypothesis, we first examined the influence of the proteasome inhibitor MG132 on cofilin-1 expression. MG132 led to increased expression of endogenous cofilin-1 in C2-H222P cells compared with cells treated with selumetinib (Figure 4A). Similarly, treating C2-WT cells with MG132 increased endogenous cofilin-1 expression (Figure 4B). To further validate our hypothesis, we examined potential ubiquitination of cofilin-1 by immunoprecipitation. We showed a decreased ubiquitination of cofilin-1 in C2-H222P cells compared with C2-WT cells, which was prevented upon selumetinib treatment (Figure 4C).

To rule out the possibility that this effect might arise from an impaired function of the proteasome in C2-H222P cells, we examined the proteasome activity in these cells. Protein extracts from C2-WT and C2-H222P cells showed no difference in proteasome activity and treatment of C2-H222P cells with selumetinib had no effect (Figure 4D). These data suggest that ERK1/2 signaling increases cofilin-1 stability by preventing its degradation via the proteasome-ubiquitin pathway. We recently showed that active phosphorylated ERK1/2 catalyzes the phosphorylation of the actin depolymerizing factor cofilin-1 on Thr25 (Chatzifrangkeskou et al., 2018). To test the stability of this phospho(T25)-cofilin-1, we ectopically expressed mCherry-tagged cofilin-1 as well as mCherry-tagged cofilin-1(T25A), a non-phosphorylatable variant, and cofilin-1(T25D), a phosphomimetic variant, in C2-WT cells. While both cofilin-1 WT and cofilin-1(T25D) protein levels were decreased in cells treated with selumetinib compared with untreated cells, the expression of the mutant cofilin-1(T25A) remained unchanged (Figures 4E and 4F). Adding MG132 to the selumetinib treating cells rescued the expression of cofilin-1 variants (Figures 4E and 4F). These results strongly suggest that ERK1/2-mediated (T25)phosphorylation protects cofilin-1 from proteasomal degradation. Given that other types of ERK1/2-dependent phosphorylation of cofilin-1 have been recently identified (Chatzifrangkeskou et al., 2018), it is possible that ERK1/2 signaling could regulate the activity of cofilin-1 through phosphorylation on other residues.

Cofilin-1 controls sarcomere integrity

Given that members of the ADF/cofilin family have been reported to be essential regulators of actin dynamics in sarcomeres (Kremneva et al., 2014), we next assessed the sarcomere structure in skeletal muscles from EDMD. The structure of soleus muscle from old *Lmna*^{p.H222P/H222P} mice exhibited sarcomere disorganization compared with age-matched WT mice (Figures 5A and 5B). Sarcomere disorganization was not observed in soleus muscle from young *Lmna*^{p.H222P/H222P} mice (Figures S5A and S5B). Notably, similar sarcomere abnormalities were present in muscle biopsy specimens from EDMD patients carrying *LMNA* mutations (Figure 5C). This sarcomere disorganization was not observed in the fast-twitch EDL muscle from old *Lmna*^{p.H222P/H222P} mice (Figures S5C and S5D). We showed that these structural abnormalities were reduced in soleus muscle from *Lmna*^{p.H222P/H222P} mice lacking Erk1 (Figure S5E). To further validate this finding, we tested whether sarcomere abnormalities were also present in *LMNA* mutant human myotubes from striated muscle laminopathies. To this aim, we differentiated three human induced pluripotent stem cell (hiPSC) lines from patients with skeletal muscle laminopathies carrying *LMNA* p.K32del, p.L35P, and p.R249W mutations (Steele-Stallard et al., 2018) into skeletal

(D) Cycloheximide chase experiment using C2C12 cells stably expressing WT (C2-WT) or p.H222P (C2-H222P) lamin A, treated or not with selumetinib. Cells were treated with 50 μ M cycloheximide and lysed at the indicated times for western blot analysis using anti-cofilin-1 antibody. GAPDH was used as a loading control. (E) Quantification of cofilin-1 signal intensity normalized to GAPDH content and expressed as the percent change from time zero, which was set at 100%. Data are represented as mean \pm SD.

(F) Representative immunoblots showing effects of transfection with different mutated lamin A constructs on cofilin-1 expression in C2C12 cells.

(G) Representative immunoblot showing the effect of cofilin-1 siRNA on cofilin-1 expression. GAPDH is shown as a loading control.

(H) Representative immunoblot showing the effect of cofilin-1 siRNA on G-actin and F-actin expression in C2-H222P cells. Cytochalasin D (cytoD) induces actin depolymerization.

