

THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE PARIS. DIDEROT (Paris7)

Spécialité : Génomes, Epigénomes et Destin Cellulaire

Ecole Doctorale Bio Sorbonne Paris Cité

Présentée par

Alice BARATEAU

Effets pléiotropes de la lamine A mutée en un site responsable de dystrophie musculaire congénitale : recherche translationnelle, de la clinique aux modèles cellulaires et animaux.

Soutenue le 26 octobre 2016 devant le jury composé de :

Jonathan Weitzman	Président du jury
Gisèle Bonne	Rapporteur
Susana Quijano-Roy	Rapporteur
Athanassia Sotiropoulos	Examinatrice
Alexandre Méjat	Examineur
Brigitte Buendia	Directrice de thèse



Except where otherwise noted, this work is licensed under <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/>

Effets pléiotropes de la lamine A mutée en un site responsable de dystrophie musculaire congénitale : recherche translationnelle, de la clinique aux modèles cellulaires et animaux.

Des centaines de mutations du gène *LMNA* codant les lamines A/C, protéines nucléaires de la famille des filaments intermédiaires, causent des pathologies. Pour ma thèse, j'ai étudié la mutation *LMNA* p.R388P, nouvellement identifiée comme responsable de dystrophie musculaire congénitale (L-CMD) associée à une lipodystrophie. Mes objectifs étaient de caractériser les propriétés des lamines mutées et leur impact dans des cellules et dans un muscle squelettique.

Résultats : 1) La culture *ex vivo* de fibroblastes de peau de la patiente a révélé leur entrée prématurée en sénescence. 2) Dans des modèles de cellules immortalisées, la lamine A mutante surexprimée, qui s'accumule exclusivement dans le nucléoplasme et est anormalement soluble a modifié les propriétés de ses partenaires LAP2 α et émerine, augmenté le nombre de gènes liés par les lamines A, diminué la compaction de la chromatine et induit des dysmorphies nucléaires. Le traitement des cellules avec des inhibiteurs d'histones acétyltransférases ou désacétylases n'a pas restauré la forme des noyaux. 3) Dans le muscle tibial antérieur de souris injecté avec des virus adéno-associés codant les lamines A mutantes, le nombre de fibres oxydatives de type IIA est diminué et l'expression de quelques gènes est modifiée.

Conclusion : Nous avons montré que les lamines A R388P altèrent la structure du noyau, l'intégrité de l'enveloppe nucléaire et l'organisation/expression du génome, avec des conséquences sur le typage des fibres de muscle squelettique. De par ses effets pléiotropes, la lamine A mutante apparaît particulièrement toxique, en accord avec la sévérité de la pathologie observée chez la patiente.

Mots clés : Lamine A, dystrophie musculaire congénitale, dysmorphie nucléaire, organisation de la chromatine, modèle cellulaire, modèle animal

Pleiotropic effects of a mutant lamin A responsible for congenital muscular dystrophy : a translational study, from the clinical case to cellular and animal models.

Hundreds of mutations in the *LMNA* gene coding lamins A/C, nuclear intermediate filament proteins, cause several diseases. For my thesis, I studied the p.R388P *LMNA* mutation, newly identified as responsible for congenital muscular dystrophy (L-CMD) associated with lipodystrophy. My goals were to determine the properties of the mutant lamin A and its impact in cells and a skeletal muscle.

Results: 1) *Ex vivo* culture of patient skin fibroblasts revealed their premature entry into senescence. 2) In immortalised cell lines, the overexpression of the mutant lamin A, which accumulates exclusively in the nucleoplasm and is abnormally soluble, modified the properties of two partners, LAP2 α and emerin, increased the amount of genes bound by lamin A, decreased the compaction of chromatin and induced nuclear dysmorphies. Treatment of cells with histone acetyltransferase or deacetylase inhibitors did not rescue nuclear shape. 3) In mouse tibialis anterior muscle injected with adeno-associated virus coding for mutant lamin A, the number of oxidative type IIA myofibres was decreased and expression of few genes modified.

Conclusion: We showed that R388P lamins A alter the structure of nuclei, nuclear envelope integrity and the organisation/expression of the genome, with consequences on skeletal muscle fibre typing. Because of its pleiotropic effects, the mutant lamin A appears particularly toxic, in agreement with the severity of the patient's disease.

Keywords: Lamin A, congenital muscular dystrophy, nuclear dysmorphism, chromatin organization, cellular model, animal model

Remerciements

Dans un premier temps je voudrais remercier les membres du jury, Jonathan Weitzman, Gisèle Bonne, Susana Quijano-Roy, Athanassia Sotiropoulos et Alexandre Méjat, qui ont accepté de consacrer du temps à la lecture et au jugement de ce travail.

Je voudrais également remercier Jean-Marie Dupret pour m'avoir accueillie au sein du laboratoire de biologie fonctionnelle et adaptative pendant ces trois années.

Merci Patrick, c'est grâce à ta proposition de rejoindre ton master que j'ai ensuite pu faire mon stage dans ton laboratoire et continuer cette belle aventure en thèse. Merci à toi également Ana, qui arrivée en cours de route a su apporter un œil nouveau sur mon projet.

Un grand merci à Brigitte, pour avoir été la directrice qu'il me fallait, toujours disponible, ouverte à la discussion, critique quand cela était nécessaire, vous m'avez appris la rigueur que je pense nécessaire pour continuer une carrière scientifique. Vous vous êtes également toujours souciée de mon bien être et je vous en suis reconnaissante.

Merci Nathalie pour tout ce que tu as été pour moi professionnellement et personnellement. Il ne fait aucun doute que sans toi je n'aurais pas pu réaliser toutes les expériences de ce projet, que mes trajets pour venir au labo auraient été bien plus mornes et que je n'aurais pas un appartement à Athis ! J'ai eu énormément de chance de t'avoir comme collègue et amie.

Merci à toi Fany, pour avoir toujours été là pour moi que ce soit pour discuter de mon projet ou de nos vies. A arriver pile quand j'ai commencé ma thèse et à partir en même temps que moi, tu me donnes l'impression d'un ange gardien qui veillait sur moi au quotidien.

Merci à tous les membres passés ou présents du labo, je ne pourrais pas dire que j'ai aimé ma thèse si ce n'était pas grâce à vous qui faites mon quotidien et qui m'apportez tellement. L'équipe desmine : Alain, Bertrand, Coralie, Eli, Eva, Fany, Florence, Pierre, Onnik, Sabrina et Solène, compagnons de filaments intermédiaires avec qui on s'est lancé sur la complexité du modèle animal conjointement. L'équipe d'Ana : Anne, Corinne, Isabelle, Laurianne, Maryline et Swati, nouveaux voisins de bureau avec qui on a appris à s'ouvrir à de nouvelles thématiques. Mais aussi Véronique qui repasse souvent nous donner des nouvelles. Sans oublier les stagiaires qui sont restés plus ou moins longtemps mais ont tous contribué à de bons moments dans le labo. Et enfin les indispensables : Chantal et Tina, sans qui nous ne pourrions tout simplement pas travailler. Vous avez tous été plus que disponibles dès que j'avais besoin de quelque chose et j'ai été ravie de partager vos joies et galères de labo.

Merci également aux membres de BFA de manière plus générale, je pense notamment à Blandine avec qui on a passé de longs et bons moments au FACS, David (Plumo se porte bien), Florent pour tes conseils sur l'extraction d'ARN, Françoise et tous les autres.

Merci également à mes collaborateurs extérieurs au laboratoire, Corinne, Nolwenn, Fabien, Erwan et Philippe. Ce fut un plaisir de travailler avec vous, et j'espère que nos futurs projets permettront de nouvelles collaborations.

Merci à tous mes amis, ceux de longue date et ceux que j'ai découvert plus récemment, vous m'avez toujours encouragée et ce même si je n'ai pas été très présente au quotidien pour vous. Une pensée pour toi Emilie qui aura contribué à ce travail le temps d'une journée et à toi Mary qui en plus d'avoir sauvé le labo un dimanche matin de lendemain de soirée m'as toujours proposé ton aide.

Merci à toute ma famille, la bande des 8 joyeux lurons. Les parents, Lorène, Roman, Guillaume, Flo et Kerwan. Une pensée toute particulière pour toi Guillaume aujourd'hui, mon bof, mon grand frère de cœur, le père de mon Tit Chou, mon témoin, mon premier maître de stage, mon modèle (eh oui la liste est longue), tu as toujours cru en moi et j'espère continuer à te rendre fier. Une pensée également pour vous Papa, Maman, pour avoir été des parents si géniaux, vous m'avez toujours soutenue et c'est bien évidemment grâce à vous que j'ai pu faire ce que je voulais et donc cette thèse.

Merci à toi Flo pour tout, tout simplement. Tu m'as toujours soutenue que ce soit pour mes études, ma thèse ou mes projets d'après thèse, même si c'était au détriment de temps passé ensemble. Tu es le plus merveilleux des maris et c'est grâce à toi que je suis si épanouie aujourd'hui.

Table des matières

Remerciements	3
Table des matières	7
Chapitre 1 Les lamines	13
I. Les filaments intermédiaires.....	14
II. Gènes codant les lamines de type A et de type B.....	18
III. Phylogénie des lamines	19
IV. La structure des lamines et leur assemblage en polymères	20
V. Expression des lamines.....	24
VI. Modifications post-traductionnelles et dynamique des lamines.....	25
Chapitre 2 Les partenaires des lamines.....	33
I. Partenaires des lamines de type A à l'enveloppe nucléaire	33
II. Les partenaires nucléoplasmiques des lamines.....	36
III. Les lamines lient la chromatine et l'ADN.....	39
Chapitre 3 Les divers rôles des lamines de type A au sein de la cellule...43	
I. Soutien mécanique du noyau	43
II. Organisation du génome	43
III. Régulation de l'expression de gènes via la liaison des lamines à différents facteurs	44
IV. Organisation de l'enveloppe nucléaire.....	44
V. Organisation et connexion avec le cytosquelette.	45
VI. Transduction du signal.....	45
VII. Positionnement du noyau	49
VIII. Réparation de l'ADN	50
Chapitre 4 Les laminopathies.....	53
I. Laminopathies touchant le muscle strié.....	54
II. Laminopathies touchant les tissus adipeux	64
III. Laminopathies touchant les nerfs périphériques	66
IV. Laminopathies touchant de multiples systèmes dans le cas de vieillissement prématuré	68
Chapitre 5 Présentation du projet de recherche et de ses objectifs.....	75
I. Contexte général à l'origine du projet de thèse	75
II. Axes du projet de recherche.....	75
Chapitre 6 Présentation du cas clinique de la patiente HER Lo	79

I. Dystrophie musculaire congénitale	79
II. Lipodystrophie	79
III. Atteinte respiratoire	80
IV. Atteinte cardiaque.....	80
V. Identification de la mutation du gène <i>LMNA</i>	80
Chapitre 7 Les lamines A/C R388P et leur impact dans des fibroblastes de peau de la patiente	83
I. Dans une sous-population de fibroblastes de la patiente, le réseau de lamina est désorganisé.....	83
II. Localisation <i>in situ</i> de différentes protéines associées à l'enveloppe nucléaire et à la chromatine, dans le contexte L-CMD.....	86
III. Les fibroblastes de la patiente HER Lo sont sénescents prématurément.....	90
Chapitre 8 Impact de la mutation R388P de la lamine A dans le modèle cellulaire humain des cellules HeLa	95
I. Génération d'outils pour étudier l'expression ectopique des lamines A sauvages et mutées	95
II. Comment estimer l'impact de la mutation lamine A R388P au sein des cellules ?.....	96
III. Propriétés de la lamine A R388P dans les cellules HeLa.....	97
IV. Impact des lamines A R388P sur l'expression et la localisation de partenaires.....	100
V. Expression/localisation de SREBP1c et interaction avec les lamines A.....	103
VI. Impact des protéines FLAG-LA R388P sur la morphologie des noyaux et sur l'état de la chromatine.....	107
VII. Impact de la mutation R388P sur la capacité des lamines A à lier et organiser le génome en 3D.....	110
Chapitre 9 Impact de la lamine A mutée R388P dans un modèle cellulaire de myoblastes murins (C2C12)	121
I. La mutation R388P empêche l'intégration de la lamine A au sein du réseau de lamina dans les myoblastes.....	121
II. Impact de la lamine A mutée R388P sur des partenaires des lamines A/C.....	124
III. La mutation R388P de la lamine A et son impact sur l'état de la chromatine	130
IV. Caractérisation des dysmorphies nucléaires dues aux lamines A R388P.....	133
V. La lamine A mutée R388P et la différenciation myogénique	143
Chapitre 10 Impact de la lamine A mutée R388P dans le modèle animal de souris	153
I. Défaut de localisation subnucléaire de la protéine FLAG-LA R388P dans les fibres musculaires	153
II. Caractéristiques générales des muscles transduits.....	154
III. Inflammation et régénération des muscles exprimant les lamines A WT et R388P suite à l'injection des AAV	156

IV. Analyse transcriptomique visant à déterminer des voies de signalisation éventuellement dérégulées par l'expression de lamine A R388P	159
V. Changement de typage des fibres de muscles exprimant les lamines A R388P	163
VI. Force musculaire	166
Bilan général des expériences.....	167
Chapitre 11 Discussion.....	173
I. Importance de la conservation de l'arginine 388 des lamines A/C d'un point de vue clinique.....	173
II. Les fibroblastes de la patiente présentent des phénotypes préalablement associés à des laminopathies	174
III. Les lamines A R388P ne s'assemblent pas en polymères.....	174
IV. Impact de la lamine A mutée R388P sur des partenaires des lamines A/C.....	177
V. La lamine A mutée R388P modifie l'organisation de la chromatine	177
VI. Les lamines A R388P sont responsables de dysmorphies nucléaires.....	179
VII. Les lamines A R388P induisent un changement de typage des fibres musculaires du tibial antérieur de souris.....	181
Conclusion et Perspectives.....	187
I. Avantages de l'étude de différents modèles.....	187
II. Résultats principaux.....	187
III. Perspectives	188
Matériels et méthodes	193
IV. Identification de la nouvelle mutation hétérozygote p.R388P du gène <i>LMNA</i>	193
V. Etudes cellulaires	193
VI. Expérimentation animale	198
VII. Liste des amorces d'ARN	202
VIII. Liste des anticorps	203
IX. Analyses statistiques.....	204
Références.....	205
Annexes	227
Annexe 1 : In Situ Detection of Interactions between Nuclear Envelope Proteins and Partners.....	229
Annexe 2 : A novel lamin A mutant responsible for congenital muscular dystrophy causes several abnormalities of the cell nucleus.	241
Annexe 3 : Integrative 3D genome modeling reveals implications of lamin A mutations on genome architecture.....	265

Chapitre 1

Les lamine

Chapitre 1 Les lamines

L'existence de la lamina nucléaire a été mise en évidence par microscopie électronique en 1956 par Pappas dans des amibes (Pappas 1956) mais c'est seulement en 1966 que Donald W. Fawcett, professeur d'anatomie, décrit une nouvelle structure nucléaire dans des cellules de vertébrés. Les cellules eucaryotes, délimitées par leur membrane plasmique, se composent de deux compartiments, le noyau, qui contient le génome, et le cytoplasme composé du cytosol et des organites cytoplasmiques. Le noyau et le cytoplasme sont séparés par l'enveloppe nucléaire, une double membrane lipidique constituée d'une membrane extérieure, la *outer nuclear membrane* ou ONM, et d'une membrane intérieure, la *inner nuclear membrane* ou INM. Les pores nucléaires, localisés au sein de l'enveloppe nucléaire, permettent les échanges contrôlés entre ces deux compartiments. Les analyses ultrastructurales de Donald W. Fawcett ont mis en évidence un liseré sombre entre la membrane nucléaire interne et la chromatine condensée (Figure 1), une structure qu'il appela *fibrous lamina* du fait de sa nature filamenteuse (Fawcett 1966). La lamina fait partie de la matrice nucléaire, définie comme regroupant les structures résiduelles insolubles via des extractions en sel des noyaux.

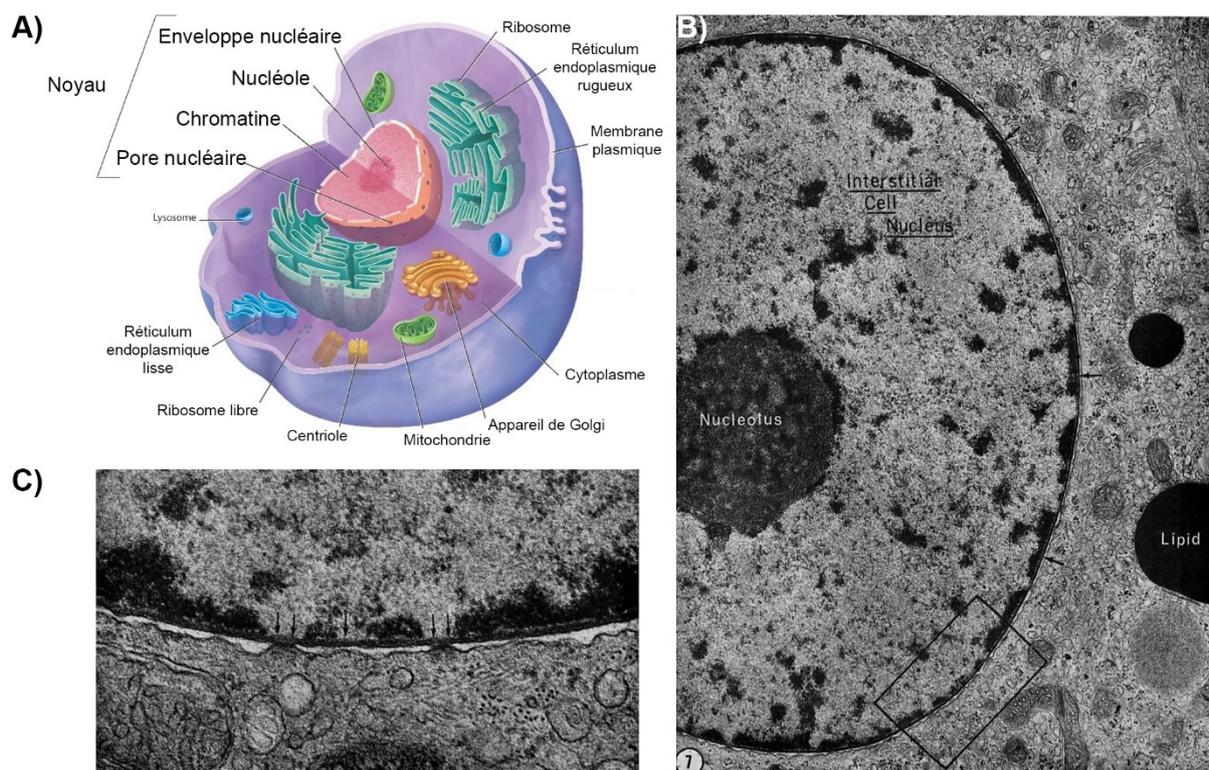


Figure 1: Localisation de la lamina dans une cellule eucaryote.

A) Organisation d'une cellule eucaryote (adapté de thinglink.com). **B)** Microscopie électronique d'une portion de noyau d'une cellule interstitielle de chat. **C)** Portion de noyau similaire à celle dans le rectangle en B) à plus fort grossissement. Pas d'échelle disponible. (Fawcett 1966)

Grâce à la génération d'anticorps dirigés contre un pool de protéines nucléaires abondantes et non solubles puis à leur utilisation pour des expériences d'immunolocalisation, il a été possible d'identifier trois protéines constituant la lamina associée à la membrane nucléaire interne (Gerace et

al. 1978; Krohne et al. 1978). Ces protéines ont ainsi été nommées lamines (A, B et C). Le clonage de l'ADNc des lamines humaines de type A et B révéla que les lamines font partie de la famille des filaments intermédiaires (McKeon et al. 1986; Fisher et al. 1986; M. Peter et al. 1989).

I. Les filaments intermédiaires

A. Les filaments intermédiaires : un des trois réseaux du cytosquelette

Les filaments intermédiaires ont été initialement observés par microscopie électronique dans le compartiment cytoplasmique de cellules du muscle squelettique d'embryons de poussins (Ishikawa et al. 1968). Leur nomination « intermédiaire » provient du fait que leur diamètre a été estimé entre 8 et 12 nm, une valeur intermédiaire entre les deux autres éléments du cytosquelette, les microtubules (25 nm) et les filaments d'actine (7 nm) (Figure 2).

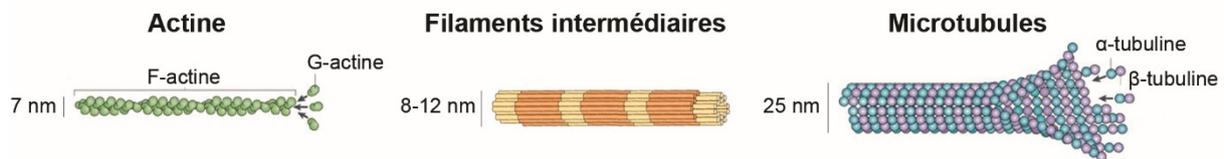


Figure 2 : Les éléments du cytosquelette
(Adapté de (Mostowy and Cossart 2012))

Alors qu'un cytosquelette procaryotique existe, les filaments intermédiaires n'ont pour l'instant été décrits que dans les cellules des métazoaires et leur présence dans les champignons reste controversée.

