miR-9 : la sentinelle des neurones dans la progéria

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

Lamine A, progéria et vieillissement prématuré

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

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

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

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

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

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

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

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

xnissan@istem.fr

Apport des cellules iPS à la modélisation de la progéria

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Conclusions

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

Figure 3. Identification du rôle de miR-9 dans la progéria. Représentation schématique du rôle de miR-9 dans la régulation de l'expression de la lamine A au niveau de fibroblastes ou de neurones dérivés de cellules iPS progéria. Dans des fibroblastes d'individus contrôles, la lamine A participe à un grand nombre de fonctions nucléaires dont la régulation de l'expression génique ou encore la réparation de l'ADN, et joue un rôle clé dans le maintien de la structure de la *lamina* nucléaire. Dans des fibroblastes progéria, le défaut de maturation de la lamine A conduit à de nombreux dysfonctionnements cellulaires se traduisant phénotypiquement par une forme anormale de l'enveloppe nucléaire comme en témoigne la photo de noyaux marqués par un anticorps anti-lamine A/C. En revanche, dans les neurones progéria (cellules Tuj1 positives), nos travaux démontrent que miR-9 inhibe l'expression de la lamine A, permettant ainsi de les protéger d'un vieillissement prématuré.

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

miR-9: the sentinel of neurons in progeria

REMERCIEMENTS

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

LIENS D'INTÉRÊT

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

RÉFÉRENCES

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

TIRÉS À PART
X. Nissan