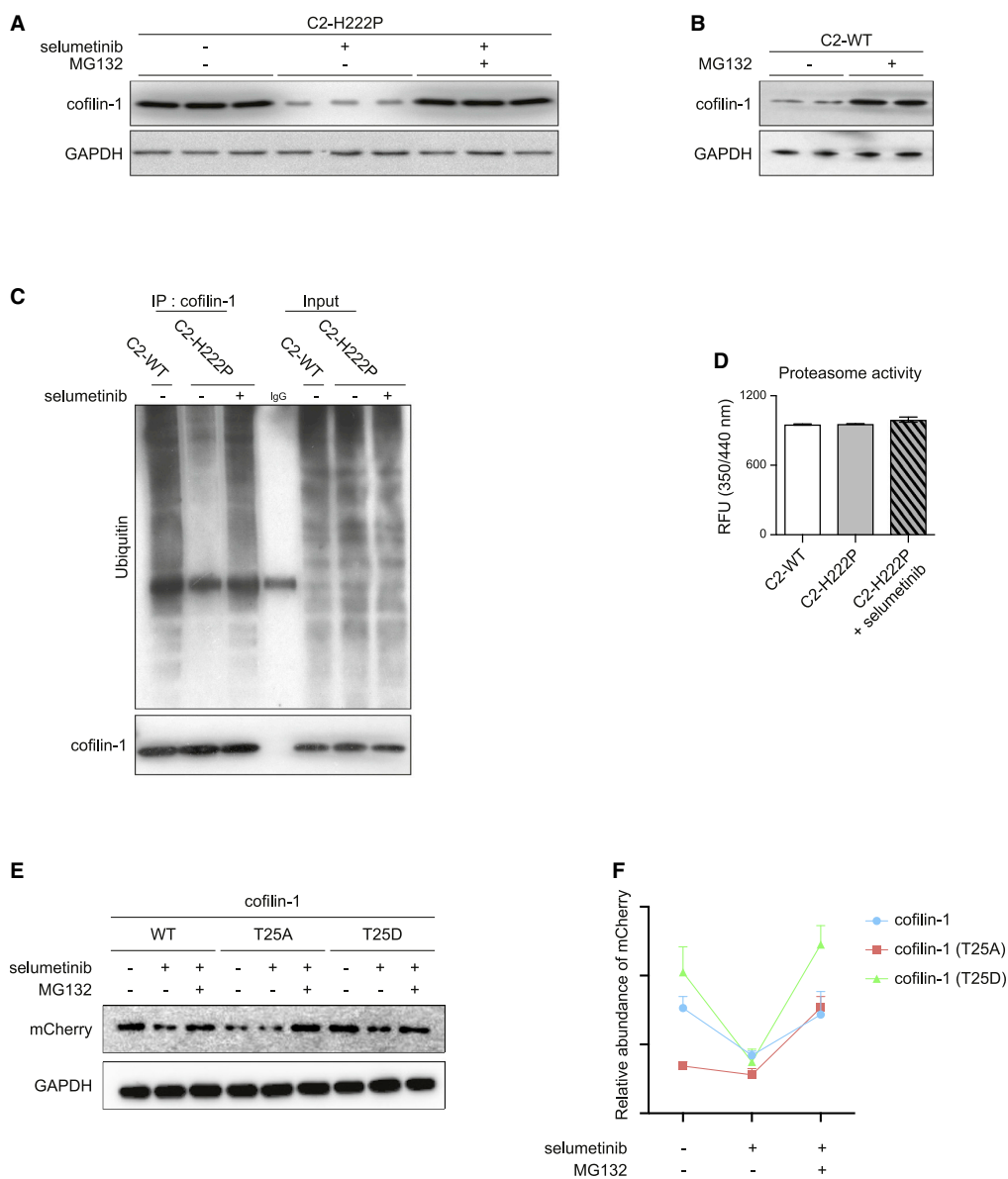


Figure 4. pERK1/2 protects cofilin-1 from degradation by the ubiquitin-proteasome pathway

(A) Immunoblot showing effect of treatment with proteasome inhibitor MG132 on cofilin-1 expression in C2-H222P cells untreated or treated with selumetinib. GAPDH is shown as loading control.

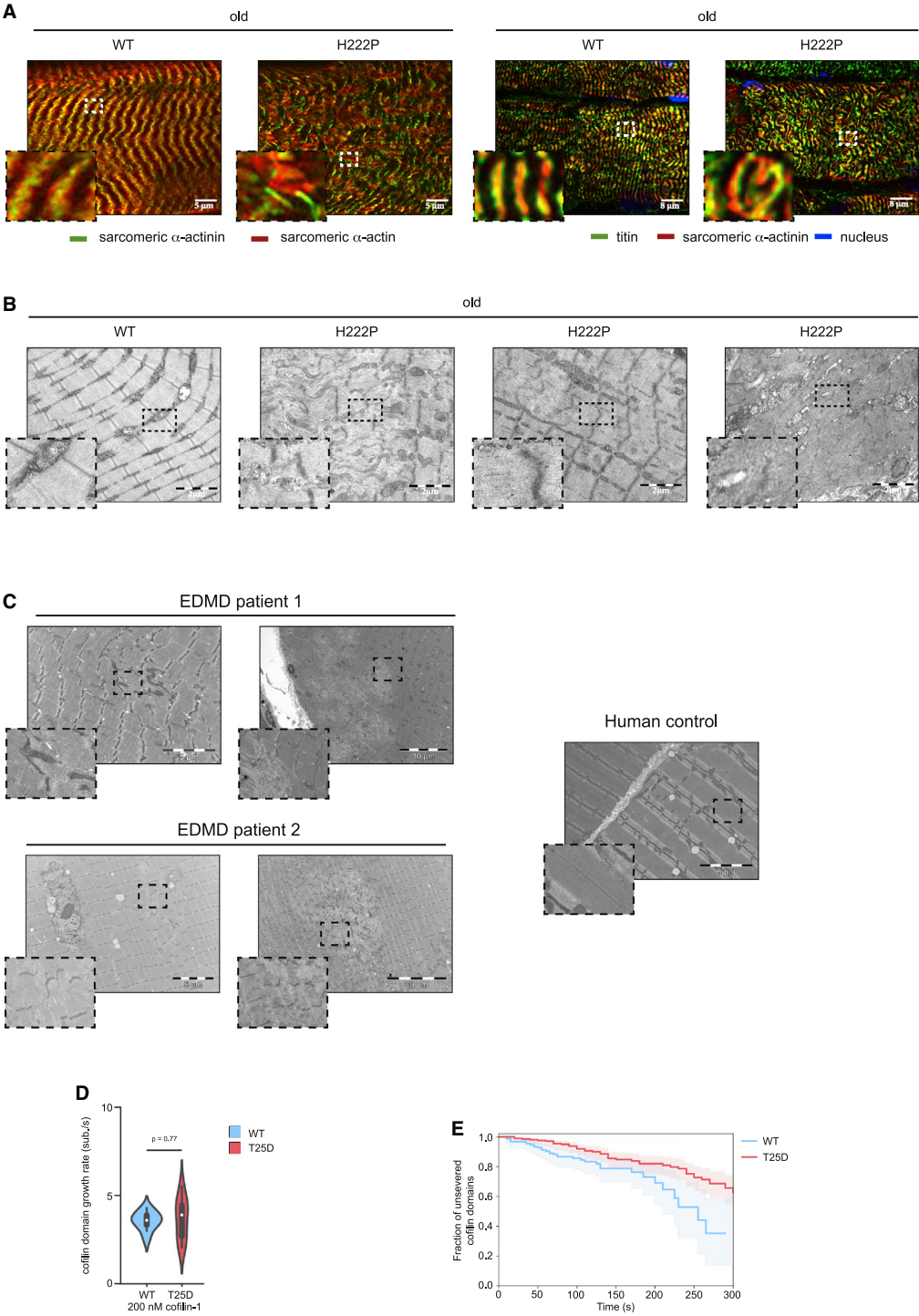
(B) Immunoblot showing effect of treatment with proteasome inhibitor MG132 treatment on cofilin-1 expression in C2-WT cells. GAPDH is shown as loading control.

(C) Immunoprecipitation of cofilin-1 showing ubiquitination levels in C2-WT and C2-H222P cells untreated or treated with selumetinib. Input is shown as loading control.

(D) Proteasome activity in C2-WT and C2-H222P cells untreated or treated with selumetinib. Data are represented as mean \pm SD.

(E) Immunoblot showing effect of selumetinib and MG132 on ectopically expressed mCherry-tagged cofilin-1, cofilin-1(T25A), and cofilin-1(T25D) in C2-WT cells. GAPDH is shown as loading control.

(F) Quantification of mCherry signal intensity normalized to GAPDH content in C2-WT cells treated with the different conditions (n = 3). Data are represented as mean \pm SD.