B. Les sous classes des filaments intermédiaires

Le terme de filaments intermédiaires regroupe plusieurs familles de protéines, qui se localisent soit dans le cytoplasme soit dans le noyau des cellules. Les protéines des filaments intermédiaires cytoplasmiques ont la particularité, contrairement à la tubuline et à l'actine, de ne pas être ubiquitaires. En effet, leur expression varie au cours du développement de l'organisme, de la différenciation des cellules et selon les tissus de l'organisme. De leur côté, les protéines de la famille des filaments intermédiaires nucléaires sont ubiquitaires, mais avec un niveau d'expression pouvant varier au cours du processus de différenciation des cellules.

Les protéines des filaments intermédiaires ont en commun des régions très conservées, impliquées dans la formation de dimères, mais elles ont également une grande variabilité de séquence notamment dans leur extrémité C-terminale. Ainsi, elles ont été divisées en six classes selon l'homologie de séquence de leur domaine central hélicoïdal, leur charge et leur structure secondaire (A. Peter and Stick 2015).

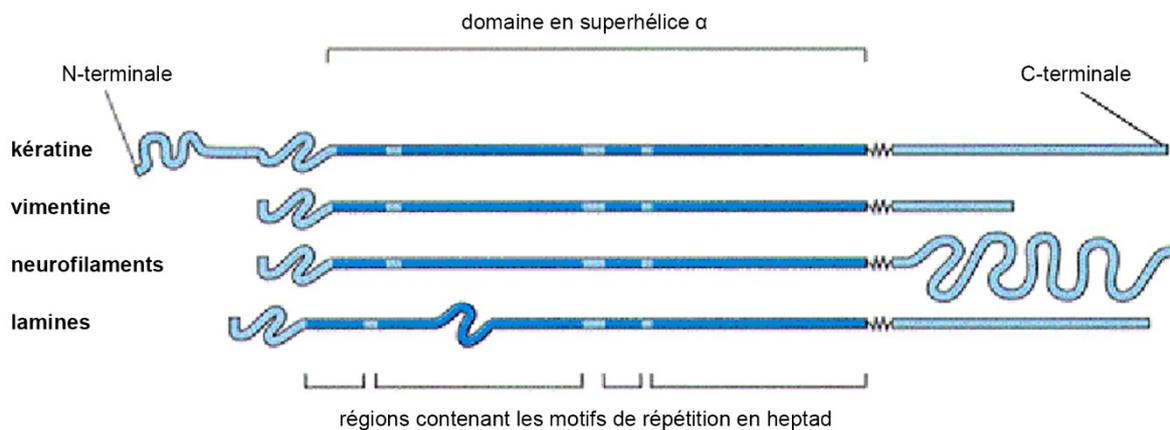


Figure 3 : Similarité et variabilité entre les filaments intermédiaires

(Adapté de cytochemistry.net lui-même adapté de Alberts et al. *Biology of the Cell*, Garland Publishing, N.Y. 1996)

1. Les filaments intermédiaires de type I et II

Les kératines qui comprennent un grand nombre d'isoformes acides, neutres ou basiques constituent les filaments de type I et II, les plus représentés dans l'organisme (Schweizer et al. 2006). Elles sont exprimées dans les cellules épithéliales et composent les ongles et cheveux. Chaque type d'épithélium exprimant une combinaison caractéristique de kératine de type I et II. Les kératines interviennent dans le maintien de la polarité cellulaire et dans la compartimentation de certaines protéines dans le cytoplasme des cellules épithéliales (Salas et al. 1997; Ameen et al. 2001).

2. Les filaments intermédiaires de type III

Les filaments intermédiaires de type III comprennent quatre protéines, la vimentine, la desmine, la protéine acide fibrillaire gliale (GFAP) et la périphérine.

La vimentine est la protéine des filaments intermédiaires majoritaire des cellules mésenchymateuses. Elle est impliquée dans diverses fonctions cellulaires, telles que la morphologie des cellules gliales (Colucci-Guyon et al. 1999), la migration cellulaire (Eckes et al. 1998; Eckes et al. 2000) ou encore la mécanotransduction de forces de cisaillement (Henrion et al. 1997).

La desmine est exprimée dans les cellules musculaires où elle assure un rôle majeur dans le positionnement des organelles et la mécanotransduction de signaux. En effet, des mutations dans le gène codant la desmine sont responsables de pathologies appelées desminopathies qui sont des myopathies myofibrillaires. Dans ces pathologies la desmine ne forme plus un réseau organisé, elle est accumulée sous forme d'agrégats et l'organisation des organelles et des sarcomères est déstabilisée (Bär et al. 2005) (Figure 4).

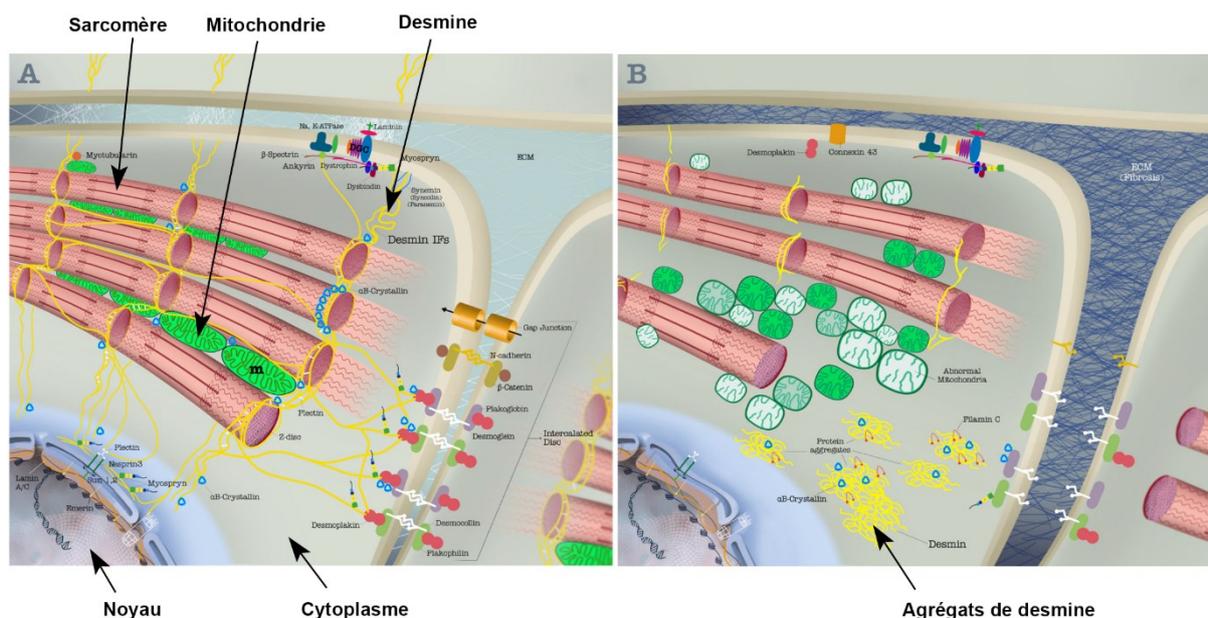


Figure 4 : La desmine, responsable de l'organisation des organelles dans les cellules musculaires
 Organisation des organelles dans une cellule saine **A**) ou dans une cellule de patient atteint de desminopathie **B**). (Adapté de (Capetanaki et al. 2015)).

La GFAP forme des filaments dans les cellules gliales qui entourent les neurones et dans les cellules de Schwann du système nerveux périphérique. La GFAP participe à la formation de la glie et à ses interactions avec les neurones (McCall et al. 1996). Elle est également un marqueur de dommages ou de vieillissement des astrocytes (Middeldorp and Hol 2011).

La périphérine est exprimée dans les neurones du système nerveux périphérique. Elle est impliquée dans le maintien et le fonctionnement des motoneurones (Beaulieu et al. 1999).

3. Les filaments intermédiaires de type IV

Le type IV des filaments intermédiaires comprend l' α -internexine, les neurofilaments (NFs) et la syncoiline. Les neurofilaments remplissent le cœur neuronale des axones, ils sont responsables de leur croissance radiale et déterminent donc leur diamètre alors que les microtubules, eux, sont impliqués dans l'élongation des axones (Lariviere and Julien 2004). L' α -internexine est également impliquée dans la morphogenèse des neurones et la régénération axonale (Blizzard et al. 2013). Elle assure la base de la construction du réseau des NFs (Lariviere and Julien 2004). La syncoiline est fortement exprimée dans les muscles squelettiques et cardiaques (Newey et al. 2001). Elle permet de faire le lien entre le complexe protéique associé à la dystrophine et les filaments intermédiaires de desmine (McCullagh et al. 2007).

4. Les filaments intermédiaires de type V

Le type V des filaments intermédiaires est celui des lamines, protéines nucléaires. Les caractéristiques des lamines seront discutées dans les parties suivantes.

5. Les filaments intermédiaires de type VI

Le type VI des filaments intermédiaires comprend quatre membres. La filensine (*Beaded Filament Structural Protein 1*) et la phakinine (*Beaded Filament Structural Protein 2*), permettent de mettre en place les propriétés optiques du cristallin et de maintenir sa transparence (Song et al. 2009). La synémine, dont il existe 3 isoformes, L (low), M (medium) et H (high), est exprimée dans de nombreux tissus tels que les cellules musculaires, les erythrocytes ou les neurones (Bilak et al. 1998; Granger and Lazarides 1982; Izmiryan et al. 2006). Pour former un réseau, chaque isoforme nécessite une autre protéine de la famille des filaments intermédiaires, comme la vimentine. La nestine, est exprimée dans les cellules souches du système nerveux central (Lendahl et al. 1990).

6. Pathologies liées aux protéines de la famille des filaments intermédiaires

Type cellulaire (Type de filament intermédiaire)	Filament intermédiaire	Maladies associées
Cellules nucléées (V)	Lamines	Dystrophie musculaire, cardiomyopathie, lipodystrophie, syndrome progeroïde, maladie de Charcot-Marie-Tooth de type 2B
Cellules épithéliales (I et II)	Kératines	Troubles de la peau, des cheveux et des ongles, dystrophie cornéenne et prédisposition aux maladies du foie
Cellules mésenchymateuses (III)	Vimentine	Cataracte
Cellules gliales (III)	GFAP	Maladie d'Alexander
Neurones (III et IV)	Neurofilaments, périphérine et α -internexine	Maladie de Charcot-Marie-Tooth, prédisposition à la sclérose latérale amyotrophique et à la maladie de Parkinson
Myocytes (III et IV)	Desmine, synémine et syncoiline	Myopathie et dystrophie musculaire
Cristallin (VI)	Filensine and phakinine	Cataracte

Tableau 1 : Implication des filaments intermédiaires dans les pathologies humaines
(Adapté de (Snider and Omary 2014))

De nombreuses pathologies sont associées à des protéines de la famille des filaments intermédiaires des types I à VI. En fonction de la localisation de l'expression de ces filaments intermédiaires, différents types cellulaires peuvent être touchés causant différentes maladies (Tableau 1). Notons en particulier que la desmine, la synémine et la syncoiline sont toutes trois liées à des myopathies et des dystrophies musculaires. Nous avons déjà mentionné les desminopathies décrivant les pathologies où il y a formation d'agrégats de desmine dans des cellules musculaires. Les souris dépourvues de synémine sont myopathiques (García-Pelagio et al. 2015). La syncoiline, quant à elle, est sur régulée dans une variété de myopathies humaines (Howman et al. 2003; Brown et al. 2005) et dans des modèles murins de maladies musculaires (McCullagh et al., 2007; Newey et al., 2001).

C. Structure des filaments intermédiaires

L'ensemble des protéines des filaments intermédiaires présentent une région centrale très conservée (*coiled-coil rod domain* ou *rod domain* ou domaine en superhélice α) incluant quatre segments en hélice- α (1A, 1B, 2A et 2B), reliés entre eux par des *linkers* (L1, L12 et L2). Les régions

adjacentes N- et C-terminales non hélicales mais globulaires mais variables de par leur taille et leur composition en acides aminés (Parry et al. 2007).

D. Assemblage des filaments intermédiaires in vitro

Les monomères de filaments intermédiaires s'assemblent tout d'abord en homodimères (exemple : les lamines) ou en hétérodimères (exemple : les kératines) grâce à leur *rod domain* en hélices- α , qui contient un motif répété de 7 acides aminés (heptad repeat : a à g). Au sein de ces motifs, les acides aminés en position a et d sont préférentiellement hydrophobes alors que les acides aminés en position e et g sont chargés. Chaque hélice- α s'enroule autour de celle d'une autre protéine pour former un dimère. Ensuite, le type d'association entre 2 dimères (55 nm long) varie selon la nature des protéines composant les oligomères: 1) chevauchement antiparallèle des segments coil 1B (kératines trichocytes réduites et épidermiques, A₁₁, Figure 5 B)), 2) chevauchement antiparallèle des segments coil 2B (kératines trichocytes oxydées, A₂₂, Figure 5 C)), 3) chevauchement antiparallèle du dimère dans toute sa longueur (vimentine, desmine et neurofilaments, A₁₂, Figure 5 D)), 4) chevauchement parallèle du domaine C-terminal d'un dimère avec la région N-terminale de l'autre dimère (les lamines, A_{CN}, Figure 5 E)). Après une étape d'élongation, une étape de compaction radiale conduit à la formation de filaments intermédiaires matures. Au final, le nombre de polypeptides à une section donnée d'un filament est d'approximativement 32 mais ce nombre varie en fonction du filament intermédiaire (Paramio and Ph 2015). L'assemblage des lamines nucléaires qui se fait selon un autre processus sera décrit plus tard dans ce manuscrit (voir ci dessous).

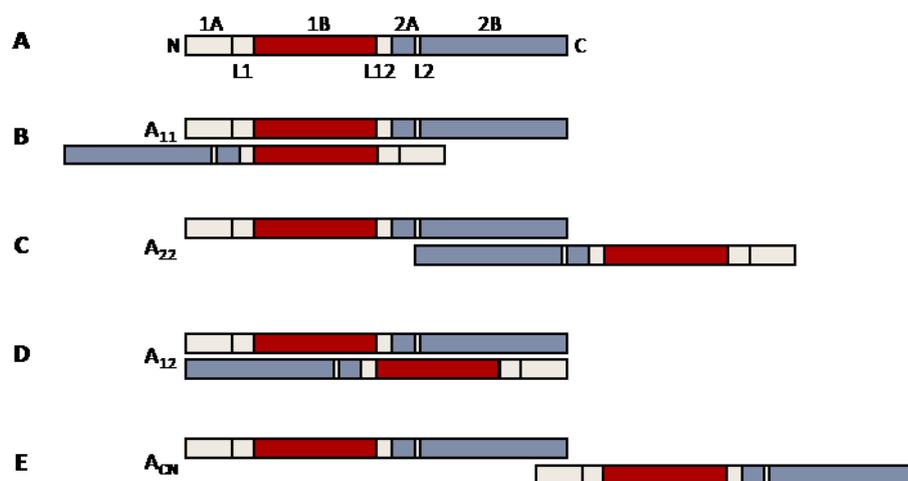


Figure 5 : Différents modèles d'assemblage des filaments intermédiaires.

A) Domaines structuraux d'un dimère de filament intermédiaire. **B) C) et D)** Assemblage des dimères de filaments intermédiaires en polymères. (Inspiré de Parry, Strelkov, Burkhard, Aebi, & Herrmann, 2007)

II. Gènes codant les lamines de type A et de type B

Chez les vertébrés, les lamines de type A se composent de la lamine A (LA), la lamine C (LC), la lamine A Δ 10, exprimées dans les cellules somatiques alors que la lamine C2 est spécifique des cellules germinales. Chez l'homme, elles sont toutes codées par le gène *LMNA* situé sur le

chromosome 1q21.2-21.3, mais sont générées post-transcriptionnellement par épissage alternatif de l'ARNm (Figure 6) (Lin and Worman 1993; Furukawa et al. 1994; Machiels et al. 1996).

La lamine C est identique à la lamine A jusqu'au codon 566. Alors que la lamine A subit un épissage de 90 paires de bases après le début de l'exon 10, la lamine C ne subit pas cet épissage et a donc cinq acides aminés spécifiques en C-terminal, mais est dépourvue de la région codée par les exons 11 et 12. Alors que la lamine A est synthétisée sous forme de précurseur long de 664 acides aminés, la lamine C est plus courte avec 572 acides aminés. La lamine C2 a la même particularité que la lamine C, mais elle se différencie de toutes les autres lamines par sa tête en N-terminal qui est codée par un exon alternatif 1C2 localisé dans le premier intron du gène *LMNA* (Furukawa et al. 1994). La lamine AΔ10, comme son nom l'indique, est identique à la lamine A exceptée l'absence de l'exon

10.

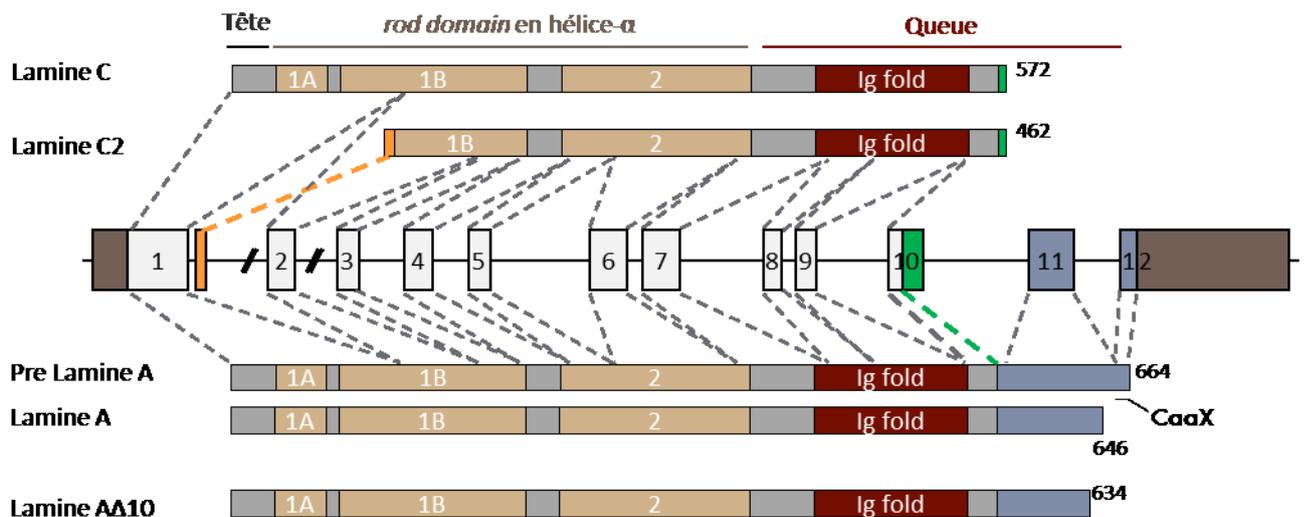


Figure 6 : Epissage alternatif des lamines de type A

Les lamines de type B se composent de la lamine B1 (LB1) et de la lamine B2 (LB2). Ces deux lamines sont codées par deux gènes distincts, *LMNB1* et *LMNB2* situés sur le chromosome humain 5q23.2 et 19p13.3 respectivement (Lin and Worman 1995)(Figure 7).

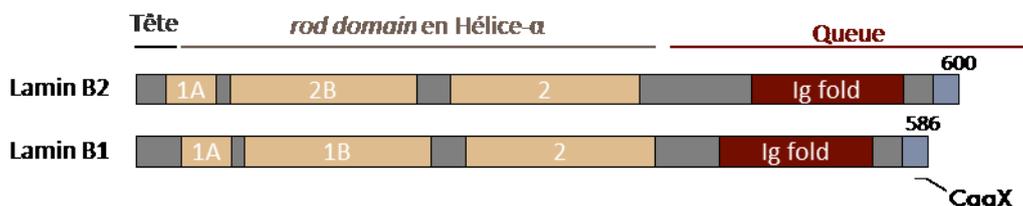


Figure 7 : Les lamines de type B

III. Phylogénie des lamines

Pour étudier la phylogénie des lamines il faut dans un premier temps définir ce que sont les lamines. Martin Kollmar estime que les critères à prendre en compte sont les similarités de

séquences du *rod domain* et de l'Ig-fold (voir paragraphe « Structure des filaments intermédiaires ») et la conservation de l'architecture des domaines classiques. Pour les lamines à qui il manque un de ces domaines, il faut qu'elles aient une similarité de séquence plus forte avec les autres lamines que les filaments intermédiaires cytoplasmiques des métazoaires. Ainsi, alors qu'il était admis que les lamines étaient présentes uniquement chez les métazoaires et les amibozoaires, des gènes de lamines ont été identifiés dans des ichtyospores (ou mésomycetozoaires), des choanoflagellés, des Oomycètes ou encore des Rhizaires (Kollmar 2015). Les lamines sont donc apparues très tôt dans l'évolution des eucaryotes voire chez l'ancêtre commun à tous les eucaryotes. Chez les plantes, des études de microscopie électronique ont révélé une structure similaire à celle de la lamina des vertébrés (Galcheva-Gargova and Stateva 1988; Mínguez and Moreno Díaz de la Espina 1993). Des protéines membres de la famille des NMCP (*nuclear matrix constituent protein*) qui partagent des homologies en terme de structure (un *rod domain* central entouré d'un domaine de tête et de queue) plutôt que de séquence avec les lamines (Ciska et al. 2013) apparaissent comme de bons candidats pour constituer la lamina des plantes.