(legend on next page)

myogenic cells (Maffioletti et al., 2015). Immunofluorescence analyses of sarcomeric proteins suggested that some abnormalities were detectable in the newly formed myotubes (Figure S6), albeit less evident than in the aforementioned EDMD muscle biopsy specimens (Figure 5C).

We then investigated whether the activation of cofilin-1 expression could contribute to myofilament disorganization. Transduction of WT differentiated primary mouse myofibers (Figure S7A) with an adeno-associated virus (AAV) encoding cofilin-1 increased the G-actin pool (Figure S7B) and led to altered myofibrillar organization compared with the untransfected condition (Figure S7C). We next hypothesized that phosphorylation of Thr25 on cofilin-1 has detrimental effects on striated muscle cells. Transduction with an adenovirus encoding cofilin-1(T25D) in WT differentiated primary mouse myofibers induced depolymerization of actin (Figure S7B) and altered myofibrillar organization (Figures S7C and S7D). However, transduction with an adeno-associated virus encoding cofilin-1(T25A) had no effect on both cellular actin dynamics (Figure S7B) and myofibrillar organization (Figures S7C and S7D). To study the role of cofilin-1 as well as its Thr25 phosphorylated form in muscle sarcomeres, we examined its localization in soleus muscle (Figures S8A and S8B). Immunofluorescence microscopy revealed regular striated pattern of cofilin-1 as well as its Thr25 phosphorylated form in WT mice (Figures S8A and S8B). In old *Lmna*^{p.H222P/H222P} mice, we observed a punctuated pattern alongside regular striated pattern (Figures S8A and S8B, arrows), reminiscent of sarcomere disorganization (Figures 5A and 5B). The co-localization with titin (antibody against PVEK domain) demonstrated that cofilin-1 as well as its Thr25 phosphorylated form localizes at I-bands in sarcomeres. These findings suggest that sarcomere disorganization arises from expression of phospho(T25)-cofilin-1, which participates in the development of muscular dystrophy caused by *LMNA* mutations.

To validate that cofilin-1 phosphorylated on Thr25 alters the sarcomeric organization, we assessed its molecular activity *in vitro* (Wioland et al., 2017), by exposing actin filaments to the phosphomimetic eGFP-cofilin1(T25D). We observed that cofilin-1(T25D) disassembles filaments, creating cofilin domains that grow similarly to WT (Figure 5D) although filaments severing at cofilin domain boundaries was slightly less efficient than WT cofilin-1 (Figure 5E). Overall, our *in vitro* results show that cofilin-1(T25D) is active and able to disassemble actin filament, as opposed to phosphomimetic cofilin-1(S3D) (Elam et al., 2017; Wioland et al., 2017). We thus conclude that phospho(T25)-cofilin-1 can alter actin dynamics and sarcomeric organization in striated muscle cells.

Cofilin-1 is involved in muscle force generation *in vivo*

Force in striated muscles is produced by actin thin filaments sliding past the myosin thick filaments, resulting in sarcomere contraction (Huxley and Hanson, 1954; Huxley and Niedergerke, 1958). Given that elevated expression of cofilin-1 phosphorylated on Thr25 severely impacts the sarcomere structure, we hypothesized that it may affect the force production in skeletal muscles. We injected AAV expressing cofilin-1 into the soleus of 3-month-old WT mice (Figure 6A). Three months after injection, the expression of cofilin-1, but not cofilin-2, was increased in the injected soleus (Figure 6B), muscle actin dynamics was altered (Figure 6C), and myofilaments were disorganized (Figure S9). Tetanic force was significantly decreased in soleus muscles from cofilin-1-injected WT mice compared with non-treated WT mice (Figure 6D). Similar observations were made when soleus muscles were injected with AAVs expressing cofilin-1(T25D), but not AAVs expressing cofilin-1(T25A) (Figures 6B–6D). Fibrosis in WT soleus transduced with AAVs expressing cofilin-1(T25A) and cofilin-1(T25D) was unchanged compared with non-injected soleus (Figures 6E and 6F), demonstrating that fibrosis is not the reason for the reduced force production. In conclusion, we propose that cofilin-1 phosphorylated on Thr25 can impair skeletal muscle contractile properties by modulating sarcomeric actin dynamics.

DISCUSSION

We have unraveled a protective role of phosphorylated ERK1/2 for cofilin-1 by blunting its degradation through the ubiquitination-proteasome pathway. This participates in the development of muscular dystrophy (Figure 7). Non-muscle cofilin-1 is a small actin-binding protein that accelerates actin turnover by disassembling actin filaments. In striated muscle cells, actin and several scaffolding and regulatory proteins are arranged into contractile myofilament (Ono, 2010). Actin-binding proteins are important for actin dynamics, which contribute to controlling myofilament structure and organization. This mechanism is regulated by mechanical forces (Fukuda et al., 2019; Skwarek-Maruszewska et al., 2009). The two ADF/cofilin isoforms, cofilin-1 and cofilin-2, are expressed in striated muscles, cofilin-2 being the dominant isoform (Ono et al., 1994; Vartiainen et al., 2002). We demonstrated that the non-muscle cofilin-1, as well as its Thr25 phosphorylated form, localizes on I-bands in sarcomeres and is an essential regulator of proper actin dynamics and sarcomeric organization. Abnormalities of actin dynamics hamper myofilament organization, alter skeletal muscle force, and ultimately lead to muscular

Figure 5. Alteration of sarcomere organization in EDMD

- (A) Left: immunofluorescence micrographs of sarcomeric α -actinin (green) and sarcomeric α -actin (red) labeled soleus muscle from old, WT and *Lmna*^{p.H222P/H222P} (H222P) mice. Scale bar, 5 μ m. Right: immunofluorescence micrographs of titin (green) and sarcomeric α -actinin (red) labeled soleus muscle from old, WT and *Lmna*^{p.H222P/H222P} (H222P) mice. Scale bar, 8 μ m.
- (B) Electron microscopy showing sarcomeric disorganization in soleus muscles from old WT and *Lmna*^{p.H222P/H222P} (H222P) mice. Scale bar, 2 μ m.
- (C) Left: electron microscopy showing sarcomeric disorganization in striated muscles from EDMD patients carrying *LMNA* mutations. Right: striated muscle from human control. Scale bar, 10 μ m.
- (D) Growth rate of single cofilin domains for eGFP-cofilin-1 WT and T25D, observed on individual actin filaments *in vitro*, in the presence of 200 nM cofilin-1 ($n = 10$ filaments for each condition). The distributions are plotted as violin plots, with the white dot representing its median. The statistical test was a t test for the means of two independent samples with unequal variance.
- (E) Single eGFP-cofilin-1 WT or T25D domain severing rate. Time $t = 0$ is defined for every domain as the frame on which they nucleate. $n = 152$ and 202 cofilin domains for eGFP-cofilin-1 WT and T25D, respectively.

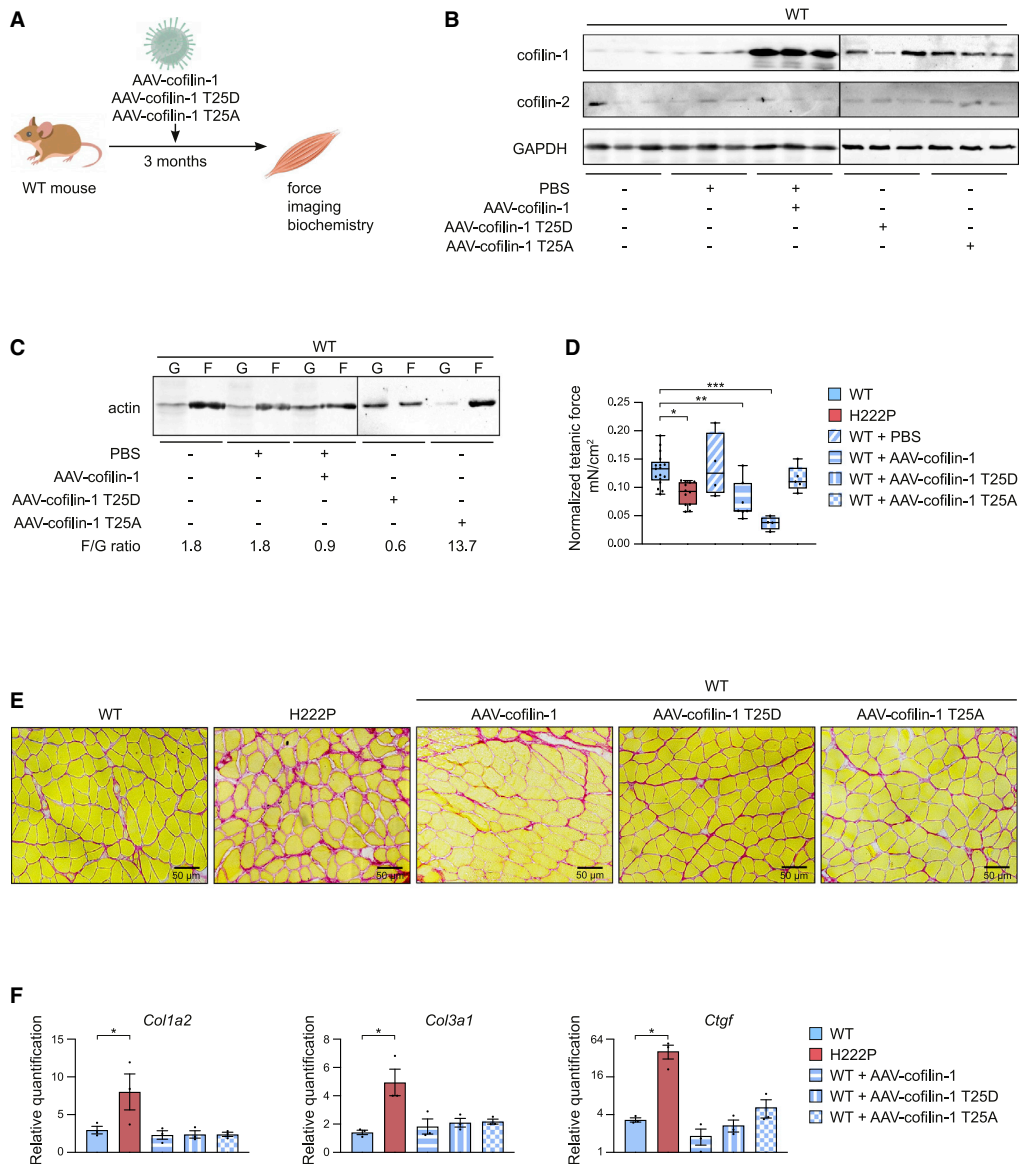


Figure 6. Cofilin-1 is involved in the muscle force generation *in vivo*

(A) Schematic representation of the experimental procedure followed for transduction with AAV vectors expressing cofilin-1 constructs of soleus muscles in young WT mice.

(B) Representative immunoblot of cofilin-1 protein levels in soleus from WT mice non-injected or injected with either PBS or AAV vector expressing cofilin-1 constructs. GAPDH is shown as loading control.

(C) Representative immunoblot showing the effect of AAV expressing cofilin-1 construct on G-actin and F-actin expression in the soleus from WT mice non-injected or injected with either PBS or AAV vector expressing cofilin-1 constructs.

(D) Tetanic force of soleus from WT (n = 17), *Lmna*^{P.H222P/H222P} (H222P) (n = 9) and WT mice injected with either PBS (n = 4) or AAV vectors expressing cofilin-1 (n = 7), cofilin-1(T25A) (n = 3) or cofilin-1(T25D) (n = 3). *p ≤ 0.01 between WT and *Lmna*^{P.H222P/H222P} (H222P), **p ≤ 0.001 between WT and WT AAV vectors expressing cofilin-1, ***p ≤ 0.0001 between WT and WT AAV vectors expressing cofilin-1(T25D). Data are represented as mean ± SD.

(E) Sirius Red staining of cross sections of soleus muscles from WT mice non-injected or injected with either PBS or AAV vector expressing cofilin-1 constructs. Section of soleus muscle from *Lmna*^{P.H222P/H222P} (H222P) is shown as control. Scale bar, 50 μm.

(F) Expression of fibrosis-related genes (*Col1a2*, *Col3a1*, and *Ctgf*) in the soleus from WT mice non-injected or injected with either PBS or AAV vector expressing cofilin-1 constructs. Quantification of soleus muscle from *Lmna*^{P.H222P/H222P} (H222P) is shown as control. *p ≤ 0.01 between WT and *Lmna*^{P.H222P/H222P} (H222P). Data are represented as mean ± SD.

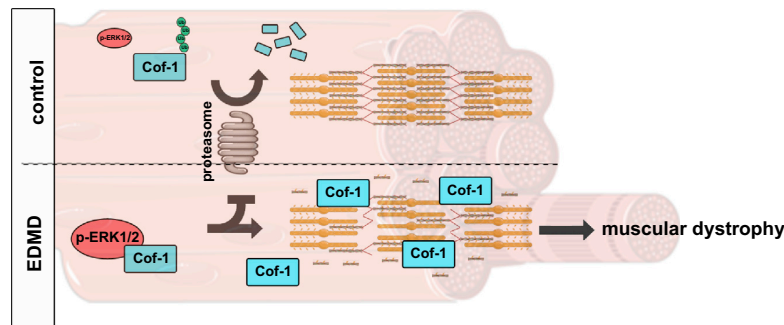


Figure 7. Schematic representation of the mechanism of pERK1/2-mediated protection of cofilin-1 from proteasome degradation and its consequences on sarcomeric actin depolymerization in striated muscle diseases caused by *LMNA* mutations

dystrophy. In support of these findings, missense mutations in UNC-60B, the *C. elegans* homolog of ADF/cofilin, lead to defects in actin organization in the muscles (Ono et al., 1999).