Il a été montré, toujours pas Martin Kollmar, que le gène des lamines a été dupliqué avant la séparation des Cnidaires et des Bilatériens et que ce duplicat a évolué en gène de la nematociline. Les filaments intermédiaires cytoplasmiques des métazoaires ont été dérivés d'une lamine bilatérienne et non de la nematociline. Chez les vertébrés, les lamines ont été dupliquées deux fois, résultant en des doublets de doublet avec les sous-types des lamines A/C et les lamines LIII et les sous-types des lamines B1 et B2 (Kollmar 2015). Cette découverte a permis de réfuter l'hypothèse selon laquelle les lamines de type B seraient apparues avant les lamines de type A. Ainsi, d'un point de vue phylogénique, les lamines non métazoaires et d'invertébrés ne sont pas des lamines de type B mais des lamines partageant des similarités avec toutes les lamines de vertébrés. De plus, les lamines de vertébrés ne sont pas plus semblables aux filaments intermédiaires cytoplasmiques des invertébrés que des filaments intermédiaires cytoplasmiques des vertébrés.

IV. La structure des lamines et leur assemblage en polymères

A. Structure primaire des lamines

Tout comme les autres membres de la famille des protéines des filaments intermédiaires, les lamines (nucléaires) forment des dimères grâce à leur région centrale (*rod domain*) (Figure 8). Cependant, les lamines, ancêtres des protéines des filaments intermédiaires cytoplasmiques (Kollmar 2015) (voir paragraphe « Phylogénie des lamines ») se distinguent par la présence de six répétitions heptades supplémentaires (soit 42 acides aminés) au sein du coil 1B et d'une région NLS (*nuclear localisation signal*) (Herrmann and Aebi 2004) (Figure 8).

Le NLS est essentiel à l'import nucléaire de protéines (Frangioni and Neel 1993). Ce motif est constitué de cinq résidus majoritairement basiques : Lys-(Lys ou Arg)-(Lys ou Arg)-(Lys ou Arg)-(Ile ou Leu)-(Glu ou Asp). Pour les lamines A et B humaines, les séquences NLS qui sont situées dans le domaine carboxy-terminal proche de l'extrémité du *rod domain* sont respectivement KKRK et KRKR.

Près du NLS, dans la région C-terminale, se trouve un domaine *Immunoglobulin-fold* (Ig-fold), un domaine présent dans des centaines de protéines, il est connu pour être impliqué dans les interactions protéine-protéine, ADN-protéine ou phospholipide-protéine. Concernant les lamines, il a été montré que l'Ig-fold se lie directement à PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*), le facteur nécessaire à la phase d'élongation de la chaîne de réplication d'ADN (Shumaker et al. 2008) ou encore à FXR1P (*Fragile X-related protein 1*), une protéine liant et régulant la traduction de ses ARNm cibles (Oldenburg et al. 2014).

La majorité des lamines (A, B1, B2 et AΔ10, voir paragraphe « Gènes codant les lamines de type A et de type B ») ont également la particularité d'avoir un motif CAAX à leur extrémité C-terminale alors que les lamines C et C2 en sont dépourvues. Ce motif représente une séquence en acides aminés, cystéine-aliphatique-aliphatique-any, qui sera farnésylée de manière transitoire (lamines A) ou permanente (lamines B) (voir paragraphe « Processus de maturation des lamines »).

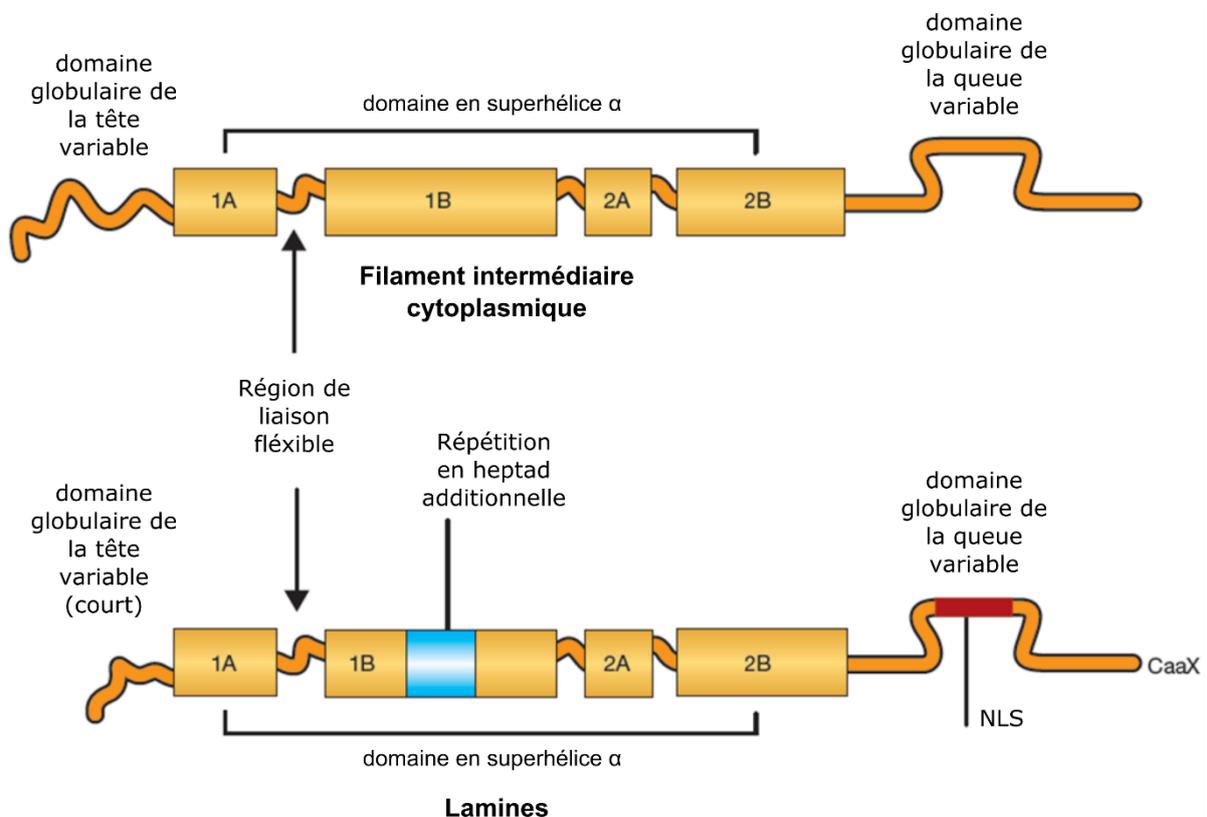


Figure 8 : Structure générale des filaments intermédiaires cytoplasmiques comparée à celle des lamines. (Adapté de (Hutchison and Worman 2004))

B. Structure secondaire et tertiaire des lamines

Le domaine globulaire en C-terminal des lamines est clairement visible par microscopie électronique d'échantillons de protéines purifiées s'associant sous forme d'oligomères *in vitro* (Stuurman et al. 1998) (Figure 9, Herrmann and Aebi 2004).

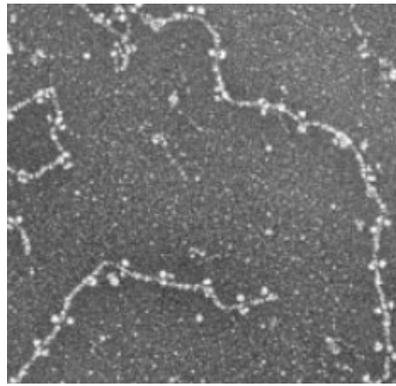


Figure 9 : Microscopie électronique de filaments de lamines A/C
(Herrmann and Aebi 2004)

En 2002, Krimm et ses collègues ont révélé par spectroscopie RMN que les résidus 411 à 553 au sein de la région C-terminale globulaire formaient une structure immunoglobuline-like (l'Ig-fold). Cette structure présente deux feuillets β , chacun constitué de quatre et cinq brins β , respectivement. Les feuillets sont situés face à face avec des axes décalés de 45° de l'un par rapport à l'autre (Krimm et al. 2002) (Figure 10). Cette même structure a été identifiée la même année par Dhe-Paganon et ses collègues par cristallographie (Dhe-Paganon et al. 2002).

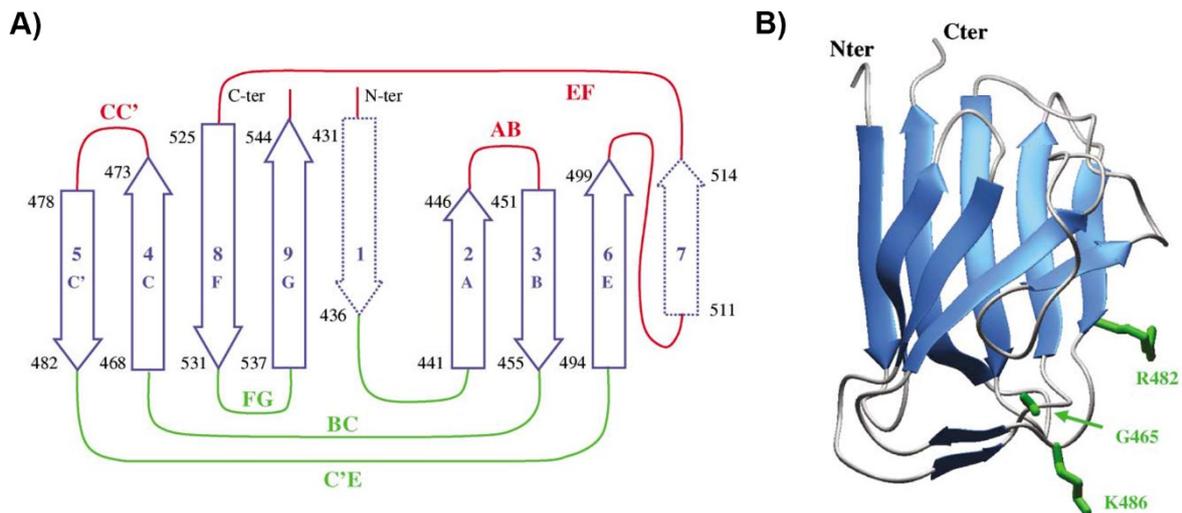


Figure 10 : Structure de l'Ig-fold des lamines

A) Topologie de l'Ig-fold. Les flèches bleues pleines représentent les brins appartenant aux deux feuillets β de l'Ig-fold classique de type s alors que les flèches bleues en pointillés sont les brins additionnels caractéristiques de l'Ig-fold des lamines. **B)** Représentation en 3D de la structure de l'Ig-fold des lamines. (Krimm et al. 2002)

C. Assemblage des lamines

Le processus d'assemblage des lamines commence par la formation de dimères via l'enroulement des deux hélices- α entre elles de manière parallèle. Puis, les dimères s'associent longitudinalement en recouvrant une partie de l'extrémité C-terminale d'un dimère par la région N-terminale du dimère voisin. Suit ensuite une association antiparallèle de deux polymères de lamines en protofilament.

V. Expression des lamines

Chez les mammifères, les lamines de types B sont ubiquitaires alors que les lamines de type A sont exprimées selon un modèle temporel au cours du développement et sont finalement exprimées dans la majorité des cellules différenciées. Les lamines de type A sont exprimées dans les cellules souches adultes, notamment dans les cellules souches mésenchymateuses et les cellules satellites (cellules souches du muscle), mais sont absentes des autres types de cellules souches, comme les cellules souches embryonnaires (Röber et al. 1989). Ainsi les cellules contiennent soit des lamines de type B seules soit un mix de lamines de type A et B.

Dans les cellules germinales de mammifères et les pronuclei, l'expression des lamines est limitée à deux isoformes, respectivement la lamine B3 et la lamine C2, qui ne sont pas exprimées dans d'autres types cellulaires (Furukawa and Hotta 1993; Furukawa et al. 1994). Les cellules souches embryonnaires humaines et murines expriment les lamines B1 et B2 mais pas les lamines A ou C. Au cours de la différenciation des cellules souches embryonnaires, les lamines A/C sont détectées juste avant que le gène de pluripotence *Oct-3/4* ne soit sous régulé, et juste après que l'antigène spécifique du stade embryonnaire-4 (*SSEA-4*) ne soit activé. Parce que les lamines de type A sont généralement exprimées après que la différenciation cellulaire est initiée, il est supposé qu'elles auraient un rôle dans le verrouillage du stade différencié (Röber et al. 1989).

Il y a des différences d'expression des lamines selon les espèces. Par exemple la lamine A est fortement exprimée dans les érythrocytes circulants chez le *Gallus gallus* (le poulet) alors qu'elles sont absentes de ce type de cellules chez les amphibiens (Wolin et al. 1987; Lehner et al. 1987).

A. Le niveau d'expression de lamine A dépend de la rigidité des tissus

Les différents tissus de l'organisme sont plus ou moins rigides, généralement en corrélation avec le degré de stress mécanique qu'ils subissent. Ainsi, le cerveau et le tissu adipeux qui sont soumis à peu de stress mécanique sont des tissus mous, alors que les os qui sont soumis à de forts stress constituent un tissu dur. Swift et ses collaborateurs ont démontré l'implication des lamines dans la différenciation cellulaire sensible à la rigidité des tissus. En effet, en cultivant les cellules sur des supports de différentes rigidités, ils ont observé une corrélation entre l'augmentation du niveau d'expression de la lamine A mais la diminution de sa phosphorylation d'une part et l'augmentation de la rigidité du support d'autre part. De plus, le choix du support de culture des cellules a également des conséquences sur la spécificité de la voie de différenciation suivie (Swift et al. 2013). En particulier, des supports constitués de gels modérément rigides (~12 kPa) sont les plus adaptés à la myogenèse (Engler et al. 2004; Engler et al. 2008; Gilbert et al. 2010). En revanche, les cellules souches cultivées sur matrice molle (0,3 kPa) ou dure (40 kPa) se différencient efficacement en adipocytes (cellules du tissu adipeux mou) ou en ostéocytes (cellules du tissu osseux dur), respectivement (Swift et al. 2013). A noter que plus la rigidité des supports de culture est proche de celle des tissus d'intérêt, meilleure est la différenciation cellulaire.

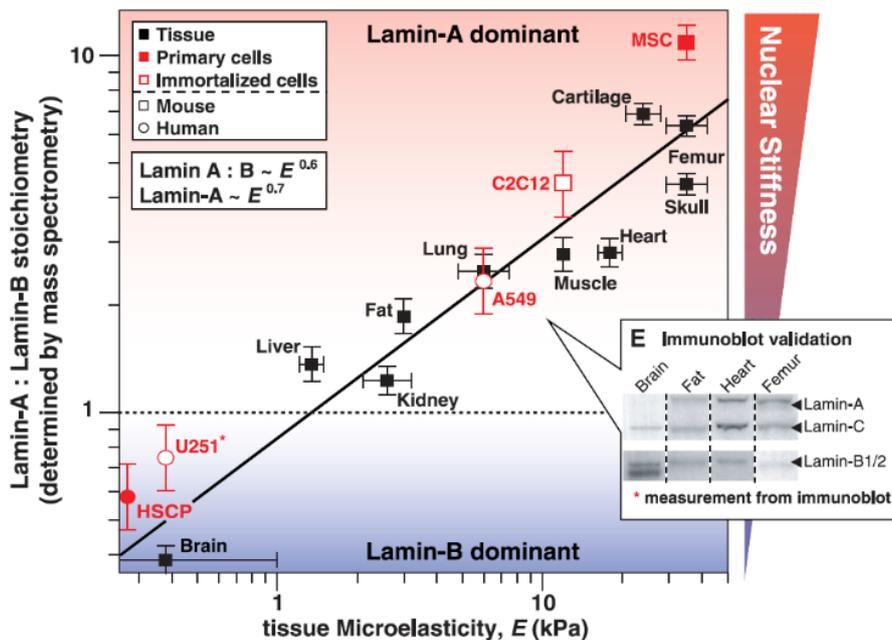


Figure 13 : Le niveau d'expression de la lamine A augmente avec la rigidité des tissus.
 Importé de (Swift et al. 2013)

VI. Modifications post-traductionnelles et dynamique des lamines

A. Processus de maturation des lamines et de leur import nucléaire

Les lamines A et lamines C sont identiques pour leur 566 premiers acides aminés et ne diffèrent que dans leur extrémité C-terminale. Le précurseur de la lamine A (a.a 1-664) appelé pré-lamine A (préLA) contient un motif CAAX alors que la lamine C (a.a 1-572) en est dépourvue, c'est pourquoi la lamine C ne subit pas de processus de maturation.

Quatre étapes sont impliquées dans le processus de maturation de la pré-lamine A (Figure 14). Tout d'abord la cystéine du motif CAAX est farnésylée par la farnésyltransferase, puis le motif AAX est clivé par l'une des deux protéases, FACE1/ZMPSTE24 ou FACE2/Rce1. Ensuite la cystéine farnésylée est carboxyméthylée par l'enzyme Icmt (*isoprenyl-cysteine-carboxy-methyltransferase*). Pour finir les 15 derniers acides aminés sont retirés suite au clivage de l'extrémité C-terminale par la protéase FACE1/ZMPSTE24. Ainsi la pré-lamine A a 664 acides aminés alors que la lamine A mature n'en a plus que 646.

Les lamines de type B suivent également un processus de maturation où les trois premières étapes sont identiques à celles suivies par la pré-lamine A. Cependant elles ne subissent pas la quatrième étape de maturation et ne sont donc pas clivées. Ainsi les lamines de type B sont en permanence farnésylées et carboxyméthylées.

Selon les études, la maturation des lamines aurait lieu dans le cytoplasme et/ou dans le noyau des cellules en interphase. Le fait que la maturation se fasse dans le cytoplasme est cohérent avec la

présence des différentes enzymes dans le cytosol (farnésyltransferase) ou dans les membranes du réticulum endoplasmique (RE) (Rce1, Icmt, Zmpste). A l'inverse, le fait que la maturation se fasse dans le noyau est supporté par des études de cinétiques et de localisation in situ de la pré-lamine A/lamine A (Lehner et al. 1986; A. E. Goldman et al. 1992) et par la récente découverte de la présence des enzymes Icmt et Zmpste24 dans le compartiment nucléaire (Barrowman et al. 2008).

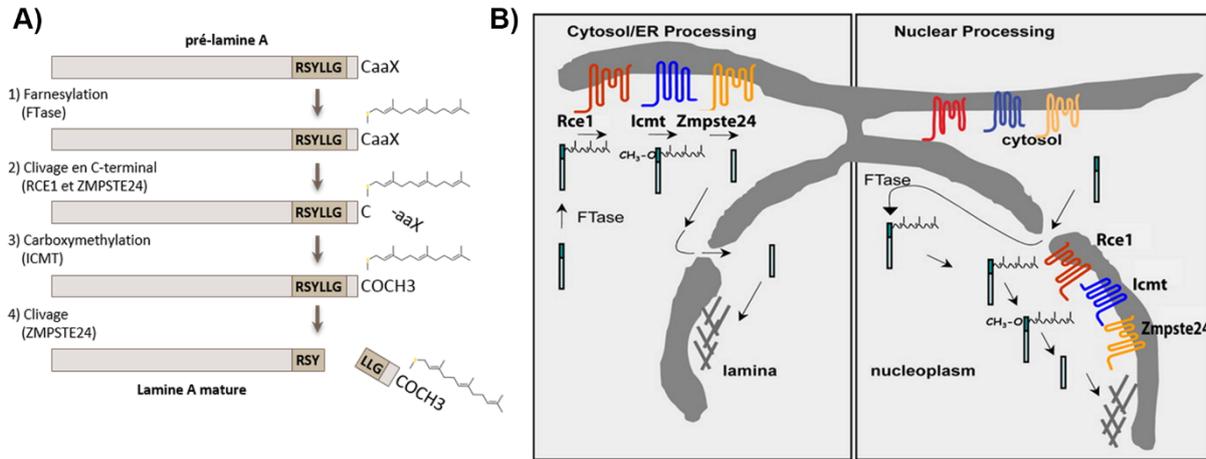


Figure 14 : Maturation et Importation des lamines de type A dans le noyau.

A) Maturation de la pré-lamine A en lamine A mature. **B)** Importation et maturation des lamines dans le noyau (Barrowman et al. 2008).