Our work brings insight into a role played by actin regulators in muscular dystrophies. *LMOD3*, the gene encoding leimodin-3, a sarcomeric actin nucleator (Chereau et al., 2008), was identified as a cause of nemaline myopathies (Yuen et al., 2014). Similarly, mutated cofilin-2 has been previously shown to cause nemaline myopathy (Agrawal et al., 2012). Histopathological analysis of the skeletal muscle from cofilin-2 null mice revealed extensive myofilament disruptions (Agrawal et al., 2007). To date, cofilin-2 was the only known member of the ADF/cofilin family involved in the disassembly of actin skeletal muscle sarcomeres (Agrawal et al., 2012). Cofilin-1 and cofilin-2, both expressed in skeletal muscle cells, contribute to the dynamic turnover of F-actin (Kremneva et al., 2014). We recently showed that only cofilin-1 was phosphorylated on Thr25 by pERK1/2 and leads to disruption of myofilaments in the presence of *LMNA* mutations (Chatzifrangkeskou et al., 2018). Zebrafish cofilin-1 mutants also exhibit myofilament disruption associated with alteration of muscle contraction (Fukuda et al., 2019). Together, our results show that the ERK1/2-cofilin-1 axis regulates myofilament organization in skeletal muscles.

A higher level of ERK1/2 activity in skeletal muscle prevents the proteasome-dependent degradation of cofilin-1 protein, increasing its accumulation. Our results suggest that this escape from the proteasome machinery may be the consequence of increased phosphorylation of the cofilin-1 by ERK1/2 (Chatzifrangkeskou et al., 2018). Similarly, the stability of the FRA-1 is dependent on its phosphorylation status, which is regulated by ERK1/2 signaling (Casalino et al., 2003). In addition the proteasome-dependent degradation of c-FOS can be inhibited by ERK1/2 (Musti et al., 1997). Furthermore, loss of KLHL40 results in a severe lethal form of nemaline myopathy associated with destabilization of actin (Garg et al., 2014). KLHL40 binds to and stabilizes leimodin-3 by blocking its ubiquitination. In addition, loss of KLHL40 was associated with absence of leimodin-3 protein in skeletal muscle. It is now generally accepted that misregulation of the two major proteolytic systems, ubiquitin-proteasome and autophagy, can lead to abnormal protein accumulation that might be involved in the pathophysiology of several disorders, including muscular dystrophies (Sandri et al., 2013). In line with this, a previous report has suggested the involvement of autophagy in cardiomyopathy in autosomal EDMD (Choi et al., 2012). To develop therapeutic strategies for muscular dystrophy caused by *LMNA* mutations, it will

findings provide clues of a balance between protein stabilization and degradation, which are causing myopathies.

Our results indicate that cofilin-1-mediated alteration of actin dynamics is a cellular consequence of ERK1/2 activation in skeletal muscle cells. Specifically, we have shown that activation of ERK1/2 signaling protects cofilin-1 from proteasome-dependent degradation. We further demonstrated that muscular dystrophy is associated with muscle cofilin-1 activation, which generated sarcomere disruption and alteration of force production, suggesting that cofilin-1 overexpression is a pathological event in muscular dystrophy caused by *LMNA* mutations. Enhanced activation of cofilin-1 in skeletal muscles from a mouse model of EDMD and from patients with this disease supports our conclusion that this mechanism contributes to the pathology. Similar pathogenic mechanism of cofilin-1-mediated modulation of sarcomeric actin dynamics may play a role in other muscular dystrophies, in which there appears to be abnormal activation of ERK1/2 signaling (Barton, 2006; Griffin et al., 2005; Kumar et al., 2004, 2011; Lang et al., 2004; Muchir et al., 2007; Smythe and Forwood, 2012). These findings suggest that therapeutic approaches that could correct impaired actin dynamics may ameliorate muscular dystrophy caused by *LMNA* mutations.

STAR★METHODS

Detailed methods are provided in the online version of this paper and include the following:

- KEY RESOURCES TABLE
- RESOURCE AVAILABILITY
 - Lead contact
 - Materials availability
 - Data and code availability
- EXPERIMENTAL MODEL AND SUBJECT DETAILS
 - Human skeletal muscles
 - Animals
 - Animal skeletal muscles
 - Cell lines
 - Mouse primary cells
- METHOD DETAILS
 - Adeno-associated virus (AAV) delivery
 - RNA isolation and reverse-transcription qPCR
 - Microarray processing
 - Plasmids

- Cofilin-1 binding and severing activity
- Protein extraction and immunoblotting
- F/G actin ratio measurements
- Proteasome activity assay
- Immunoprecipitation
- Histological analyses
- Immunofluorescence microscopy
- Electron microscopy
- Contractile properties of isolated muscle *in vitro*

● **QUANTIFICATION AND STATISTICAL ANALYSIS**

SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental information can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109601>.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank P. Zammit for helpful discussions. This work was supported by the Association Française contre les Myopathies, Cure CMD, and Fundacion Andres Marcio (A.M.). This work was also supported by the European Research Council, BBSRC, MDUK, and the National Institute for Health Research (F.S.T.).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conceptualization, A.M.; investigation, N.V., M.C., C.L.D., C.P., D.C., W.W., H.J.W., C.M., and A.M.; transcriptomic analysis, N.V., N.N., and A.M.; AAV production and injection, T.M. and M.-G.B.; force measurement, M.L. and V.D.; electron microscopy, A.S. and M.B.; iPSC experiments: L.P. and F.S.T.; single-filament experiment: H.W., G.R.-L., and A.J.; writing – original draft, A.M.; writing – review & editing, all authors; funding acquisition, A.M. and F.S.T.; supervision, A.M.

DECLARATION OF INTERESTS

H.J.W. is on the scientific advisory board and owns equity in AlloMek Therapeutics. The remaining authors declare no competing interests.