Les protéines membranaires de l'INM, s'insèrent initialement dans les membranes du RE (qui sont en continuité avec les membranes de l'ONM) dès leur synthèse au niveau des ribosomes, où elles sont reconnues et liées par l'importine- α -16 (Saksena et al. 2006; Antonin et al. 2011). Les complexes formés avec l'importine- α -16 glissent le long de la membrane du RE et de l'ONM, passent par les pores nucléaires pour atteindre la localisation finale de l'INM. On ne sait pas si l'importine- α -16 reconnaît ou pas le NLS des lamines de type B et de la pré-lamine A, alors qu'elles ne sont pas des protéines membranaires mais associées à l'INM. Par contre, on sait que la séquence NLS est indispensable à l'import nucléaire des lamines en interphase (D. Wu et al. 2014).

B. Dynamique des lamines

Alors que les filaments d'actine et les microtubules sont des composants du cytosquelette très dynamiques, les filaments intermédiaires sont connus pour leur grande stabilité. Cependant, en début de mitose, lorsque la chromatine se condense pour générer les chromosomes individuels et que l'enveloppe nucléaire se désintègre, les polymères de lamines se désassemblent sous forme de dimères. Alors que les dimères de lamines B se dispersent en restant associés aux membranes du RE, les dimères de lamines de type A diffusent dans le cytosol. L'ensemble de ces processus est réversé à la fin de la mitose.

Dès la transition anaphase-télophase, les lamines B commencent à se concentrer à la surface des chromosomes. Lorsque les chromosomes atteignent les centres organisateurs des microtubules, toutes les lamines B visibles sont accumulées à leur surface. Dans les 2 cellules filles, au stade G1, les lamines B1 sont assemblées en polymères relativement stables, comme démontré par les expériences de FRAP (*Fluorescence Recovery After Photobleaching*) et de fractionnement cellulaire. En revanche, l'adressage des lamines de type A au noyau se fait plus tardivement et plus

progressivement, une fois les composants majeurs de l'enveloppe nucléaire assemblés, comme les complexes des pores nucléaires (Moir et al. 2000).

En interphase, les lamines de type A s'assemblent non seulement à la périphérie du noyau, dans la lamina, mais également à l'intérieur du noyau, dans le nucléoplasme. Par FRAP, il a été montré qu'en interphase (stade G2), ces deux pools de lamines de type A étiquetées GFP sont stables (temps de recouvrement de la fluorescence GFP supérieure à 180 minutes) (Moir et al. 2000). Par contre au cours de la phase G1 le pool nucléoplasmique de lamines A est beaucoup plus dynamique que le pool associé à l'enveloppe nucléaire (Broers et al. 1999; Moir et al. 2000). En utilisant la même technique, une étude plus récente a aussi montré qu'au sein du nucléoplasme, on pouvait même distinguer deux fractions de lamines A/C (étiquetées GFP) dynamiques, présentant un coefficient de diffusion de $\sim 5,3 \mu\text{m}^2/\text{sec}$ ou de $0,5 \mu\text{m}^2/\text{sec}$ (Shimi et al. 2008).

L'assemblage / désassemblage des polymères de lamines est régulé notamment par des réactions de phosphorylation/déphosphorylation (voir paragraphe ci-dessous).

C. Phosphorylation des lamines

1. Phosphorylation des lamines en mitose

Les lamines de types A ont 61 sites de phosphorylation. Beaucoup de sites de phosphorylation mitotiques sont localisés près du NLS. Cependant certains de ces sites sont également ciblés au cours de l'interphase.

A l'entrée en mitose, c'est à dire à la transition G2/M, la kinase cycline-dépendante CDK1 joue un rôle clé. Or il a été montré que la phosphorylation des lamines par CDK1 altère l'assemblage des polymères en tête-à-queue mais ne perturbe pas la formation des dimères de lamines (Heitlinger et al. 1991; M. Peter et al. 1991; A. Peter and Stick 2012). CDK1 phosphoryle différents résidus Serine situés de chaque côté du *rod domain*, à savoir la Ser-22 (N-ter), et les Ser-392, Ser-404 et Ser-406 (C-ter) (Strelkov et al. 2004; M. Peter et al. 1991; Heald and McKeon 1990; M. Peter et al. 1990; Ward and Kirschner 1990; Eggert et al. 1991). De même, la phosphorylation de la Ser-37 chez la drosophile, qui est l'homologue de la Ser-22 chez l'homme, augmente la solubilité des lamines et la rend incapable d'interagir avec la chromatine *in vivo* (Zaremba-Czogalla et al. 2012).

La famille de protéines des kinases C (PKC), régule également les lamines au cours de la mitose. Des études dans le poisson zèbre suggèrent que la phosphorylation préalable des lamines par les PKC serait nécessaire pour démasquer les sites de phosphorylation ciblés par CDK1 (M. Peter et al. 1990; Hocevar et al. 1993; Collas 1999; Buendia et al. 2001).

En parallèle, il a été montré dans des ovocytes de Xénope que la déphosphorylation de résidus phosphorylés par des kinases actives en interphase telles que PKA (*Protein Kinase A*), était requise pour que les filaments de lamines puissent se désassembler en mitose (Molloy and Little 1992).

2. Phosphorylation des lamines de type A en interphase

Les lamines de type A sont aussi phosphorylées en interphase sur certains résidus mais l'implication fonctionnelle n'est pas connue. La Ser-405 est de plus en plus phosphorylée au cours de

la prophase et son niveau est maintenu jusqu'à la fin de la phase G1, la Ser-407 est phosphorylée uniquement au cours de la phase G1 et de la prophase, et la Ser-421 est phosphorylée au cours de la transition S-G2 (Kuga et al. 2010). Dans la même région de la lamine, les kinases Akt, PKA et la S6-kinase II phosphorylent la Ser-404 (Ward and Kirschner 1990). La Ser-525 des lamines A/C est phosphorylée par PKC (Eggert et al. 1993).

Il est intéressant de noter que des pathologies puissent être associées à des mutations du gène *LMNA* concernant des sites de phosphorylation de la protéine. Ainsi, des mutations au niveau de la Ser-404 (S404A) ou à des acides aminés proches (R401C) sont responsables de dystrophie musculaire d'Emery-Dreifuss (EDMD) (Cenni et al. 2008). Il se trouve par ailleurs que les lamines A/C sont généralement moins phosphorylées dans les myoblastes de patients atteints d'EDMD ou de dystrophie musculaire des ceintures (Cenni et al. 2005).

D. O-GlcNAcylation des lamines

Il a été montré en 1989 que les lamines étaient glycosylées, mais sans savoir s'il s'agissait d'une O-GlcNAcylation ou d'une autre modification (Ferraro et al. 1989). La O-GlcNAcylation est une modification réversible d'un sucre des résidus Ser ou Thr qui peut être en compétition ou coopérer avec la phosphorylation pour réguler des voies de signalisation, la transcription ou la mitose (Hart and Copeland 2010). Dans les cellules HeLa mitotiques, la lamine A a été observée O-GlcNAcylatée dans sa région C-terminale spécifique de la lamine A, sur les Ser-612 et Thr-643 (Z. Wang et al. 2010). Dans des cerveaux de souris, la lamine A a été observée O-GlcNAcylée sur les Ser-611 et Ser-613, or la Ser-611 est l'homologue de la Ser-612 de la lamine humaine. Cependant les implications fonctionnelles de l'O-GlcNAcylation des lamines n'est pas connue.

E. Acétylation des lamines

L'acétylation a tout d'abord été découverte comme étant une modification des histones, par la suite bien d'autres protéines ont été reconnues comme acétylées et notamment les lamines de type A et B mais également des protéines cytoplasmiques (S. C. Kim et al. 2006). Les lamines de type A possèdent huit sites d'acétylation, six dans le *rod domain* (Lys-97, Lys-108, Lys-114, Lys-270, Lys-311, Lys-378), une dans le NLS (Lys-417) et une dans l'Ig-fold (Lys-450). Les lamines B1 et B2 ont respectivement six (Lys-33, Lys-123, Lys-157, Lys-181, Lys-271, Lys-483) et quatre (Lys-47, Lys-81, Lys-393, Lys-520) sites d'acétylation. Les conséquences fonctionnelles d'acétylation des lamines sont pour l'instant encore inconnues. Cependant, étant donné que les lamines font partie de complexes protéiques contenant des protéines à domaine-LEM (émerine, LAP2 α/β) et HDAC3 qui lient la chromatine transcriptionnellement inactive (Somech et al. 2005; Guelen et al. 2008; Zullo et al. 2012; Reddy et al. 2008; Demmerle et al. 2012), il a été proposé que l'acétylation des lamines pourrait influencer l'accrochage de la chromatine silencieuse à l'enveloppe nucléaire.

F. Oxydation des lamines

Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) sont produites au cours du métabolisme de l'oxygène et peuvent réguler de nombreuses voies de signalisation et notamment la senescence cellulaire (Bartz and Piantadosi 2010). Dans des fibroblastes de peaux humains, les résidus Cys-522, Cys-588 et

Cys-591 de la queue de la lamine A peuvent être oxydés. Lorsque l'un de ces trois résidus est muté dans des fibroblastes soumis à un stress oxydant, la forme des noyaux est altérée et les cellules entrent en sénescence prématurément. Ces expériences laissent à penser que les lamines de type A contribueraient à protéger la cellule du stress oxydant (Pekovic et al. 2011)

G. SUMOylation des lamines

Il existe quatre isoformes de protéines SUMO (*small ubiquitin-like modifier*) chez les mammifères. Ces protéines SUMO se lient de manière covalente et réversible aux lysines de leurs protéines cibles (Gareau and Lima 2010). Les modifications SUMO des protéines cibles peuvent réguler leur localisation, leur fonction et leur interaction avec des partenaires, impactant ainsi de nombreuses voies de signalisation, comme par exemple, l'import et l'export nucléaire, la transcription, l'apoptose, la régulation du cycle cellulaire et la stabilité des protéines (Geiss-Friedlander and Melchior 2007).

Les lamines A/C humaines sont modifiées par SUMO2 à la Lys-201. Cette modification est importante pour la localisation et l'assemblage en polymères de la lamine A, puisque ces deux activités sont altérées par la mutation p.Lys201Arg (Y.-Q. Zhang and Sarge 2008). Les lamines de type A peuvent également être modifiées par SUMO1 à deux positions, la Lys-420 (dans le NLS) et la Lys-486 (dans l'Ig-fold). Cette dernière n'est plus correctement SUMOylée dans des lamines mutées en des sites responsables de lipodystrophies (p.Gly465Asp et p.Lys486Asn) (Simon et al. 2013). La Lys-420 peut quant à elle être modifiée par SUMO3 (Galisson et al. 2011). Il a également été suggéré que les lamines A/C et la lamine B1 pourraient être des cibles de SUMO4 (Guo et al. 2005).

H. Ubiquitination des lamines

L'ubiquitine, une petite protéine de 8,5 kDa, se lie de manière covalente à des Lys de protéines cibles. Les enzymes E1 et E2 préparent l'ubiquitine à transférer, alors que l'ubiquitine ligase E3 permet le ciblage de la protéine. Une ubiquitine peut être attachée à une autre ubiquitine, on peut alors obtenir une chaîne d'ubiquitine qui marque la protéine cible pour une dégradation protéolytique. A l'inverse, l'attachement d'une ubiquitine seule influence les protéines cibles de diverses façons, régulant des voies de signalisation spécifiques et des fonctions nucléaires.

Des études ont révélé que les lamines A/C, B1 et B2 étaient ubiquitinées majoritairement au niveau du *rod domain*, ce qui pourrait impacter l'assemblage des lamines en polymères. Cependant l'impact fonctionnel des poly et mono-ubiquitination des lamines est encore inconnu.

Certains résidus des lamines qui sont sensibles à l'ubiquitination peuvent aussi subir d'autres modifications, telles que l'acétylation.

Par ailleurs, lors de l'apoptose, la dégradation des lamines implique leur clivage via différentes enzymes : les caspases 1 et 6 (Takahashi et al. 1996), les granzymes A et B (Zhang et al. 2001) et CRNSP (Clawson et al. 1992) qui agissent à des positions proches de nombreux sites d'ubiquitination.

Lamin A/C

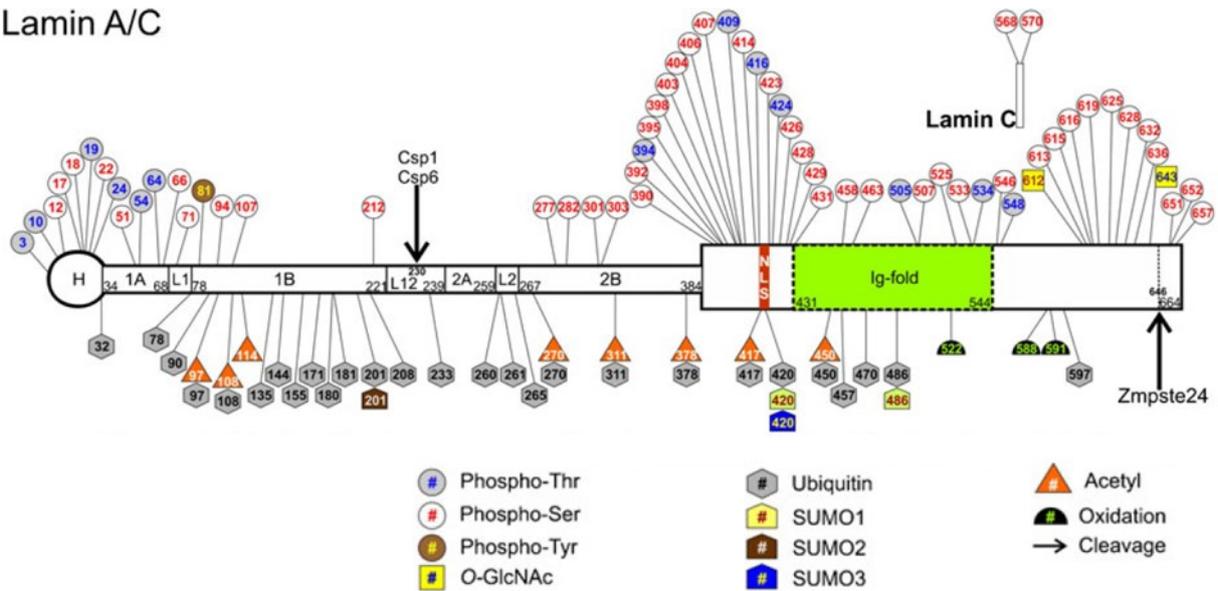


Figure 15 : Modifications post-traductionnelles des lamines A/C
(Simon and Wilson 2013)

En conclusion, on peut imaginer que la compétition pour différentes modifications post-traductionnelles sur des sites particuliers de la lamine, contribuerait à réguler les fonctions des lamines et notamment leur capacité à interagir avec des partenaires de manière tissu-spécifique.

Chapitre 2

Les partenaires des lamines

Chapitre 2 Les partenaires des lamines

Les partenaires des lamines sont multiples que ce soit à l'enveloppe nucléaire ou dans le nucléoplasme. Les lamines de type A ont au moins 54 partenaires, et les lamines B1 et B2, moins étudiées, auraient au moins 23 et 7 partenaires respectivement.

Dans la mesure où mon projet de recherche porte sur une mutation du gène *LMNA*, je ne traiterai dans les chapitres suivants de l'introduction que des lamines de type A. Cependant, les lamines de type B seront évoquées en tant que partenaires des lamines de type A.

I. Partenaires des lamines de type A à l'enveloppe nucléaire

De par sa localisation, à l'interface entre les compartiments nucléaire et cytoplasmique, l'enveloppe joue des rôles clés dans l'organisation du génome et l'expression de gènes mais également dans l'organisation du cytosquelette et la régulation de voies de transduction du signal.

L'enveloppe nucléaire est une double bicouche lipidique comprenant la membrane nucléaire interne (INM) et la membrane nucléaire externe (ONM). La membrane interne est tapissée à l'intérieur du nucléoplasme par la lamina alors que la membrane externe est en continuité avec les membranes du réticulum endoplasmique. L'espace entre ces deux membranes est appelé l'espace péri-nucléaire.

L'enveloppe nucléaire contient des pores nucléaires et des protéines membranaires dont certaines de la famille des protéines LEM et des protéines du complexe LINC (*Linker of Nucleoskeleton and Cytoskeleton Complex*), parmi lesquelles certaines interagissent directement avec les lamines A/C comme détaillé ci dessous (Figure 16).

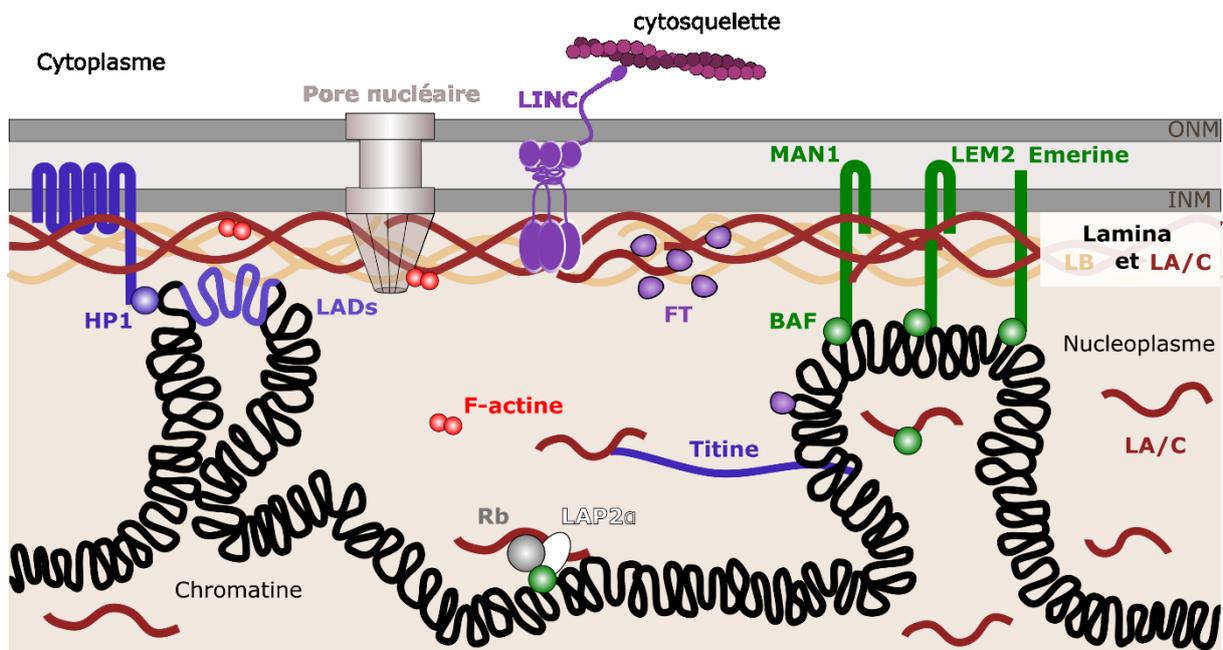


Figure 16 : Organisation des partenaires de lamine de type A à l'enveloppe nucléaire

LB (Lamine B), LA/C (Lamines A/C), HP1 (Heterochromatin protein 1), LADs (Lamina-associated domains), LINC (Linkers of the nucleoskeleton to the cytoskeleton), FT (Facteurs de Transcription : c-Fos et SREBP1c), BAF (Barrier to Autointegration Factor), MAN1, LEM2, Emerine, Rb (Retinoblastoma protein), LAP2 α (Lamin associated protein 2 α).

A. La famille des protéines LEM

1. L'émerine

L'émerine, codée par le gène *EMD*, est ancrée à la membrane interne nucléaire via un domaine hydrophobe carboxy-terminal, alors que son domaine amino-terminal est nucléoplasmique. Elle fait partie des protéines à domaine LEM (LAP2, Emerine, MAN1). Ce domaine, de 43 acides aminés environ, contient deux hélices- α et interagit avec BAF (*Barrier to Autointegration Factor*), une protéine nucléoplasmique qui lie l'ADN. L'émerine interagit de plus avec Btf, un répresseur transcriptionnel de l'apoptose (Haraguchi et al. 2004). Comme montré par double hybride et par *blot overlay*, le domaine central de l'émerine interagit avec les lamines A/C entre les résidus 384 et 566 (Sakaki et al. 2001; K. K. Lee et al. 2001). Des mutations du gène *EMD* qui conduisent à l'absence d'émerine ou plus rarement à l'expression de mutants faux-sens sont responsables d'une pathologie, la dystrophie musculaire de type Emery-Dreifuss liée à l'X (X-EDMD). A noter que des mutations dans le gène *LMNA* codant les lamines de type A peuvent également causer une pathologie EDMD (voir « Chapitre 4 Les laminopathies »).

2. MAN1

MAN1 est également une protéine qui possède un domaine LEM, et qui donc peut également interagir avec BAF. MAN1 possède deux domaines transmembranaires et ses domaines C et N-terminaux sont nucléoplasmiques. Le domaine C-terminal a un site de liaison pour les protéines Smad1, Smad2 et Smad3, qui participent à la régulation de la transcription de gènes. Ainsi, en

séquestrant les Smads à la périphérie du noyau, MAN1 contribue à la régulation de voies de signalisation telles que BMP (*Bone-Morphogenic Protein*) et TGF- β (*Transforming Growth Factor- β*) (Hellemans et al. 2004; Pan et al. 2005; Lin et al. 2005). Des mutations dans le gène codant MAN1, qui causent la perte de fonction de MAN1, sont responsables de maladies caractérisées par l'augmentation de la densité osseuse. MAN1 est un partenaire direct des lamines de type A et de l'émerine (Mansharamani and Wilson 2005).

3. LEM2

LEM2 est également une protéine de la famille des protéines LEM. Il a été montré en 2005 par *blot overlay* qu'elle interagit avec la queue de la lamine C (Brachner et al. 2005). Des cellules HeLa et U2OS n'exprimant plus LEM2 présentent de sévères dysmorphies nucléaires, ainsi il semblerait que LEM2 ait un rôle critique pour la morphologie de l'enveloppe nucléaire (Ulbert et al. 2006).

B. Les pores nucléaires

Dans les cellules de vertébrés, les pores nucléaires font partie des complexes macromoléculaires les plus gros, avec une masse moléculaire de 125 MDa. Ils permettent les échanges de molécules (protéines, complexes protéine-ARNs) entre le noyau et le cytoplasme. L'hétérochromatine s'associe avec l'enveloppe nucléaire interne mais elle est exclue des régions contenant les pores nucléaires. A l'inverse, ces régions contiennent de l'euchromatine transcriptionnellement active.

Il existe une cinquantaine de protéines appelées nucléoporines qui composent les pores nucléaires. Certaines de ces nucléoporines sont des partenaires des lamines. En effet il a été montré que Nup153 avait plusieurs sites de liaison pour les lamines de types A et B (Al-Haboubi et al. 2011). Et alors que Nup88 se lie aux lamines de type A, les lamines B1 et B2 ne font pas partie de ses partenaires (Lussi et al. 2011).

C. Le complexe LINC

En 2005 a émergé un modèle selon lequel le complexe protéique LINC (*Linkers of the nucleoskeleton to the cytoskeleton*), ferait le lien entre le nucléosquelette et le cytosquelette, via l'interaction dans l'espace périnucléaire entre des protéines à domaines SUN et des protéines à domaine KASH (comme les nesprines (*Nuclear envelope spectrin repeat proteins*) (Padmakumar et al. 2005; Crisp et al. 2006) (Figure 23).

Le domaine SUN est très conservé au cours de l'évolution des plantes aux mammifères. A ce jour, plusieurs protéines SUN ont été découvertes chez les mammifères, telles que SUN1, SUN2, SUN3, SPAG4 et SPAG4L. Un domaine transmembranaire permet leur insertion dans la membrane nucléaire interne alors que le domaine SUN situé en C-terminal émerge dans le lumen de l'enveloppe nucléaire (Hodzic et al. 2004; Padmakumar et al. 2005), où il interagit avec le domaine KASH des protéines partenaires, elles même insérées dans la membrane nucléaire externe. Côté noyau, SUN1 et SUN2 peuvent interagir avec les lamines de type A via leur domaine N-terminal (Crisp et al. 2006;

Haque et al. 2006). Il a été montré récemment que les protéines SUN forment des trimères (Sosa et al. 2012)

Dans la famille des nesprines, certaines sont localisées côté noyau où elles sont alors capables d'interagir avec les lamines. C'est le cas de la nesprine 1 α et de la nesprine 2, qui interagissent avec la partie commune des lamines A et C en C-terminal (Mislow et al. 2002; Crisp et al. 2006).

D. c-Fos

c-Fos est un facteur de transcription qui forme des hétérodimères avec c-jun via leur domaine en leucine zipper. Ils forment ainsi le complexe AP-1 (*Activating Protein 1*) qui se lie à l'ADN, permettant l'induction de la transcription des gènes cibles. En liant c-Fos au niveau de l'enveloppe nucléaire, les lamines A/C inhibent la fonction d'AP-1 (Ivorra et al. 2006).

E. Autres partenaires

Nous pouvons également noter comme partenaires des lamines les protéines MLIP (*Muscle-enriched A-type Lamin Interacting Protein*) (Ahmady et al. 2011) et NET39 (*NL-associated NE Transmembrane protein*) (G.-H. Liu et al. 2009). MLIP est exprimée de manière ubiquitaire et est prédominant dans le cœur, et les muscles squelettiques et lisses. Elle interagit et co-localise avec les lamines A/C à l'enveloppe nucléaire. MLIP co-localise également avec les protéines PLM (*Promyelocytic Leukemia Protein*) dans les PLM bodies impliqués dans des processus tels que les modifications post-traductionnelles, la régulation de la transcription, la réponse aux dommages de l'ADN et l'apoptose. NET39 est aussi fortement exprimée dans les muscles squelettiques et cardiaques et participe à l'homéostasie et à la régénération du muscle (G.-H. Liu et al. 2009).

II. Les partenaires nucléoplasmiques des lamines

A. LAP2 α

Les LAPs (protéines associées aux lamines) se divisent en deux groupes en fonction du gène qui les code, les LAP1 et les LAP2. Les LAP1 se composent de trois protéines LAP1A, 1B et 1C produites par épissage alternatif. Toutes les isoformes de LAP2 partagent les mêmes 187 premiers résidus en N-terminal, comportant le domaine-LEM, qui permet l'interaction avec l'ADN de manière séquence-dépendante via la protéine adaptatrice BAF (Cai et al. 2001). Ces protéines ont également un domaine en N-terminal capable d'interagir directement avec l'ADN. LAP2 α , qui nous intéresse plus précisément, est l'un des six variants suite à l'épissage du gène *LAP2* (à l'origine nommé *TMPO*) (Berger et al. 1996; Harris et al. 1994). Il se distingue des autres isoformes de LAP2 par son domaine C-terminal qui contient un domaine d'association à la chromatine supplémentaire (Gajewski et al. 2004) ainsi qu'un site d'interaction à la protéine Rb (Dorner et al. 2006; Markiewicz et al. 2002). Ce domaine C-terminal lui confère aussi la particularité d'être une protéine non membranaire mais localisée au sein du nucléoplasme (Dechat et al. 2004; Vlcek et al. 1999). Contrairement à LAP2 β qui

est membranaire et se lie aux lamines de type B à l'enveloppe nucléaire, LAP2 α lie les lamines de type A dans le nucléoplasme (Dechat et al. 2000).

L'interaction spécifique entre les lamines de type A et LAP2 α a été largement étudiée par différentes techniques, comme l'immunoprécipitation, des analyses de co-localisation cycle cellulaire-dépendantes ou encore des expériences de pull-down (Dechat et al. 2000; Dechat et al. 2004; Roux et al. 2012; Taylor et al. 2005). Ces études ont mis en évidence l'interaction directe des lamines A/C avec LAP2 α via leur queues en C-terminal. Les complexes nucléoplasmiques lamines A/C-LAP2 α existent en G1 et au début de la phase S des cellules en prolifération mais sont absents au cours de la mitose (Dechat et al. 2004; Naetar and Foisner 2014).

LAP2 α est impliquée dans la régulation et de la stabilisation du pool nucléoplasmique des lamines A/C. En effet, dans les cellules et tissus épithéliaux dérivés des souris LAP2 α -déficientes, les lamines de type A se localisent uniquement au niveau de la lamina et sont absentes du nucléoplasme (Naetar et al. 2008). De plus, au cours de la différenciation myogénique, la perte du pool nucléoplasmique des lamines de type A corrèle avec la diminution du niveau de LAP2 α (Markiewicz et al. 2005).

Deux hypothèses pour expliquer le mécanisme par lequel LAP2 α affecte les lamines nucléoplasmiques ont été proposées. Après la mitose, au cours de la phase G1, les lamines de type A (issues de la cellule avant division ou nouvellement synthétisées) interagiraient avec LAP2 α dans le nucléoplasme de manière transitoire, avant de s'assembler au niveau de la lamina. Alternativement, on peut imaginer que les lamines de type A soient échangées de manière dynamique entre la périphérie nucléaire et le nucléoplasme et que cet échange dépende de leur interaction avec certains partenaires, comme LAP2 α , et possiblement aussi de leurs modifications post-traductionnelles.

B. Rb

Le produit du gène rétinoblastome (*RB-1*), pRB, et ses homo- et paralogues p107 et p130, appelés collectivement « protéines de poche », ont été impliqués dans une variété de processus cellulaires mais sont particulièrement connus pour être des régulateurs du cycle cellulaire.

Il a été montré par co-immunoprécipitation à partir de lysats cellulaires interphasiques et à partir d'études de liaisons *in vitro* que les lamines de type A, ainsi que LAP2 α , formaient un complexe avec la forme hypophosphorylée de la protéine pRb (Markiewicz 2002).

Les détails de l'implication du complexe pRb/LAP2 α /Lamines A/C dans la régulation du cycle cellulaire et de la différenciation musculaire sont développés dans le paragraphe « Contrôle du cycle cellulaire et régulation de Rb ».

C. BAF

La petite protéine BAF de 10 kDa a tout d'abord été découverte comme une protéine hôte bloquant l'intégration délétère d'ADN viral en formant, avec LAP2 α , un complexe de pré-intégration du virus (Suzuki et al. 2004). Plus tard, il a été découvert que BAF était impliqué dans d'autres

processus cellulaires nombreux, tels que la mitose, l'assemblage post-mitotique du noyau, la régulation des gènes et de la chromatine et la réponse aux dommages de l'ADN.

Parmi ses partenaires, on compte des protéines avec des domaines LEM, comme l'émerine, MAN1 ou LAP2 α (Cai et al. 2001) mais aussi la lamine A qui s'y lie faiblement mais directement (K_d de 1 μ M) (Holaska et al. 2003).

D. F-actine

Les lamines interagissent directement avec la F-actine nucléaire. Les lamines de type A ont deux domaines de liaison à l'actine, le premier dans l'Ig-fold entre les résidus 461 et 536, le deuxième dans la région C-terminale spécifique de la lamine A, entre les résidus 564 et 608. De plus il a été montré que la queue de la lamine A mature se liait de manière plus efficace que la queue de la pré-lamine A. Ces résultats suggèrent que les interactions entre lamines et l'actine pourraient avoir une importance sur les rôles de l'actine et donc sur la réorganisation de la chromatine et la transcription (Simon et al. 2010).

E. SREBP1c

Les SREBP1s (*Sterol regulatory element binding protein-1*) font partie de la famille des facteurs de transcription à domaine bHLH-Zip (*basic Helix-loop-helix leucine zipper*). Il existe deux isoformes majoritaires (1a et 1c) qui proviennent du même gène *SREBP1* par épissage alternatif au niveau de l'exon 1. SREBP1a et SREBP1c sont exprimés dans des rapports différents selon les tissus. Alors que SREBP1c (*Adipocyte Determination Differentiation factor 1*) est exprimé majoritairement dans le foie, la glande surrénale, les tissus adipeux et le muscle squelettique, SREBP1a est exprimé principalement dans la rate et la thyroïde. Associés sous forme de dimères, ils se lient à des séquences d'ADN spécifiques, appelées SRE (*sterol regulatory element*), au sein des promoteurs de gènes.

La fonction des protéines SREBP1 dans les tissus adipeux a été particulièrement étudiée. Elles régulent la transcription de gènes impliqués dans le métabolisme des lipides et du cholestérol, et jouent un rôle critique au cours de la différenciation adipocytaire. Cependant il a été montré qu'elles avaient également un rôle dans le muscle squelettique. En effet, la surexpression de SREBP1a et SREBP1c inhibe la différenciation des myoblastes en myotubes et induit *in vivo* et *in vitro* une atrophie musculaire en raison de l'activation de deux gènes cibles de SREBP1, *BHLHB2* et *BHLHB3*, deux répresseurs transcriptionnels (Rome et al. 2008; Lecomte et al. 2010; Dessalle et al. 2012).

Il a été montré en 2002 par double hybride que SREBP1 était un partenaire des lamines de type A dans les tissus adipeux (Lloyd et al. 2002). Par la suite, notre équipe a précisé que l'interaction se faisait entre le domaine bHLH-Zip des SREBP1s et un domaine de la région C-terminale commun aux lamines A et C (a.a. 389-566) (Duband-Goulet et al. 2011).

L'activité de SREBP1 varie en fonction des modifications post-traductionnelles qu'elle subit. Ainsi, lorsque SIRT1 désacétyle SREBP1c, elle inhibe son activité de régulation du métabolisme lipidique (Ponugoti et al. 2010). Or, SIRT1 est lui-même un partenaire des lamines A (B. Liu et al. 2012). Ces données suggèrent que les lamines A pourraient réguler l'activité de SREBP1 de deux façons, directement en liant SREBP1 et/ou indirectement en liant SIRT1.

F. Titine

La titine est l'une des plus grosses protéines du corps humain dont l'isoforme la plus grosse a un poids moléculaire de 4,2 MDa. Les isoformes cytoplasmiques de la titine sont impliquées dans l'organisation des sarcomères des muscles ainsi que dans leurs propriétés d'élasticité (Tskhovrebova and Trinick 2003). Cependant, dans les cellules non-musculaires, les isoformes nucléaires de la titine sont essentielles pour la condensation des chromosomes et leur ségrégation au cours de la mitose (Machado and Andrew 2000; Machado et al. 1998). La région C-terminale des isoformes de titine nucléaires interagissent avec les lamines de type A et de type B *in vitro* et *in vivo* (Zastrow et al. 2006).

III. Les lamines lient la chromatine et l'ADN

Les lamines possèdent au moins deux régions de liaison à la chromatine via l'ADN et/ou les histones. L'une d'elles comprend le domaine NLS, et l'autre correspond à une sous-région de l'extrémité C-terminale commune aux lamines A et C (a.a 607-646) (Taniura et al. 1995; Bruston et al. 2010). Environ 1300 domaines associés à la lamina (LADs) ont été identifiés dans des cellules humaines et murines grâce à la technique d'identification par méthyltransferase d'adénine de l'ADN (DamID) en se basant sur la lamine B1 (Guelen et al. 2008; Peric-Hupkes et al. 2010; Meuleman et al. 2013b). Deux méthodes de préparation de la chromatine ont mis en évidence le même ordre de grandeur de génome total lié aux lamines, 730 megabases (mb) soit 23% du génome entier (Lund et al. 2015). Chaque LAD couvre de 0,1 à 10 mb de génome linéaire (Kind and van Steensel 2010; Guelen et al. 2008). Tous les chromosomes ont des domaines qui interagissent avec les lamines A mais les chromosomes 1, 11, 21 et X sont ceux qui sont le plus enrichis (Lund et al. 2013). Il n'y a cependant pas d'évidence d'une « région chromosomique » particulière (télomériques, sub-télomériques, centromériques...) qui serait impliquée dans la liaison avec les lamines. Il semble que les LADs soient conservés à 75% dans les différents types cellulaires. Quant aux 25% des LADs restants, ils pourraient contribuer à la définition de l'identité cellulaire (Meuleman et al. 2013a).

Les LADs sont généralement dans des domaines de la chromatine transcriptionnellement répressive et par conséquent, soit ils sont pauvres en gènes soit ils contiennent des gènes qui sont silencieux ou exprimés faiblement (Pickersgill et al. 2006; Guelen et al. 2008; Reddy et al. 2008; Towbin et al. 2012; Zullo et al. 2012). Cependant, certains gènes localisés au sein de LADs ou même à l'extérieur de LADs mais liés aux lamines peuvent être exprimés (Lund et al. 2013; Guelen et al. 2008). Ces gènes pourraient faire partie de l'euchromatine située dans le nucléoplasme. En accord avec cette hypothèse, il a été montré par ChIP (*Chromatin-ImmunoPrecipitation*) et 3D immuno-FISH (*fluorescent in situ hybridization*) dans des cellules souches du tissu adipeux (ASC) qu'il y avait des interactions entre les lamines et les promoteurs de gènes à la périphérie nucléaire mais aussi au sein du noyau et notamment au niveau de domaines de la chromatine présentant des caractéristiques d'euchromatine (Lund et al. 2013). En conclusion, les lamines ne confèrent pas d'elles-mêmes la répression transcriptionnelle dans leur voisinage via leur interaction avec des régions du génome,

mais elles seraient plutôt capables de moduler la transcription d'une manière dépendante des marques épigénétiques de la chromatine.

L'association des lamines avec le génome varie non seulement entre les différents lignages cellulaires mais également au sein d'un lignage cellulaire en fonction du processus de différenciation cellulaire. Dans les ASCs (*Adipocyte Stem Cells*) non différenciées, les promoteurs de nombreux gènes réprimés mais requis pour la différenciation lignage-spécifique (différenciation en os, cartilage, muscle ou encore pancréas) interagissent avec la lamine A (Lund et al. 2013). La différenciation adipogénique change considérablement l'identité des promoteurs de gènes liés par les lamines A, avec une dissociation et association *de novo* de gènes impliqués dans les fonctions de processus métabolique, de signalisation intracellulaire, de régulation de la transcription et de la différenciation (Lund et al. 2013). Notons notamment que le gène PPARG codant un régulateur majeur de l'adipogenèse est lié par la lamine A lorsqu'il n'est pas transcrit dans les ASCs alors que ce gène n'est plus lié par la lamine A lorsqu'il est transcrit dans les adipocytes. Ainsi, lors du processus de différenciation adipoblaste-adipocyte, il y aurait une dissociation ou relâchement de gènes silencieux localisés à la périphérie nucléaire suivi de leur relocalisation à l'intérieur du noyau, corrélée avec leur expression (Figure 17).

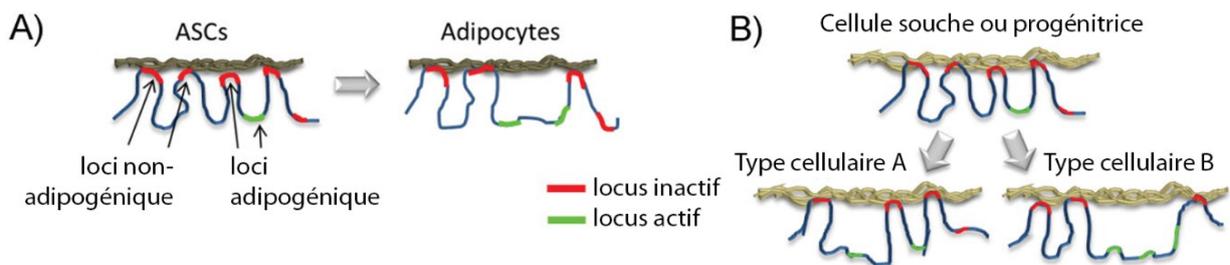


Figure 17 : Dissociation des loci en fonction du lignage cellulaire.
(Adapté de (Collas et al. 2014))

Chapitre 3

Les divers rôles des lamines de type A au sein de la cellule

Chapitre 3 Les divers rôles des lamines de type A au sein de la cellule

Du fait des nombreux partenaires des lamines, ces dernières ont de divers rôles au sein de la cellule. Elles participent notamment à l'organisation du génome, à la régulation de l'expression génique, à faire la connexion avec le cytosquelette, à supporter mécaniquement l'enveloppe nucléaire, à réparer l'ADN, à la régulation du cycle cellulaire ou encore au développement ou à la régénération du muscle. Certaines de ces fonctions sont détaillées ci-dessous. Dans certains cas nous évoquerons également les conséquences de mutations dans le gène *LMNA* sur ces fonctions, se référer au « Chapitre 4 Les laminopathies » pour la description clinique des laminopathies.

I. Soutien mécanique du noyau

Les lamines de type A sont essentielles au soutien mécanique du noyau. En effet les noyaux dépourvus de lamine A/C présentent des dysmorphies, sont plus déformables et plus fragiles que les noyaux sauvages, ce qui va avoir un impact direct sur la viabilité des cellules (Nikolova et al. 2004; Lammerding et al. 2006). De plus l'absence de lamine A/C dans les cellules souches embryonnaires a été suggéré comme source de malléabilité et de déformabilité des noyaux de ce type cellulaire (Pajerowski et al. 2007). Il a également été montré qu'alors que les lamines de type B étaient responsables de l'élasticité du noyau, lui permettant de retourner à une forme normale après déformation, la lamine A elle contribue à la viscosité à l'intérieur du noyau empêchant la déformation de ce dernier (Swift et al. 2013). Un niveau d'expression faible de la lamine A tel qu'on le retrouve dans les tissus mous (tissu adipeux, cerveau) ne permet pas de protéger efficacement le noyau contre un stress mécanique intense qui déstabilise la chromatine, mais un niveau d'expression de lamine A élevée (30 fois supérieur) tel qu'on le retrouve dans des tissus durs (muscles, os) permet de réduire la distension du noyau (Swift et al. 2013). Ainsi, particulièrement dans les tissus soumis à des stress mécaniques intenses comme les muscles, la lamine A contribue à réguler la rigidité des noyaux et à préserver l'intégrité des territoires chromosomiques (Swift et al. 2013).

II. Organisation du génome

Du fait de leur capacité à interagir avec l'ADN et la chromatine, les lamines jouent un rôle dans l'organisation du génome. Leur participation dans l'ancrage de l'hétérochromatine silencieuse à la périphérie des noyaux est supportée par différentes études. En exemple, des cardiomyocytes et des MEFs (*Mouse Embryonic Fibroblast*) dérivés de souris *Lmna*^{-/-}, présentent une perte partielle de l'hétérochromatine périphérique ainsi qu'une condensation des territoires chromosomiques et un mauvais positionnement de l'hétérochromatine centromérique (Galiová et al. 2008; Nikolova et al.