Received: March 23, 2020

Revised: June 9, 2021

Accepted: August 4, 2021

Published: August 24, 2021

REFERENCES

- Aebi, U., Cohn, J., Buhle, L., and Gerace, L. (1986). The nuclear lamina is a meshwork of intermediate-type filaments. *Nature* 323, 560–564.
- Agbulut, O., Vignaud, A., Hourde, C., Mouisel, E., Fougereousse, F., Butler-Browne, G.S., and Ferry, A. (2009). Slow myosin heavy chain expression in the absence of muscle activity. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 296, C205–C214.
- Agrawal, P.B., Greenleaf, R.S., Tomczak, K.K., Lehtokari, V.-L., Wallgren-Petersson, C., Wallefeld, W., Laing, N.G., Darras, B.T., Maciver, S.K., Dormitzer, P.R., and Beggs, A.H. (2007). Nemaline myopathy with minicores caused by mutation of the CFL2 gene encoding the skeletal muscle actin-binding protein, cofilin-2. *Am. J. Hum. Genet.* 80, 162–167.
- Agrawal, P.B., Joshi, M., Savic, T., Chen, Z., and Beggs, A.H. (2012). Normal myofibrillar development followed by progressive sarcomeric disruption with actin accumulations in a mouse Cfl2 knockout demonstrates requirement of cofilin-2 for muscle maintenance. *Hum. Mol. Genet.* 21, 2341–2356.
- Antoku, S., Wu, W., Joseph, L.C., Morrow, J.P., Worman, H.J., and Gunderson, G.G. (2019). ERK1/2 phosphorylation of FHOD connects signaling and nuclear positioning alternations in cardiac laminopathy. *Dev. Cell* 51, 602–616.e12.
- Arimura, T., Helbling-Leclerc, A., Massart, C., Varnous, S., Niel, F., Lacène, E., Fromes, Y., Toussaint, M., Mura, A.-M., Keller, D.I., et al. (2005). Mouse model carrying H222P-Lmna mutation develops muscular dystrophy and dilated cardiomyopathy similar to human striated muscle laminopathies. *Hum. Mol. Genet.* 14, 155–169.
- Bamburg, J.R., and Bernstein, B.W. (2008). ADF/cofilin. *Curr. Biol.* 18, R273–R275.
- Barton, E.R. (2006). Impact of sarcoglycan complex on mechanical signal transduction in murine skeletal muscle. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 290, C411–C419.
- Biferi, M.G., Cohen-Tannoudji, M., Cappelletto, A., Giroux, B., Roda, M., As-tord, S., Marais, T., Bos, C., Voit, T., Ferry, A., and Barkats, M. (2017). A New AAV10-U7-mediated gene therapy prolongs survival and restores function in an ALS mouse model. *Mol. Ther.* 25, 2038–2052.
- Bonne, G., Di Barletta, M.R., Varnous, S., Bécane, H.-M., Hammouda, E.-H., Merlini, L., Muntoni, F., Greenberg, C.R., Gary, F., Urtizberea, J.-A., et al. (1999). Mutations in the gene encoding lamin A/C cause autosomal dominant Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Nat. Genet.* 21, 285–288.
- Brull, A., Morales Rodriguez, B., Bonne, G., Muchir, A., and Bertrand, A.T. (2018). The pathogenesis and therapies of striated muscle laminopathies. *Front. Physiol.* 9, 1533.
- Casalino, L., De Cesare, D., and Verde, P. (2003). Accumulation of Fra-1 in ras-transformed cells depends on both transcriptional autoregulation and MEK-dependent posttranslational stabilization. *Mol. Cell. Biol.* 23, 4401–4415.
- Chatzifrangkeskou, M., Yadin, D., Marais, T., Chardonnet, S., Cohen-Tannoudji, M., Mougnot, N., Schmitt, A., Crasto, S., Di Pasquale, E., Macquart, C., et al. (2018). Cofilin-1 phosphorylation catalyzed by ERK1/2 alters cardiac actin dynamics in dilated cardiomyopathy caused by lamin A/C gene mutation. *Hum. Mol. Genet.* 27, 3060–3078.
- Chereau, D., Boczkowska, M., Skwarek-Maruszewska, A., Fujiwara, I., Hayes, D.B., Rebowski, G., Lappalainen, P., Pollard, T.D., and Dominguez, R. (2008). Leiomodin is an actin filament nucleator in muscle cells. *Science* 320, 239–243.
- Choi, J.C., Muchir, A., Wu, W., Iwata, S., Homma, S., Morrow, J.P., and Worman, H.J. (2012). Temsirolimus activates autophagy and ameliorates cardiomyopathy caused by lamin A/C gene mutation. *Sci. Transl. Med.* 4, 144ra102.
- Dechat, T., Pfliegerhaer, K., Sengupta, K., Shimi, T., Shumaker, D.K., Solimando, L., and Goldman, R.D. (2008). Nuclear lamins: major factors in the structural organization and function of the nucleus and chromatin. *Genes Dev.* 22, 832–853.
- Elam, W.A., Cao, W., Kang, H., Huehn, A., Hocky, G.M., Prochniewicz, E., Schramm, A.C., Negrón, K., Garcia, J., Bonello, T.T., et al. (2017). Phosphomimetic S3D cofilin binds but only weakly severs actin filaments. *J. Biol. Chem.* 292, 19565–19579.
- Emery, A.E. (1987). X-linked muscular dystrophy with early contractures and cardiomyopathy (Emery-Dreifuss type). *Clin. Genet.* 32, 360–367.
- Fatkin, D., MacRae, C., Sasaki, T., Wolff, M.R., Porcu, M., Frenneaux, M., Atherton, J., Vidaillet, H.J., Jr., Spudich, S., De Girolami, U., et al. (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.
- Fukuda, R., Gunawan, F., Ramadass, R., Beisaw, A., Konzer, A., Mullapudi, S.T., Gentile, A., Maischein, H.-M., Graumann, J., and Stainier, D.Y.R. (2019). Mechanical forces regulate cardiomyocyte myofilament maturation via the VCL-SSH1-CFL axis. *Dev. Cell* 51, 62–77.e5.
- Garg, A., O'Rourke, J., Long, C., Doering, J., Ravenscroft, G., Bezprozvanaya, S., Nelson, B.R., Beetz, N., Li, L., Chen, S., et al. (2014). KLHL40 deficiency destabilizes thin filament proteins and promotes nemaline myopathy. *J. Clin. Invest.* 124, 3529–3539.
- Goldberg, A.L. (2003). Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins. *Nature* 426, 895–899.
- Griffin, M.A., Feng, H., Tewari, M., Acosta, P., Kawana, M., Sweeney, H.L., and Discher, D.E. (2005). gamma-Sarcoglycan deficiency increases cell