2004; Sullivan et al. 1999). Divers mutants de lamines peuvent également avoir un impact sur la localisation subnucléaire de l'hétérochromatine (Ognibene et al. 1999; Scaffidi and Misteli 2006; Vigouroux et al. 2001). Ces changements au niveau de la chromatine sont souvent associés à des altérations au niveau épigénétique, comme par exemple dans le contexte de la progeria avec une baisse du niveau des marqueurs d'hétérochromatine H3K9me3 et H3K27me3 et une augmentation du niveau de H4K20me3 (Shumaker et al. 2006). Le fait que les lamines de type A et B lient des régions du génome en partie communes et distinctes, indique la non redondance de ces 2 types de lamines pour organiser le génome. Dans les cellules n'exprimant que les lamines de type B, l'ancrage de l'hétérochromatine à la périphérie nucléaire impliquerait son partenaire LBR (récepteur à la lamine B), une protéine intégrale de la membrane nucléaire interne qui elle-même lie les protéines HP1s (protéine de l'hétérochromatine) (Solovei et al. 2013). Dans les cellules plus avancées dans le processus de différenciation et qui expriment les lamines de type B et de type A, l'ancrage de l'hétérochromatine à la périphérie nucléaire impliquerait les lamines A/C avec certains de leurs partenaires, comme les protéines à domaine LEM (LAP2, emerin, MAN1) (Solovei et al. 2013). De manière intéressante, parce qu'elle lie HDAC3, l'émerine contribuerait à maintenir une chromatine silencieuse à la périphérie nucléaire. En organisant le génome, les lamines contribuent à réguler l'expression de gènes qui varie notamment lors du processus de différenciation cellulaire. De plus, les lamines A/C sont aussi capables de jouer sur l'expression de gènes en interagissant avec divers facteurs (voir ci-dessous).

III. Régulation de l'expression de gènes via la liaison des lamines à différents facteurs

Les lamines de type A lient et régulent la stabilité et/ou fonction de protéines régulatrices de l'expression de gènes tels que Rb et de facteurs de transcription tels que MOK2, c-Fos ou SREBP1 (Johnson et al. 2004; Dreuillet et al. 2008; Ivorra et al. 2006; Vadrot et al. 2014).

Les lamines de type A lient également différentes enzymes impliquées dans la régulation des modifications épigénétiques. La lamine A lie et active SIRT1 qui est impliquée dans la désacétylation des histones H3 (H3K9, K14) et H4 (H4K16) (B. Liu et al. 2012). La lamine A (surtout le précurseur prélamine A ou le mutant progérine associées à des pathologies) lie, protège de la dégradation par le protéasome et augmente l'activité de Suv39h1 impliquée dans la triméthylation de H3K9 (B. Liu et al. 2012). A noter que la présence des marques épigénétiques H3K9me3 qui sont reconnues par les protéines HP1, lesquelles sont liées par LBR, est essentielle pour ancrer l'hétérochromatine constitutive à la périphérie nucléaire.

IV. Organisation de l'enveloppe nucléaire

Les lamines de type A contribuent à l'organisation de l'enveloppe nucléaire. En effet, les noyaux de MEFs de souris exprimant une lamine A tronquée en faible quantité ont une perte des lamines de type B, de LAP2 et de Nup153 localement à un pôle (Sullivan et al. 1999), alors que

l'émerine et les nesprines qui perdent leur ancrage à la membrane nucléaire interne sont délocalisées dans le réticulum endoplasmique (Sullivan et al. 1999; Nikolova et al. 2004; Lammerding et al. 2004; Broers et al. 2005; Lammerding et al. 2005; Mislow et al. 2002) et ce, également dans des cellules humaines dépourvues de lamines A/C (Muchir et al. 2003). La lamina assure aussi l'ancrage des pores à l'enveloppe nucléaire et les maintient à une distance contrôlée les uns des autres. C'est pourquoi, l'expression de lamines mutantes, en altérant le réseau de lamina, induit une distribution anormale des pores à l'enveloppe nucléaire (Dwyer and Blobel 1976; Lenz-Böhme et al. 1997; Buendia et al. 1999; Daigle et al. 2001).

V. Organisation et connexion avec le cytosquelette.

Des MEFs provenant de souris *Lmna*-null montrent des anomalies dans l'organisation des différents éléments du cytosquelette. L'altération de la localisation et de l'état de polymérisation des filaments d'actine qui est observée pourrait perturber la motilité des cellules (Broers et al. 2004; J. S. H. Lee et al. 2007). La désorganisation des microtubules (Broers et al. 2005), quant à elle pourrait entraîner une perte de la polarisation des cellules au cours de la migration due à une rupture de la connexion entre le centre organisateur des microtubules (MTOC) et le noyau (J. S. H. Lee et al. 2007; Hale et al. 2008). La désorganisation de la vimentine serait impliquée dans la diminution de la résistance aux charges mécaniques (Ingber 2003) alors que les perturbations du réseau de desmine seraient impliquées dans le dysfonctionnement du muscle cardiaque observé dans les souris *Lmna*-null (Nikolova et al. 2004; Broers et al. 2005).

De plus, comme nous l'avons vu, en interagissant avec des protéines du complexe LINC, (SUN1 et SUN2), les lamines de type A participent à la connexion entre le cytosquelette et le noyau, et conséquemment à diverses fonctions telles que la migration des cellules, ainsi que la position, la morphologie et la mécanique du noyau (Malone et al. 1999; Starr and Han 2003).

VI. Transduction du signal

Les lamines de type A ont de nombreux partenaires impliqués dans diverses voies de signalisation (MAPKs, TGF β /BMP, akt, Rb, ou encore dans celle de la β -caténine), de ce fait les lamines contribuent à la régulation de ces voies.

A. Contrôle du cycle cellulaire et régulation de Rb

En absence de signaux mitogènes pRb est hypo-phosphorylée, se lie à E2F et inhibe la transcription des gènes cibles de E2F, permettant aux cellules de quitter le cycle cellulaire (Figure 18). En présence de signaux mitogènes, pRb est hyper-phosphorylée par des kinases cycline-dépendantes et ne lie plus E2F. Le facteur E2F est alors libre d'activer la transcription de ses gènes cibles, permettant ainsi la progression du cycle cellulaire. Cependant, l'absence de lamines A/C a été rapportée comme soit stimulant (Johnson et al. 2004; Van Berlo et al. 2005) soit inhibant la

prolifération cellulaire (fibroblastes humain diploïdes (Muchir et al. 2003; R. D. Goldman et al. 2004; Pekovic et al. 2007)).

Dans le contexte de la différenciation adipocytaire, il a été proposé que c'est le complexe LAP2 α –lamine A/C qui lie pRb qui serait essentiel pour l'étape initiale de la différenciation mais pas pour l'étape de différenciation terminale (Dorner et al. 2006).

Lors de la différenciation myogénique, pRb hypo-phosphorylée forme aussi un complexe avec LAP2 α et les lamines A/C, permettant l'activation des gènes cibles du facteur de transcription MyoD. A l'inverse, tant que pRb est hyper-phosphorylée, le complexe ne se forme pas et la myogenèse est inhibée. Dans des souris *Lmna*^{-/-}, la voie pRb/MyoD est affectée, et des cibles de la signalisation de pRb telles que MyoD, la desmine et la M-cadhérine sont sous régulées. Ces cellules ont également une prolifération augmentée. (Frock et al. 2006). Cependant ce dernier point n'est pas confirmé dans une étude de 2013, où des cellules satellites de souris *Lmna*^{-/-} avaient une prolifération réduite (Cohen et al. 2013).

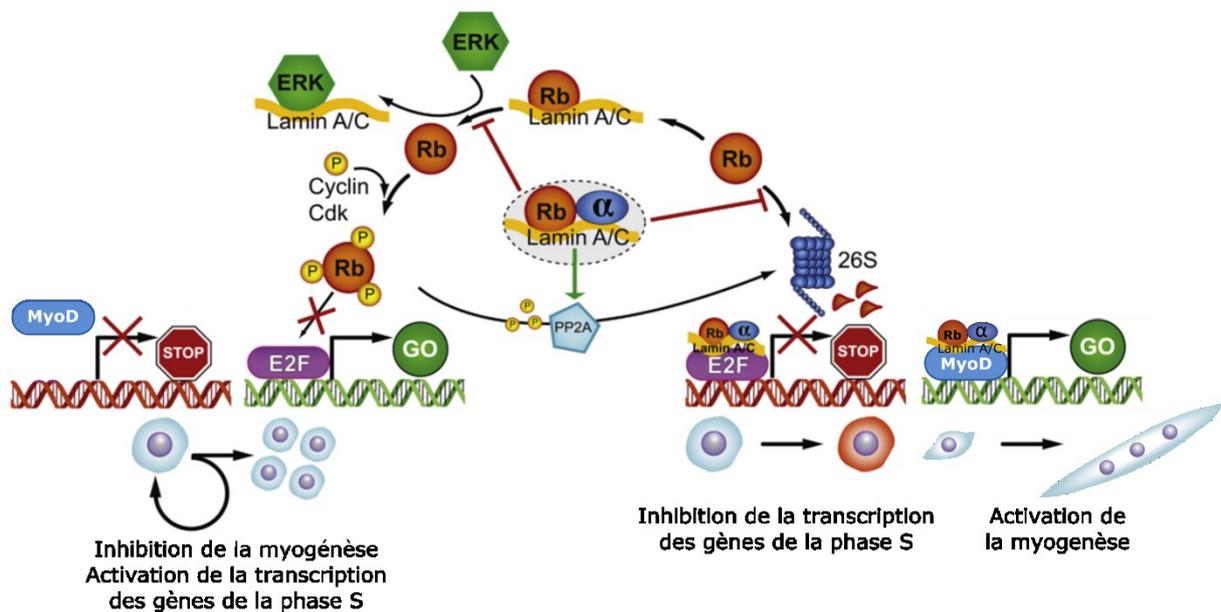


Figure 18 : Contrôle du cycle cellulaire par pRb
(Adapté de (Gesson et al. 2014))

Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer comment les lamines A/C nucléoplasmiques et LAP2 α affectaient la fonction de pRb (Gesson et al. 2014). (1) les lamines A/C pourraient stabiliser pRb puisqu'il a été montré dans les cellules dépourvues de lamines A/C que pRb était dégradé par le protéasome (Johnson et al. 2004). (2) Les lamines de type A pourraient servir de plateforme pour recruter pp2A et permettre la déphosphorylation de pRb. (3) L'interaction des lamines A/C avec pRb pourrait garder pRb sous sa forme active, soit l'état hypo-phosphorylé. (4) Un complexe composé de LAP2 α , les lamines A/C et pRb hypo-phosphorylé pourrait être impliqué dans la répression de l'expression des gènes cibles de E2F (Dorner et al. 2006).

B. Wnt

Les lamines de type A pourraient avoir un rôle indirect dans la régulation de la voie de signalisation Wnt, via leur partenaire, l'émerine. En effet, il a été montré qu'en empêchant

l'accumulation nucléaire de la β -caténine, l'émerine (localisée à l'enveloppe nucléaire) jouait un rôle dans la régulation de cette voie (Tilgner et al. 2009).

Les Wnt sont des protéines de signalisation impliquées dans de nombreuses activités au cours de l'embryogénèse, l'auto-renouvellement des tissus adultes (Clevers 2006) et la différenciation musculaire. La voie wnt affecte la distribution nucléocytoplasmique de β -caténine (Figure 19). Lorsque la voie wnt est inactive, la β -caténine est phosphorylée puis dégradée. A l'inverse, Lorsque la voie Wnt est active, la β -caténine n'est pas phosphorylée/dégradée et peut atteindre le noyau, où elle se lie à TCF (*T cell factor*)/ LEF (*lymphoid enhancer factor*) et induit l'expression de gènes cibles. Dans les cellules musculaires, la β -caténine peut aussi se lier directement à MyoD sans l'implication de TCF/LEF, et augmenter son activité transcriptionnelle (C.-H. Kim et al. 2008).

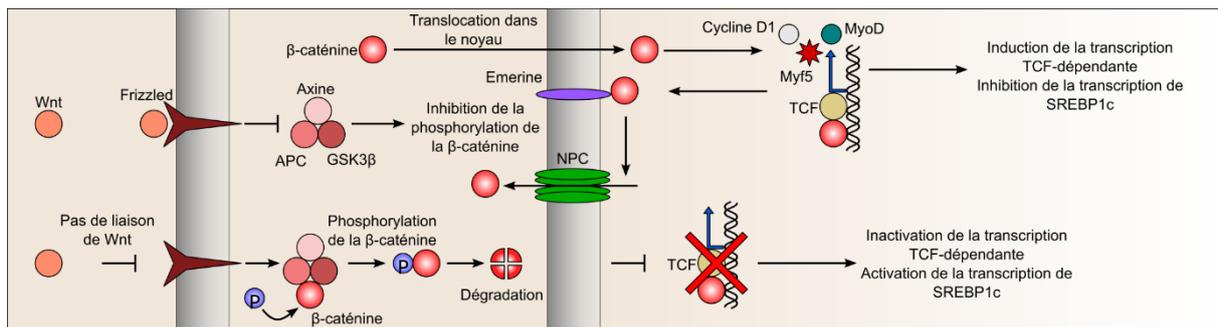


Figure 19 : Voies de signalisation de Wnt
 Inspiré de (Dubinska-Magiera et al. 2013)

Par ailleurs, l'émerine en jouant son rôle de régulation de la voie Wnt- β -caténine influence la différenciation adipogénique (Tilgner et al. 2009). En effet, l'inactivation de la transcription TCF-dépendante va de pair avec l'activation de la transcription de SREBP1c, qui, on le rappelle est un facteur de transcription partenaire des lamines A/C impliqué dans la différenciation adipogénique et myogénique.

C. MAPKs

La cascade MAPK-ERK1/2 est une des voies impliquées dans le contrôle de la prolifération, la croissance et la différenciation cellulaire (Figure 20). L'initiation de la voie de signalisation des MAPK (*Mitogen-activated protein kinase*) résulte de l'activation séquentielle de multiples kinases qui phosphorylent et activent p38, JNKs (*c-Jun N-terminal kinases*) et ERKs (*extracellular-signal-regulated kinases*) (Heineke and Molkenin 2006). Une fois activées, p38, JNKs et ERKs phosphorylent une multitude de substrats comme MEF (*mitogen-activated protein kinase kinase-enhancing factor*), c-jun et c-Fos, respectivement. Lorsque le facteur de transcription c-Fos est lié et séquestré par les lamines à l'enveloppe nucléaire, ce dernier ne forme plus le complexe AP-1 avec c-jun et les cellules restent à l'état quiescent (Ivorra et al. 2006). Lors de la stimulation mitogénique, ERK 1,2 devient phosphorylée et active. Liée par les lamines A/C à l'enveloppe nucléaire, ERK1,2 phosphorylera c-Fos qui sera alors libre d'aller dimériser avec c-jun et former le complexe AP-1 actif (González et al. 2008).

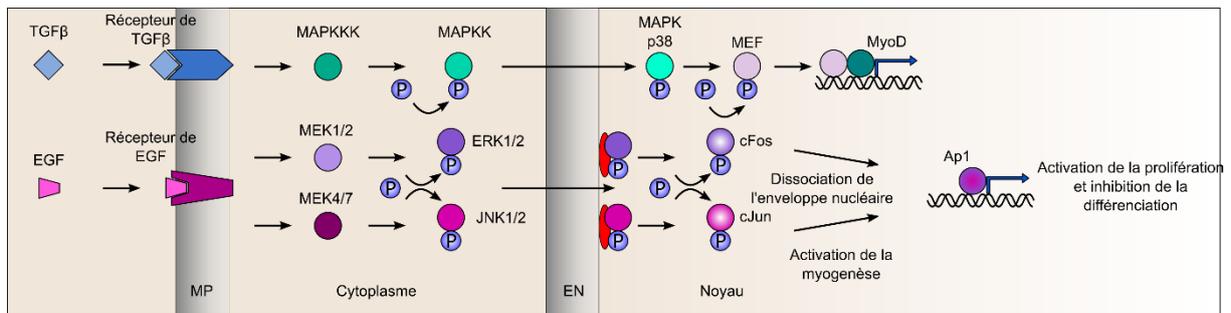


Figure 20 : Voie de signalisation des MAPKs
 Inspiré de (Dubinska-Magiera et al. 2013)

D. TGFβ/BMP

La voie de signalisation TGFβ/BMP/Activine agit via les protéines Smad1/5/8 ou via les protéines Smad2/3. Elles ciblent également des MAPK, telles que p38, JNK, ERK1/2, PKC, mTOR (*mammalian Target Of Rapamycin*) et la cofiline. Les lamines de type A interagissent avec les Smads 2/3, ce qui entraîne l'inhibition de la transcription TGFβ/Smad-dépendante. Ce phénomène est dû à la déphosphorylation des Smads par la kinase PP2A, qui est promue par les lamines (Van Berlo et al. 2005) (Figure 21).

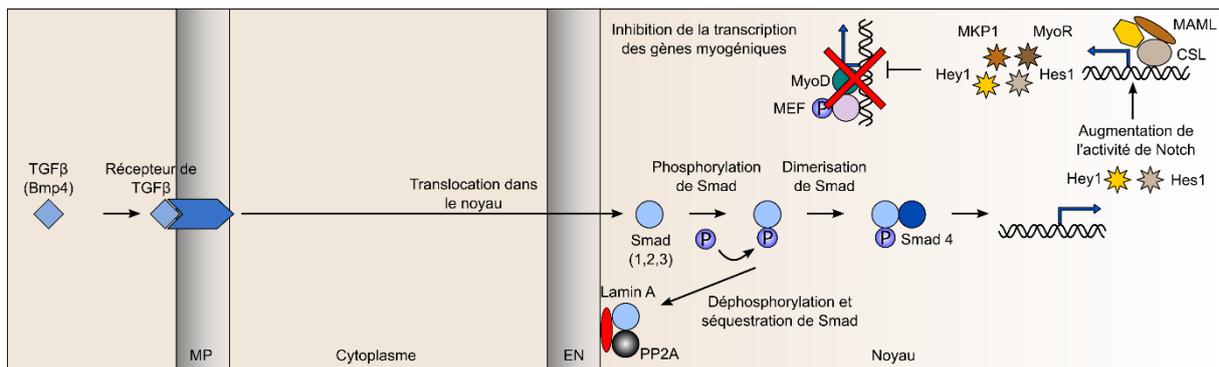


Figure 21 : Voie de signalisation de TGFβ
 Inspiré de (Dubinska-Magiera et al. 2013)

Comme nous l'avons déjà mentionné plus tôt, MAN1 qui est un partenaire des lamines de type A, est également un régulateur négatif de la transduction du signal régulée par les Smads (Lin et al. 2005)

E. Akt/mTOR

Les lamines pourraient également avoir un rôle dans la régulation de la voie Akt/mTOR via leur partenaire NET39. Il a été montré que la présence de NET39 dans les myoblastes régulait de manière négative la différenciation myogénique et ce grâce à son interaction avec la *Ser/Thr kinase* mTOR et par conséquent sa répression sur la sécrétion d'IGF-II (*Insulin-like Growth Factors II*) médiée par mTOR (G.-H. Liu et al. 2009). Notons que les IGF-I et IGF-II jouent un rôle critique dans la différenciation et la croissance du muscle squelettique, ainsi que dans la régénération et l'hypertrophie dans les cellules musculaires adultes (Florini et al. 1991; Musarò et al. 2004; Musarò et al. 2001) (Figure 22).

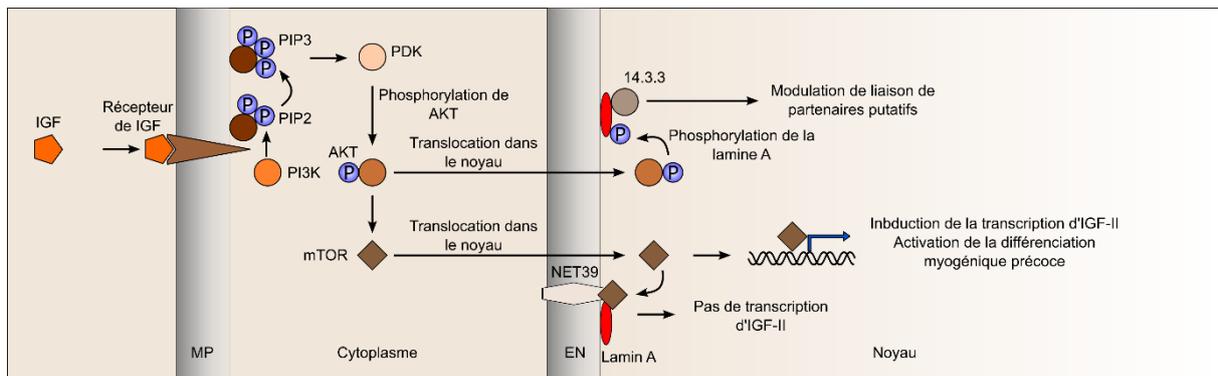


Figure 22 : Voie de signalisation Akt/mTOR
 Inspiré de (Dubinska-Magiera et al. 2013)

VII. Positionnement du noyau

Un mauvais positionnement du noyau peut mener à des dysfonctionnements sérieux réduisant la viabilité cellulaire. Les mécanismes de migration et de positionnement du noyau sont gouvernés par les différents éléments du cytosquelette (microtubules et les moteurs dynéines (Reinsch and Gönczy 1998; Reinsch and Karsenti 1997), actine (Starr and Han 2003)) qui sont connectés à l'enveloppe nucléaire via le complexe LINC. C'est en liant et retenant les protéines SUN à la membrane nucléaire interne que les lamines contribuent au positionnement/migration des noyaux. Au sein de myotubes, il a été montré que le positionnement des noyaux était sévèrement affecté en l'absence de pré-lamine A farnésylée (Mattioli et al. 2011).

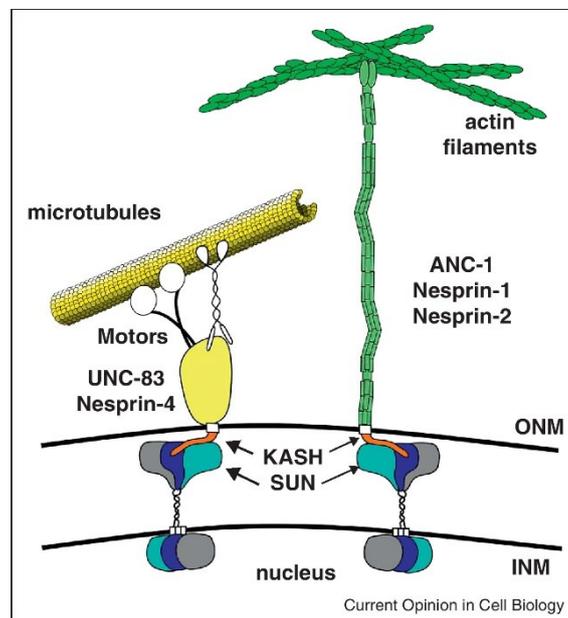


Figure 23 : Organisation du complexe LINC
 (Tapley and Starr 2013)

VIII. Réparation de l'ADN

53BP1 est une protéine clé dans le processus de réparation de l'ADN ayant subi une cassure double brin. Dans les cellules MEF sans lamines A/C, 53BP1 est instable, ce qui contribue à inhiber la réparation de l'ADN (Redwood et al. 2011).

Récemment, dans des fibroblastes de peau humains, les lamines A/C ont été montrées comme interagissant avec 53BP1, mais seulement en l'absence de dommage de l'ADN (Gibbs-Seymour et al. 2015). Les auteurs ont proposé un modèle où les lamines A/C garderaient 53BP1 dans le nucléoplasme, prêt à être recruté rapidement aux sites de réparation de l'ADN lorsque nécessaire.

Chapitre 4

Les laminopathies

Chapitre 4 Les laminopathies

En 1999, l'équipe du Dr Ketty Schwart identifiaient une mutation dans le gène *LMNA* codant les lamines de type A, responsable d'une dystrophie musculaire d'Emery-Dreifuss (EDMD) (Bonne et al. 1999). A partir de ce moment plusieurs centaines de mutations sur le gène *LMNA* ont été reconnues responsables d'une douzaine de désordres cliniques rares, alors appelés laminopathies (Figure 24). Par ailleurs, des mutations de gènes affectant d'autres protéines de l'enveloppe nucléaire ont aussi été décrites comme responsables de maladies nommées envelopopathies nucléaires (Tableau 2) (Worman et al. 2010).

Gène	Protéine	Maladie
<i>EMD</i>	Emerine	Cardiomyopathie et dystrophie musculaire
<i>LBR</i>	Récepteur de la lamine B	Anomalie de Pelger-Huët (hétérozygote) Dysplasie squelettique de Greenberg (homozygote)
<i>LEMD3</i>	MAN1	Dysplasie osseuse sclérotique
<i>SYNE1</i>	Nesprine-1	Ataxie cérébrale
<i>TMPO</i>	LAP2	Cardiomyopathie
<i>TOR1A</i>	Torsine A	Dystonie DYT1
<i>LMNB1</i>	Lamine B1	Leukodystrophie autosomique dominante de l'adulte
<i>LMNB2</i>	Lamine B2	Lipodystrophie partielle acquise
<i>ZMPSTE24</i>	Endoprotéase de la pré-lamine A	Desmopathie restrictive et désordres progeroïdes

Tableau 2 : Maladies causées par des mutations dans des gènes codant les lamines de type B ou des protéines associées à la lamina nucléaire.

Adapté de (Worman et al. 2010)

En fonction de l'identité de la mutation du gène *LMNA*, la pathologie affecte soit le muscle strié, les tissus adipeux, les nerfs périphériques ou des systèmes multiples comme dans le cas de vieillissement prématuré (Figure 24). Il arrive que des patients présentent des phénotypes dits mixtes, mais la plupart du temps cette classification est robuste.

Les mécanismes par lesquels les mutations dans les lamines A/C peuvent être responsables de phénotypes tissus-spécifiques sont mal connus. Plusieurs hypothèses non exclusives ont été proposées pour expliquer cette diversité de phénotypes : (1) L'hypothèse structurale suggère que les mutations des lamines pourraient altérer l'assemblage ou la stabilité des réseaux de lamines, rendant ainsi le noyau plus fragile et moins résistant au stress mécanique, causant des dommages structuraux et la mort cellulaire principalement dans des tissus sujets à ce type de stress, comme les cellules musculaires. (2) L'hypothèse concernant l'expression du génome propose que les mutations des lamines A/C altéreraient les interactions entre les lamines et des régulateurs transcriptionnels tissus-spécifiques. (3) La troisième hypothèse repose sur le fait que la majorité des tissus atteints par les laminopathies sont d'origine mésenchymateuse et propose que des mutations dans les lamines A/C altéreraient la maintenance et la fonction des cellules souches d'origine mésenchymateuse, causant ainsi une perte de la fonction tissulaire au cours du temps.

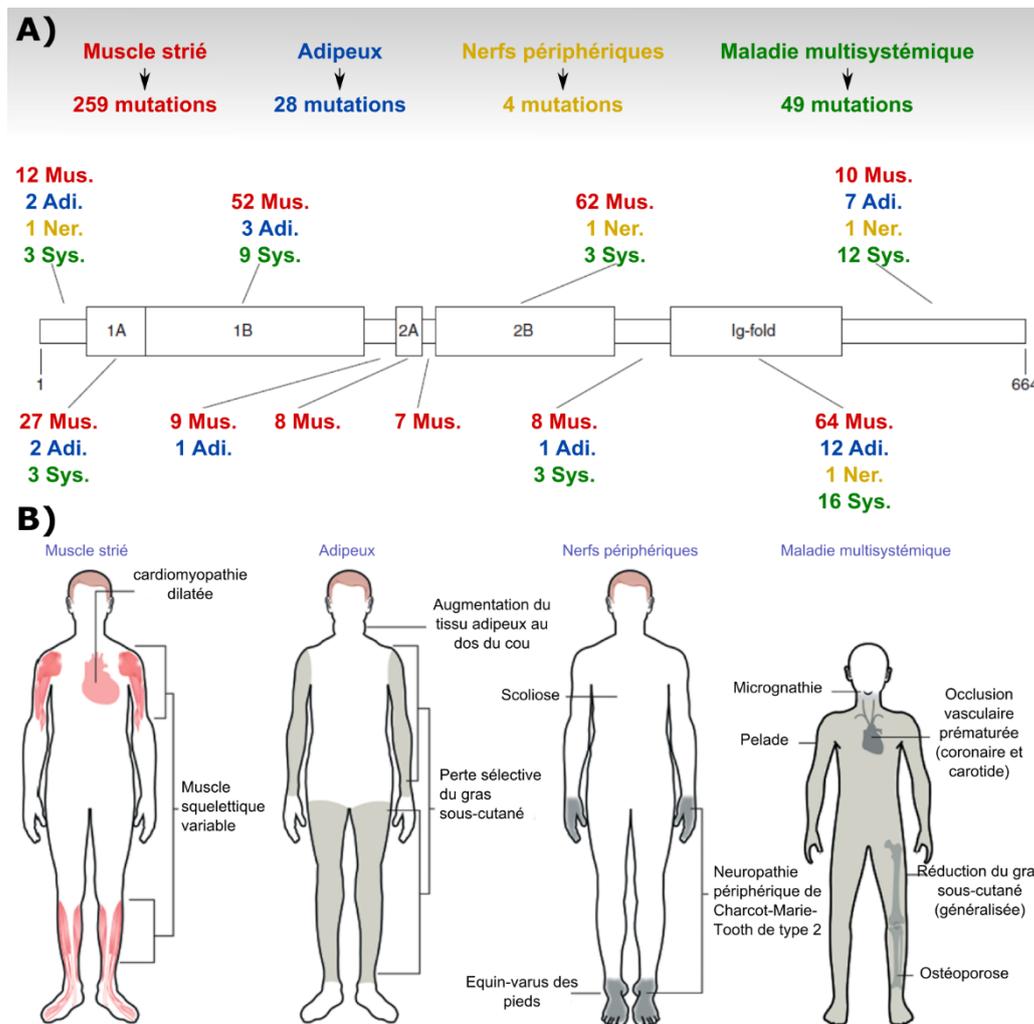


Figure 24 : Les laminopathies affectent différents tissus.

A) Localisation des mutations responsables de laminopathies en fonction des tissus atteints. Réalisé à partir des données de (Dittmer and Misteli 2011). **B)** Phénotypes tissu-spécifiques dans les laminopathies. Adapté de (Worman 2012)

Lorsque les lamines de type A sont absentes ($LMNA^{-/-}$) de cellules qui les expriment normalement, les noyaux ont une forme irrégulière avec des protubérances de l'enveloppe nucléaire d'où sont exclues les lamines B1 (Muchir et al. 2003). On peut également observer des regroupements de pores nucléaires, et un défaut d'ancrage de l'émerine à la membrane nucléaire interne avec sa redistribution dans les membranes du réticulum endoplasmique. De manière assez générale, il a aussi été observé une dysmorphie nucléaire dans les cellules exprimant des lamines mutées en des sites responsables de différentes classes de laminopathies.

I. Laminopathies touchant le muscle strié

Pour décrire les pathophysiologies de chaque classe de laminopathie, je me suis principalement inspirée des revues suivantes : (Worman and Bonne 2007; Cau et al. 2014; Maraldi et al. 2011; Wheeler and Ellis 2008; Dubinska-Magiera et al. 2013; Azibani et al. 2014)

A. Le muscle strié squelettique

Les muscles peuvent être considérés comme les moteurs de l'organisme, grâce à leurs propriétés d'excitabilité, de contractilité ou encore d'élasticité, ils permettent de générer force et mouvement. On distingue trois types de tissus musculaires : (1) le tissu musculaire strié squelettique, qui permet les mouvements volontaires sous contrôle du système nerveux dit cérébro-spinal (2) le tissu musculaire lisse qui permet les mouvements non volontaires sous contrôle du système nerveux dit autonome ou végétatif et (3) le tissu musculaire myocardique qui permet la contraction non volontaire du muscle strié cardiaque sous contrôle du système nerveux autonome. Les muscles squelettiques et cardiaques partagent ainsi la même organisation en muscle strié. Le muscle squelettique représente la fraction la plus importante du tissu musculaire et correspond à un tiers de la masse corporelle, il sera décrit un peu plus en détail dans les parties ci-dessous.

1. Anatomie

Les muscles squelettiques sont reliés au squelette osseux par les tendons situés en leur extrémité. C'est pourquoi, la contraction musculaire induit le mouvement du membre concerné (bras...). Les muscles squelettiques sont entourés d'un tissu conjonctif appelé epimysium. A l'intérieur on trouve les faisceaux musculaires eux même entourés d'un autre tissu conjonctif, le périmysium. Les faisceaux musculaires sont constitués de fibres musculaires entourées d'un autre tissu conjonctif, l'endomysium (Figure 25).

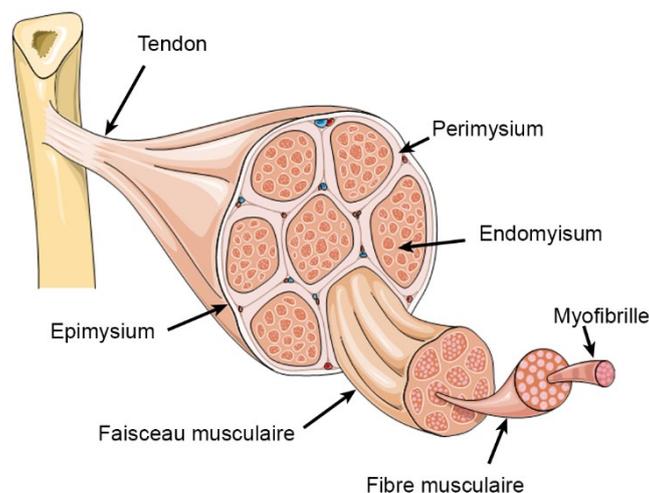


Figure 25 : Organisation du muscle strié squelettique et des myofibrilles
Adapté de eurostemcell.org

2. Différents type de fibres musculaires

Une fibre musculaire est une cellule allongée multi nucléée dont la longueur peut atteindre plusieurs centimètres et le diamètre varie entre 10 et 100 μm . On peut distinguer différents types de fibres musculaires selon leur taille, leur vascularité, leur contenu en mitochondries ou en glycogène. Ces différentes propriétés vont conférer aux fibres la capacité de réaliser des exercices plus ou moins intenses sur une durée plus ou moins longue. Les fibres de type I, dites lentes, sont très vascularisées et de petite taille, contiennent de nombreuses mitochondries et peu de glycogène et sont utilisées principalement pour des exercices peu puissants et prolongés tels que le maintien de la posture. A

l'inverse, les fibres de type II, dites rapides, sont peu vascularisées et ont un diamètre plus important, elles sont riches en glycogène mais pauvres en mitochondries. Ces fibres puissantes sont utilisées pour des exercices intenses mais brefs. Au sein des fibres de type II on distingue plusieurs sous classes : les fibres IIA, IIX et IIB et des intermédiaires (IIAX...). Le typage des fibres est caractéristique d'un muscle donné, mais il peut aussi varier en fonction de stimuli extérieurs. Par exemple, l'exercice physique induit une augmentation du métabolisme oxydatif associé à un changement progressif des fibres de type IIB en IIX, IIA puis I (Bassel-Duby and Olson 2006).

3. Organisation cellulaire

Les fibres musculaires sont entourées d'une membrane, le sarcolemme. A l'intérieur, le sarcoplasme, cytoplasme des fibres musculaires, contient les organites habituels d'une cellule eucaryote et un cytosquelette particulier organisé en myofibrille. Les myofibrilles sont composées d'une chaîne d'unités contractiles nommées sarcomères. Un sarcomère est la plus petite unité contractile du muscle et il est principalement constitué de filaments d'actine (filament fin) alignés qui se superposent à des filaments de myosine (filament épais). Par microscopie électronique, on observe différentes structures au sein d'un sarcomère (Figure 26). Les disques Z qui sont situés aux deux extrémités du sarcomère indiquent la région d'ancrage des filaments d'actine avec de part et d'autre les bandes I claires qui sont riches en actine et titine. Les bandes A sombres identifient les régions riches en myosine et actine. Au centre de la bande A, on distingue la zone H riche en myosine mais dépourvue d'actine. Au centre de la zone H, on note la ligne M qui correspond à un « réseau élastique » permettant d'attacher les filaments de myosine au centre du sarcomère.

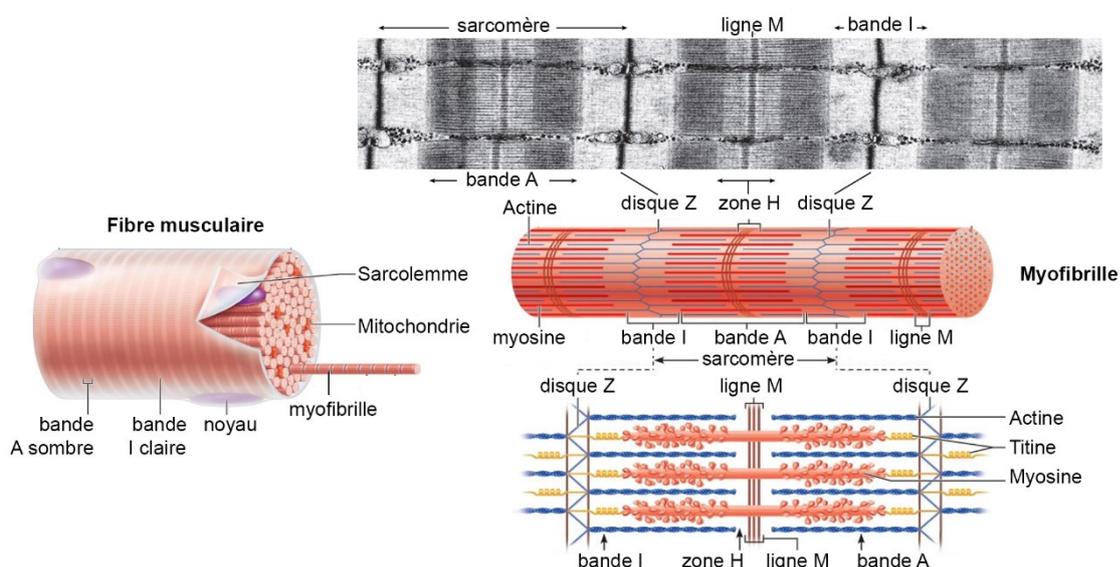


Figure 26 : Organisation d'une myofibrille en sarcomères

Microscopie électronique d'une myofibrille et schématisation de son organisation. La distance moyenne entre deux bandes Z dans un muscle squelettique strié humain au repos est de 3 μm . (Adapté de 2013 Pearson education, Inc. et www.ks.uiuc.edu)

4. Développement du muscle

Les cellules musculaires proviennent du mésoderme de l'embryon. Les cellules mesodermiques somitiques se déterminent en myoblastes suite à l'expression des facteurs de transcription spécifiques du muscle (*myogenic regulatory factors*, MRFs) MyoD et Myf5 (Braun et al.

1992; Rudnicki et al. 1993). L'expression de la myogénine, un autre MRF, permet ensuite la fusion des myoblastes en cellules multinucléées, les myotubes (Hasty et al. 1993). En un premier temps, les noyaux s'alignent dans l'axe central du myotube puis ils se repositionnent à la périphérie. S'ensuit une deuxième vague de migration de myoblastes et de fusion. Les myofibres ainsi formées deviennent matures avec la mise en place des sarcomères qui est dépendante de l'expression d'un autre MRF, Mrf4 aussi appelé Myf6 (Figure 27).

Au cours de la régénération des fibres musculaires à l'âge adulte se produisent des événements similaires. Les cellules satellites qui sont des cellules quiescentes localisées entre la lame basale et les fibres musculaires, aussi appelées cellules souches adultes du muscle, sont activées lors de l'initiation de la néomyogénèse. Ces cellules qui expriment MyoD, vont proliférer et générer deux pools distincts, l'un va être maintenu comme réserve de cellules non déterminées alors que l'autre va fusionner avec les myofibres déjà existantes. Les noyaux nouvellement incorporés vont d'abord être localisés au centre de la myofibre avant d'être repositionnés à la périphérie.

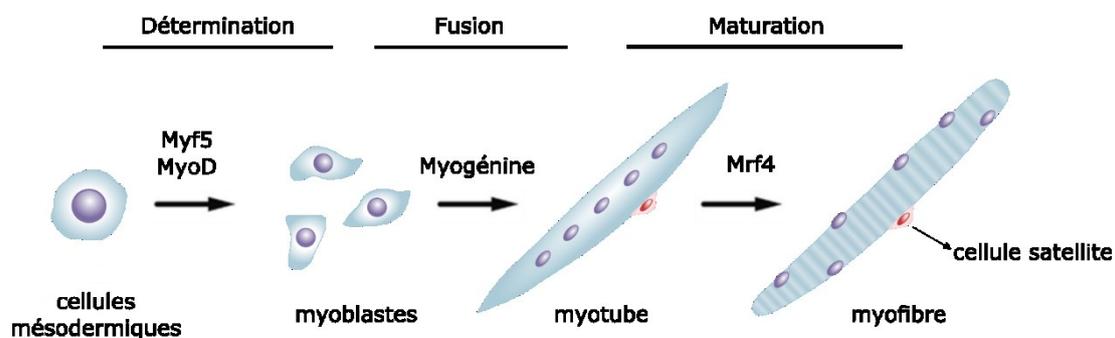


Figure 27 : Principales étapes de la myogénèse et les facteurs de transcription majeurs impliqués dans ce processus de différenciation

B. Description clinique des laminopathies touchant le muscle strié

1. Dystrophie musculaire de type Emery-Dreifuss autosomique dominante (AD-EDMD)

La première laminopathie décrite fut la dystrophie musculaire de type Emery-Dreifuss autosomique dominante (AD-EDMD) (Bonne et al. 1999). Elle se caractérise par des contractures articulaires commençant dans la petite enfance touchant tout d'abord les coudes, les chevilles et le cou, puis apparaissent progressivement des faiblesses musculaires du haut des bras et du bas des jambes et ensuite des épaules et des hanches. Mais plus que l'atteinte motrice, c'est l'atteinte du muscle cardiaque qui menace la survie des patients, en effet certains développent une cardiomyopathie dilatée avec des anomalies de la conduction. L'importance de celle-ci n'est pas corrélée avec le manque de force musculaire, ainsi des patients qui portent la mutation responsable de l'AD-EDMD peuvent développer une cardiomyopathie dilatée sans ou avec peu d'atteinte du muscle strié squelettique (Fatkin et al. 1999) ou une dystrophie musculaire des ceintures (Muchir et al. 2000).