- contractility, apoptosis and MAPK pathway activation but does not affect adhesion. *J. Cell Sci.* 118, 1405–1416.
- Ho, C.Y., Jaalouk, D.E., Vartiainen, M.K., and Lammerding, J. (2013). Lamin A/C and emerin regulate MKL1-SRF activity by modulating actin dynamics. *Nature* 497, 507–511.
- Huang, W., Sherman, B.T., and Lempicki, R.A. (2009). Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat. Protoc.* 4, 44–57.
- Huxley, H., and Hanson, J. (1954). Changes in the cross-striations of muscle during contraction and stretch and their structural interpretation. *Nature* 173, 973–976.
- Huxley, A.F., and Niedergerke, R. (1958). Measurement of the striations of isolated muscle fibres with the interference microscope. *J. Physiol.* 144, 403–425.
- Irizarry, R.A., Hobbs, B., Collin, F., Beazer-Barclay, Y.D., Antonellis, K.J., Scherf, U., and Speed, T.P. (2003). Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics* 4, 249–264.
- Kremneva, E., Makkonen, M.H., Skwarek-Maruszewska, A., Gateva, G., Michelot, A., Dominguez, R., and Lappalainen, P. (2014). Cofilin-2 controls actin filament length in muscle sarcomeres. *Dev. Cell* 31, 215–226.
- Kumar, A., Khandelwal, N., Malya, R., Reid, M.B., and Boriek, A.M. (2004). Loss of dystrophin causes aberrant mechanotransduction in skeletal muscle fibers. *FASEB J.* 18, 102–113.
- Kumar, A., Yamauchi, J., Girgenrath, T., and Girgenrath, M. (2011). Muscle-specific expression of insulin-like growth factor 1 improves outcome in Lama2Dy-w mice, a model for congenital muscular dystrophy type 1A. *Hum. Mol. Genet.* 20, 2333–2343.
- Lang, J.M., Esser, K.A., and Dupont-Versteegden, E.E. (2004). Altered activity of signaling pathways in diaphragm and tibialis anterior muscle of dystrophic mice. *Exp. Biol. Med.* (Maywood) 229, 503–511.
- Lee, H.K., Braynen, W., Keshav, K., and Pavlidis, P. (2005). ErmineJ: tool for functional analysis of gene expression data sets. *BMC Bioinformatics* 6, 269.
- Lin, F., and Worman, H.J. (1993). Structural organization of the human gene encoding nuclear lamin A and nuclear lamin C. *J. Biol. Chem.* 268, 16321–16326.
- Maciver, S.K., and Hussey, P.J. (2002). The ADF/cofilin family: actin-remodeling proteins. *Genome Biol.* 3, reviews3007.
- Madej-Pilarczyk, A. (2018). Clinical aspects of Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Nucleus* 9, 268–274.
- Maffioletti, S.M., Gerli, M.F.M., Ragazzi, M., Dastidar, S., Benedetti, S., Loperfido, M., VandenDriessche, T., Chuah, M.K., and Tedesco, F.S. (2015). Efficient derivation and inducible differentiation of expandable skeletal myogenic cells from human ES and patient-specific iPS cells. *Nat. Protoc.* 10, 941–958.
- Mendias, C.L., Marcin, J.E., Calerion, D.R., and Faulkner, J.A. (2006). Contractile properties of EDL and soleus muscles of myostatin-deficient mice. *J. Appl. Physiol.* (1985) 101, 898–905.
- Moussel, E., Relizani, K., Mille-Hamard, L., Denis, R., Hourd e, C., Agbulut, O., Patel, K., Arandel, L., Morales-Gonzalez, S., Vignaud, A., et al. (2014). Myostatin is a key mediator between energy metabolism and endurance capacity of skeletal muscle. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 307, R444–R454.
- Muchir, A., Bonne, G., van der Kooi, A.J., van Meegen, M., Baas, F., Bolhuis, P.A., 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., Decostre, V., Herron, A.J., Arimura, T., Bonne, G., and Worman, H.J. (2007). Activation of MAPK pathways links LMNA mutations to cardiomyopathy in Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *J. Clin. Invest.* 117, 1282–1293.
- Muchir, A., Kim, Y.J., Reilly, S.A., Wu, W., Choi, J.C., and Worman, H.J. (2013). Inhibition of extracellular signal-regulated kinase 1/2 signaling has beneficial effects on skeletal muscle in a mouse model of Emery-Dreifuss muscular dystrophy caused by lamin A/C gene mutation. *Skelet. Muscle* 3, 17.
- Musti, A.M., Treier, M., and Bohmann, D. (1997). Reduced ubiquitin-dependent degradation of c-Jun after phosphorylation by MAP kinases. *Science* 275, 400–402.
- Ono, S. (2010). Dynamic regulation of sarcomeric actin filaments in striated muscle. *Cytoskeleton (Hoboken)* 67, 677–692.
- Ono, S., Minami, N., Abe, H., and Obinata, T. (1994). Characterization of a novel cofilin isoform that is predominantly expressed in mammalian skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* 269, 15280–15286.
- Ono, S., Baillie, D.L., and Benian, G.M. (1999). UNC-60B, an ADF/cofilin family protein, is required for proper assembly of actin into myofibrils in *Caenorhabditis elegans* body wall muscle. *J. Cell Biol.* 145, 491–502.
- Ostlund, C., Bonne, G., Schwartz, K., and Worman, H.J. (2001). Properties of lamin A mutants found in Emery-Dreifuss muscular dystrophy, cardiomyopathy and Dunnigan-type partial lipodystrophy. *J. Cell Sci.* 114, 4435–4445.
- Pfaffl, M.W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29, e45, e45.
- Quijano-Roy, S., Mbieleu, B., Bönnemann, C.G., Jeannot, P.-Y., Colomer, J., Clarke, N.F., Cuisset, J.-M., Roper, H., De Meirleir, L., D’Amico, A., et al. (2008). De novo LMNA mutations cause a new form of congenital muscular dystrophy. *Ann. Neurol.* 64, 177–186.
- Reiner, A., Yekutieli, D., and Benjamini, Y. (2003). Identifying differentially expressed genes using false discovery rate controlling procedures. *Bioinformatics* 19, 368–375.
- Ritchie, M.E., Phipson, B., Wu, D., Hu, Y., Law, C.W., Shi, W., and Smyth, G.K. (2015). limma powers differential expression analyses for RNA-seq and microarray studies. *Nucleic Acids Res.* 43, e47.
- Sandri, M., Coletto, L., Grumati, P., and Bonaldo, P. (2013). Misregulation of autophagy and protein degradation systems in myopathies and muscular dystrophies. *J. Cell Sci.* 126, 5325–5333.
- Schneider, C.A., Rasband, W.S., and Eliceiri, K.W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods* 9, 671–675.
- Skwarek-Maruszewska, A., Hotulainen, P., Mattila, P.K., and Lappalainen, P. (2009). Contractility-dependent actin dynamics in cardiomyocyte sarcomeres. *J. Cell Sci.* 122, 2119–2126.
- Smythe, G.M., and Forwood, J.K. (2012). Altered mitogen-activated protein kinase signaling in dystrophic (mdx) muscle. *Muscle Nerve* 46, 374–383.
- Steele-Stallard, H.B., Pinton, L., Sarcar, S., Ozdemir, T., Maffioletti, S.M., Zammit, P.S., and Tedesco, F.S. (2018). Modeling Skeletal Muscle Laminopathies Using Human Induced Pluripotent Stem Cells Carrying Pathogenic LMNA Mutations. *Front. Physiol.* 9, 1332.
- Vartiainen, M.K., Mustonen, T., Mattila, P.K., Ojala, P.J., Thesleff, I., Partanen, J., and Lappalainen, P. (2002). The three mouse actin-depolymerizing factor/cofilins evolved to fulfill cell-type-specific requirements for actin dynamics. *Mol. Biol. Cell* 13, 183–194.
- Vignier, N., Mougnot, N., Bonne, G., and Muchir, A. (2019). Effect of genetic background on the cardiac phenotype in a mouse model of Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 519, 100664.
- Wioland, H., Guichard, B., Senju, Y., Myram, S., Lappalainen, P., Jégou, A., and Romet-Lemonne, G. (2017). ADF/Cofilin accelerates actin dynamics by severing filaments and promoting their depolymerization at both ends. *Curr. Biol.* 27, 1956–1967.e7.
- Wu, W., Iwata, S., Homma, S., Worman, H.J., and Muchir, A. (2014). Depletion of extracellular signal-regulated kinase 1 in mice with cardiomyopathy caused by lamin A/C gene mutation partially prevents pathology before isoenzyme activation. *Hum. Mol. Genet.* 23, 1–11.
- Yoo, Y., Ho, H.J., Wang, C., and Guan, J.-L. (2010). Tyrosine phosphorylation of cofilin at Y68 by v-Src leads to its degradation through ubiquitin-proteasome pathway. *Oncogene* 29, 263–272.
- Yuen, M., Sandaradura, S.A., Dowling, J.J., Kostyukova, A.S., Moroz, N., Quinlan, K.G., Lehtokari, V.-L., Ravenscroft, G., Todd, E.J., Ceyhan-Birsoy, O., et al. (2014). Leiomodlin-3 dysfunction results in thin filament disorganization and nemaline myopathy. *J. Clin. Invest.* 124, 4693–4708.

RÉSUMÉ

Introduction | La progéria de Hutchinson-Gilford (HGPS) est une maladie génétique rare, qui mime les caractéristiques moléculaires et cliniques du vieillissement. C'est une maladie autosomique dominante sporadique causée dans la majorité des cas par une substitution *de novo* dans le gène *LMNA*, codant les lamines nucléaires de type A. Cette mutation crée un site donneur d'épissage cryptique, conduisant à l'expression d'une lamine A mutée appelée "progérine". Parmi toutes les caractéristiques cliniques, les atteintes du système cardiovasculaire sont la principale cause du décès prématuré des patients vers l'âge de 14 ans. Malgré sa grande importance, l'étude de la pathologie artérielle a été extrêmement limitée, principalement en raison de la faible incidence des syndromes progéroïdes.

Hypothèse | Les cellules musculaires lisses vasculaires (VSMC) sont importantes pour le maintien de l'intégrité de l'aorte. Il est connu que l'abondance et la fonctionnalité des VSMCs diminuent avec le vieillissement dans les modèles animaux de syndromes progéroïdes. L'objectif de cette thèse a été d'étudier les mécanismes par lesquels la progérine conduit à une perte massive de VSMCs.

Résultats | En utilisant l'aorte d'un modèle murin de HGPS, les souris *Lmna*^{G609G/G609G}, j'ai montré une augmentation de la mort cellulaire des VSMCs associée à un défaut de réparation des dommages à l'ADN. La poly(ADP-Ribosyl)ation (PARylation) est une modification post-traductionnelle centrale des protéines impliquée dans la détection et la réparation des dommages à l'ADN. Mes résultats démontrent pour la première fois qu'une augmentation de PARylation se produit dans les VSMCs de souris *Lmna*^{G609G/G609G}. L'augmentation de la PARylation est associée à une diminution du nicotinamide adénine dinucléotide (NAD⁺) qui est un régulateur critique du métabolisme. Le traitement de souris *Lmna*^{G609G/+} avec un inhibiteur de la PARylation permet de restaurer les niveaux de NAD⁺ dans les VSMCs et d'améliorer la pathologie vasculaire.

Conclusion | Dans l'ensemble, ces travaux de thèse soutiennent l'hypothèse selon laquelle la PARylation peut être impliquée dans les altérations génomiques qui provoquent la perte de VSMCs chez les patients atteints de HGPS et suggèrent une nouvelle approche thérapeutique pour l'implication cardiovasculaire dans les syndromes progéroïdes et le vieillissement en général.

ABSTRACT

Introduction | Hutchinson-Gilford progeria syndrome (HGPS) is an extremely rare genetic disorder associated with clinical and molecular features of premature aging. Children with HGPS appear asymptomatic at birth but within a year begin to display the effects of accelerated aging. HGPS is a sporadic autosomal dominant disease caused in nearly all cases by a *de novo* single-base substitution of *LMNA*, encoding nuclear A-type lamins. The *LMNA* mutation creates a cryptic splice donor site, resulting in a lamin A mutant called "progerin", which remains farnesylated. Among all of the clinical features associated with premature aging, the cardiovascular disease is the cause of death in almost all patients. Despite its great importance, investigation of the arterial pathology has been extremely limited mainly due to the low incidence of progeroid syndromes.

Thesis hypothesis | Vascular smooth muscle cells (VSMC) are important for maintaining aortic integrity. It is known that the abundance and functionality of VSMC decline with aging in animal models of progeroid syndromes. The main project was to study the mechanisms of how progerin leads to massive VSMC loss.

Results | Using aorta tissue from a mouse model of HGPS, *Lmna*^{G609G/G609G} mice, we showed an increase of VSMCs death associated with an inability to correctly repair DNA damages. Poly(ADP-Ribosyl)ation (PARylation) is now recognized as a central post-translational protein modification that coordinates the building of repair complexes at damage sites with the timely controlled dissociation of the repair factors. Our results demonstrate for the first time that aberrant PARylation occurs in VSMCs of premature aging mouse model. Increased PARylation in VSMCs from *Lmna*^{G609G/G609G} mice were associated with a decrease in nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺), which is a critical regulator of metabolism and thus, contributes to the pathogenesis. Treatment of *Lmna*^{G609G/+} mice with a PARylation inhibitor restores NAD⁺ levels in VSMCs and improves vascular pathology.

Conclusion | Taking together, these thesis works support our hypothesis that PARylation can be involved in genomic alterations, which causes VSMC loss in patients with HGPS and suggest a novel approach towards therapeutics for cardiovascular involvement in progeroid syndromes and aging in general.