La maladie d'EDMD était à l'origine associée à la mutation du gène *EMD*, codant l'émerine. Nous avons déjà parlé de cette protéine de l'enveloppe nucléaire, et bien que l'émerine soit un partenaire de la lamine, l'explication fonctionnelle pour laquelle des mutations dans l'une ou l'autre des protéines peuvent déclencher la même maladie reste à ce jour inconnue.

2. Dystrophies musculaires congénitales (CMD)

Des mutations dans le gène *LMNA* causant des dystrophies musculaires congénitales (CMD) ont également été identifiées. A noter, que des mutations dans des gènes codant des protéines du complexe des dystrophines/glycoprotéines/matrice extracellulaire sont aussi à l'origine de CMD. Cette pathologie est caractérisée par une hypotonie congénitale, un développement moteur retardé et l'apparition progressive d'une faiblesse musculaire associée à un aspect dystrophique sur des biopsies de muscle. L'évolution clinique est très variable.

Des patients avaient été initialement diagnostiqués pour des AD-EDMD avec apparition précoce (après acquisition de la marche), mais ne présentaient pas certaines caractéristiques de l'EDMD, ce sont les premiers cas répertoriés de CMD due à une mutation dans le gène *LMNA* (L-CMD) (Bonne et al. 2000; Mercuri et al. 2000). Par la suite, une patiente a été diagnostiquée pour une forme encore plus précoce de L-CMD. Ayant présenté des signes de faiblesse musculaire et d'hypotonie dès les premiers mois de la vie, elle n'a jamais pu tenir en position assise seule (Mercuri et al. 2004).

En 2008, Quijano-Roy et ses collaborateurs (Quijano-Roy et al. 2008) rapportent les cas de 15 patients (dont les deux cités ci-dessus) portant une néo mutation hétérozygote de *LMNA* et présentant une myopathie à apparition précoce. Tous les enfants au cours de leur première année présentaient une faiblesse musculaire et une faiblesse axiale sélective remarquable avec une perte des muscles cervicoaxiaux causant le syndrome de la tête tombante (*dropped-head syndrome*). En fonction de leurs symptômes, on distingue deux sous-groupes de patients : le premier, avec une faiblesse sévère et un développement moteur minime ou absent, et le deuxième, avec le syndrome de la tête tombante qui fait suite à une période normale de développement moteur. Tous les enfants manifestent initialement l'affaiblissement des muscles cervicaux/axiaux. Une insuffisance respiratoire restrictive progressive apparaît avant l'âge de huit ans dans le second groupe et encore plus tôt dans le premier groupe. Le niveau de créatine kinase (CK) sérique dans le sérum est retrouvé élevé dans tous les cas de L-CMD; ce qui témoigne d'un dommage musculaire; en effet cette enzyme est libérée dans le sang suite à la nécrose des fibres musculaires. L'analyse de biopsies de muscles deltoïdes et quadriceps a montré une atrophie et une dispersion des fibres de type 1 (fibres lentes oxydatives) chez tous les patients, validant ce phénotype comme outil de diagnostic pour les L-CMD (Quijano-Roy et al. 2008).

3. Autres pathologies musculaires

Des mutations du gène *LMNA* ont également été identifiées comme responsables de dystrophie musculaire des ceintures (LGMD-1B) (Muchir et al. 2000) et de cardiomyopathie dilatées avec défaut de conduction (DCM) (Fatkin et al. 1999).

C. Pathophysiologie des laminopathies à atteinte musculaire

1. Modèles murins utilisés pour étudier les mécanismes moléculaires sous-jacents aux pathologies EDMD, DCM ou L-CMD

Plusieurs modèles murins ont été développés pour étudier les fonctions de l'émerine et des lamines A/C. Il y a notamment des souris null pour le gène *Emd* (émerine) (Muchir, Pavlidis, Bonne, et al. 2007; Ozawa et al. 2006) ou le gène *Lmna* (Sullivan et al. 1999) ou encore des souris porteuses de mutations faux sens telles que la p.His222Pro, abrégée en H222P (Arimura et al. 2005; Muchir, Pavlidis, Decostre, et al. 2007), p.Asn195Lys, abrégée en N195K (Mounkes et al. 2005), p.Leu530Pro, abrégée en L530P (Mounkes et al. 2003) ou encore la p.Met371Lys, abrégée en M371K (Y. Wang et al. 2006).

En 1999, un modèle de souris conçu pour être *Lmna*-null a été développé (Sullivan et al. 1999). Ces souris, normales à la naissance, développaient rapidement une perte du muscle squelettique et une cardiomyopathie rappelant l'EDMD chez l'homme, et mouraient à l'âge de huit semaines (Sullivan et al. 1999). Les études faites sur ces souris dites *Lmna*-null et les cultures cellulaires dérivées ont largement contribué à mettre en évidence l'implication des lamines A/C dans la localisation d'autres protéines nucléaires, l'intégrité nucléaire, l'organisation de la chromatine ou encore la régulation transcriptionnelle voir le Chapitre 3 « Les divers rôles des lamines de type A au sein de la cellule ». Cependant, il fut montré récemment que ces souris exprimaient en réalité une forme tronquée des lamines A/C ($\Delta 8-11$) qui reste probablement farnesylée et peut donc être toxique (Jahn et al. 2012). Par la suite, d'autres modèles de souris *Lmna*-null ont été développés, la *Lmna*^{GT-/-} (Kubben et al. 2011), la *Lmna* ^{$\Delta\Delta$} (Y. Kim and Zheng 2013) et la *Zp3-Lmna* (Solovei et al. 2013). Dans les deux premiers modèles, l'absence de lamines de type A est fatale puisque les souris meurent avant la naissance. Dans le 3^{ème} modèle, les souris meurent avant le 18^{ème} jour après la naissance ; les souris montrent des défauts au niveau musculaire. Dans les modèles murins, l'absence totale de lamines de type A engendre donc des phénotypes plus sévères que l'expression résiduelle de la forme tronquée des lamines A/C ($\Delta 8-11$).

De manière inattendue, les souris *Emd*-null semblent phénotypiquement normales (avec toutefois des anomalies mineures de la coordination motrice et des temps de conduction atrioventriculaire légèrement prolongés). Il semblerait que chez la souris, l'émerine est peu exprimée alors que son partenaire LAP1 aurait un rôle prépondérant. En effet, les souris LAP1^{-/-} développent une dystrophie musculaire qui est plus aggravée encore en absence d'émerine (Shin et al. 2013).

Des modèles animaux de Knock-in ont également été développés afin d'étudier les mécanismes pathophysiologiques des laminopathies. Parmi ces modèles murins on peut notamment citer la souris KI-*Lmna*^{H222P} pour l'EDMD (Arimura et al. 2005), la souris KI-*Lmna*^{N195P} pour la DCM (Mounkes et al. 2005) ou encore la souris KI-*Lmna* ^{$\Delta K32$} pour la L-CMD. Alors que chez l'homme, les maladies sont généralement causées par des mutations hétérozygotes du gène *LMNA*, chez les souris, les mutations du gène *LMNA* doivent être homozygotes pour générer un phénotype (c'est le

cas pour les souris KI-*Lmna*^{H222P} ou KI-*Lmna*^{N195P}). Cependant, les souris KI-*Lmna*^{ΔK32}, développent un phénotype à l'état hétérozygote et homozygote. Notons que les souris KI-*Lmna*^{ΔK32/ΔK32} ont un retard de croissance et meurent prématurément à deux semaines de vie (Bertrand et al. 2012) alors que les souris hétérozygotes meurent de leur atteinte cardiaque après un an (Cattin et al. 2013). Des analyses histologiques et moléculaires ont mis en évidence une diminution généralisée du niveau de lamine A/C accompagnée de défauts de maturation des muscles striés squelettiques et cardiaques et du tissu adipeux (Bertrand et al. 2012). Certains des mécanismes pathophysiologiques touchés dans ces modèles sont décrits dans les parties ci-dessous.

Les lamines et les protéines associées aux lamines affecteraient la plupart des voies de signalisation impliquées dans le développement/homéostasie des muscles. Elles joueraient notamment un rôle dans la myogenèse lors du développement embryonnaire (l'ARN des lamines A/C est détecté chez la souris au stade E11 dans le cœur, l'aorte dorsale, le foie et les somites), la croissance du muscle postnatale et la régénération du muscle de l'adulte.

2. Altération de la transcription en réponse au stress mécanique

En réponse à un stress mécanique, les fibroblastes de souris *Lmna*^{-/-} ou *Emd*^{-/-} présentent une expression altérée des gènes de mécanosensitivité tels que *egr-1* et *lex-1* et une fréquence augmentée de leur mort par apoptose (Lammerding et al. 2004; Lammerding et al. 2005). De la même manière, en réponse à une stimulation mécanique (ou à une cytokine), les cellules *Lmna*^{-/-} présentent une diminution anormale de la transcription régulée par NF-κB, facteur de transcription impliqué dans l'hypertrophie cardiaque pathologique (Hall et al. 2006). Notons également qu'il a été montré que des myoblastes de patients présentaient des défauts de mécanosensitivité via l'augmentation de l'activation de la voie de signalisation YAP (*yes-associated protein*) (Bertrand et al. 2014).

Dans des modèles animaux / cellulaires de laminopathies, le complexe LINC ainsi que le cytosquelette sont perturbés (L. Yang et al. 2013; Broers et al. 2005; J. S. H. Lee et al. 2007). Une hypothèse serait que dans un contexte normal, les connexions entre le noyau et le cytosquelette permettent aux cellules de résister à des forces de large magnitude, alors que dans un contexte pathologique, la disruption de cette connexion rendrait les cellules plus sensibles à ce type de stress. Dans la mesure où le tissu musculaire est constamment soumis à des stress mécaniques, on peut imaginer que l'atteinte spécifique musculaire chez les patients résulte de l'incapacité des cellules de ce tissu à répondre de manière appropriée à ce type de stress.

3. Activation de la voie de signalisation des MAPK

Dans les cœurs de souris modèles d'EDMD (*Lmna* H222P, *Emd*^{-/-}), il a été mis en évidence une sur-activation de la voie MAPK et notamment des kinases p38-JNK et/ou p42 ERK1,2, deux médiateurs de la croissance hypertrophique (Heineke and Molkentin 2006; Muchir, Pavlidis, Decostre, et al. 2007). Une plus grande activité de JNKs est associée au développement de cardiomyopathies et à des défauts de la conduction avec une perte de la protéine de jonction communicante con43 (connexine-43) (Petrich et al. 2002).

Une plus grande activité de MEK1-ERK1/2 stimule l'expression de plusieurs gènes foetaux qui sont connus pour être up-régulés dans l'hypertrophie, comme la β -MHC (*β -Myosin Heavy Chain*) et ANF (*atrial natriuretic factor*) (Gillespie-Brown et al. 1995; Muchir, Pavlidis, Decostre, et al. 2007).

Ces données suggèrent que l'émerine et les lamines A/C sauvages sont des régulateurs négatifs de la voie de signalisation de MAPK ; cependant la manière dont leur absence ou leur mutation peut activer cette voie n'est pas encore claire.

4. Anomalies de signalisation pRb-MyoD

Comme nous avons pu le voir dans le paragraphe « Contrôle du cycle cellulaire et régulation de Rb » la voie de signalisation pRb-MyoD est impliquée dans le contrôle du cycle cellulaire et l'activation de la différenciation myogénique. Dans les muscles de souris modèles de EDMD ou de patients atteints de AD-EDMD et de X-EDMD, l'expression des composants de la voie pRb-MyoD est altérée induisant notamment une surexpression des protéines CBP (*CREB (cAMP-response-element-binding protein)-binding protein*), NAP1L1 (*nucleosome assembly protein 1-like protein 1*) et CRI-1 (*CBP/EP300 (E1 A-binding protein 300) inhibitory protein 1*) (Bakay et al. 2006; Melcon et al. 2006; Frock et al. 2006).

La dérégulation de la voie Rb en réponse à l'expression de lamines mutées implique vraisemblablement une altération de fonction de son partenaire LAP2 α . Ainsi, il a été montré que les souris dépourvues de LAP2 α ont un pool de cellules souches musculaires plus élevé que la normale, et que le pourcentage des fibres musculaires de type rapide (type II) augmente (dans le soleus) (Gotic et al. 2010). In vitro, les myoblastes primaires LAP2 α ^{-/-} présentent un retard de différenciation (Gotic et al. 2010).

En conclusion, des mutations dans les gènes codant les lamines A/C ou leur partenaire LAP2 α conduisent à un déséquilibre de la balance entre les deux destinées cellulaires possibles prolifération / différenciation, via un dysfonctionnement de pRb (Figure 18).

5. Altération de la distribution intracellulaire de β -caténine

Dans le cœur, l'émerine qui est localisée à la fois dans le noyau et au niveau des jonctions avec les disques intercalaires du myocarde joue un rôle majeur dans la voie de signalisation de la β -caténine (Wheeler et al. 2010). Il a été montré dans des cellules en culture (HEK 293), que la surexpression ou l'absence de l'émerine inhibait ou activait l'accumulation nucléaire de la β -caténine et la cascade de signalisation en aval, respectivement (Markiewicz et al. 2006; Wheeler et al. 2010). Dans le contexte X-EDMD, la diminution de l'expression de l'émerine dans les cœurs de souris s'accompagne d'une augmentation de l'intensité des immunomarquages de la β -caténine au niveau des disques intercalaires et d'un changement d'architecture de ces derniers (Wheeler et al. 2010). Dans les souris *Lmna*-null l'intégrité des disques intercalaires n'a pas été étudiée au-delà de six semaines où il n'y avait pas d'anomalies (Nikolova et al. 2004).

6. Smads

Dans des fibroblastes embryonnaires provenant de souris *Lmna*-null, il a été montré que la cinétique de phosphorylation de Smad2 et Smad3, induite par TGF- β , était altérée (Van Berlo et al. 2005). De plus, les souris *Lmna*^{H222P/H222P} (modèle EDMD) présentent une augmentation de la quantité de Smad2 et Smad3 phosphorylés dans les noyaux de muscles squelettiques et cardiaques (Arimura et al. 2005). Il est donc proposé qu'un défaut d'expression de lamines de type A pourrait, en altérant l'intégrité de l'enveloppe nucléaire, impacter la capacité de MAN1 (voir ci-dessus) à se lier à et réguler les Smads (Bengtsson 2007).

D. Thérapies pour les atteintes musculaires liées à des mutations dans le gène *LMNA*

1. Prise en charge actuelle des patients

A ce jour, il n'existe pas de traitement spécifique pour soigner les laminopathies affectant les muscles striés. Cependant, une prise en charge des patients atteints est proposée afin de préserver l'activité du muscle et d'améliorer leur espérance de vie.

Pour aider à maintenir leur déambulation, les patients peuvent suivre des séances de kinésithérapie ou des interventions chirurgicales visant à limiter les contractures au niveau des tendons d'Achille, du cou et de la colonne vertébrale.

C'est cependant, comme nous l'avons déjà dit, l'atteinte cardiaque qui menace la survie des patients. Sans traitement, les cardiomyopathies peuvent mener au développement d'insuffisance cardiaque, voire de mort prématurée. L'administration de médicaments conventionnels contre les insuffisances cardiaques, comme les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE), n'est pas suffisante pour traiter les patients atteints d'EDMD en réponse à une mutation dans le gène *LMNA*. L'implantation d'un défibrillateur automatique, et non d'un pacemaker, est recommandé pour prévenir une mort subite due à une tachyarythmie létale chez ces patients (Meune et al. 2006).

2. Inhibiteurs de MAPK

Etant donné les différences d'activité des voies de signalisation MAPK et mTOR dans les cœurs de souris *Lmna*^{H222P} par rapport aux souris sauvages, l'inhibition de ces voies à des fins thérapeutiques a été envisagée (Muchir, Pavlidis, Decostre, et al. 2007). Ainsi, des souris *Lmna*^{H222P} présentant déjà des signes de détérioration cardiaque ont été traitées pendant quatre semaines par des injections quotidiennes en intrapéritonéal de Selumetinib, un inhibiteur de la signalisation ERK1/2 (Muchir, Reilly, et al. 2012). A noter que cette drogue est utilisée par ailleurs en essais cliniques pour traiter certains cancers (Adjei et al. 2008; Hayes et al. 2012). Des analyses d'échocardiographie et histologiques ont démontré que le traitement augmentait la fraction de raccourcissement cardiaque (*i.e.* une amélioration de la fonction ventriculaire gauche), prévenait la fibrose du myocarde et prolongeait la survie des animaux, sans induire d'effets toxiques au niveau rénal ou hépatique. Ainsi, la Selumetinib pourrait être envisagée comme traitement pour les patients atteints de cardiomyopathie (Muchir, Reilly, et al. 2012).

De même, il a été montré, toujours dans les souris *Lmna*^{H222P} qu'inhiber JNK (W. Wu et al. 2010; W. Wu et al. 2011) ou p38 (Muchir, Wu, et al. 2012) avait des effets bénéfiques sur les dysfonctionnements du ventricule gauche.

Dans quelle mesure le chevauchement de ces différentes voies de signalisation joue un rôle dans la détermination de la cardiomyopathie causée par des mutations de LMNA n'est pas encore connu.

3. Induction de l'autophagie

mTOR joue un rôle majeur dans la régulation de la balance entre la croissance cellulaire et l'autophagie en réponse au statut nutritionnel, à des facteurs de croissance et à des signaux de stress (Jung et al. 2010). La rapamycine se lie à et inhibe mTOR de manière allostérique et spécifique. Ainsi, la rapamycine a été utilisée pour des essais de traitement de cancer et différents analogues, comme le Temsirolimus, ont été développés afin d'améliorer les propriétés pharmacocinétiques (Benjamin et al. 2011).

Les souris *Lmna*^{-/-} qui présentent une suractivation de la signalisation de mTORC1 dans le cœur et le muscle squelettique ont vu une amélioration de leurs fonctions musculaires et une augmentation de leur espérance de vie après traitement à la rapamycine. Il a aussi été observé une amélioration globale du processus de dégradation par autophagie ainsi qu'une réduction des agrégats de desmine dans le muscle et le tissu cardiaque (Ramos et al. 2012).

Les souris *Lmna*^{H222P} présentant des signes de détérioration cardiaque, ont vu une amélioration de la dilatation systolique du ventricule gauche, après traitement au Temsirolimus. Cependant cet inhibiteur n'a pas permis de diminuer le degré de fibrose, suggérant que les voies ERK1/2 et AKT/mTOR seraient toutes deux impliquées dans la régulation de la fonction du ventricule gauche (Choi et al. 2012).

4. Traitements combinés

Les différents travaux cités ci-dessus ont mis en évidence qu'inhiber les voies de signalisation d'ERK1/2 ou d'Akt/mTOR avaient des effets positifs sur la fonction cardiaque des souris modèles de laminopathies avec une atteinte cardiaque. Il reste à déterminer si des traitements combinés d'inhibiteurs de MEK1/2 et mTOR pourraient avoir un effet thérapeutique synergique dans ce contexte de laminopathies.

5. Sensibilisateur au calcium

Les agents cardiotoniques pourraient être utiles pour le traitement des dysfonctionnements systoliques puisqu'ils augmentent la contractilité cardiaque via une augmentation du niveau d'AMPc dans les cardiomyocytes, menant à une augmentation de la concentration de Ca²⁺. Les agents cardiotoniques classiques pourraient apporter un bénéfice hémodynamique à court terme, mais à long terme leur administration a été corrélée avec un faible taux de survie et des effets secondaires divers, possiblement dus aux fortes concentrations de Ca²⁺ menant à une cardiotoxicité et des effets arrhythmogéniques. Cependant, les sensibilisateurs au Ca²⁺ sont des nouveaux agents cardiotoniques

qui permettent un effet inotropique en augmentant la sensibilité au Ca^{2+} pour la contraction du muscle sans augmenter les concentrations d'AMPc ou de Ca^{2+} intracellulaire (Perrone and Kaplinsky 2005). Ainsi, le sensibilisateur au Ca^{2+} nommé SCH00013 a été rapporté comme améliorant la contractilité sans dépense superflue d'énergie dans les muscles cardiaques (Tadano et al. 2005). Les souris *Lmna*^{H222P} traitées avec le SCH00013 ont vu une amélioration du dysfonctionnement systolique, une diminution de la fibrose interstitielle cardiaque, la modulation de l'expression de gènes impliqués dans le remodelage cardiaque des souris *Lmna*^{H222P}, et finalement une prolongation de leur espérance de vie (Arimura et al. 2010). Les mécanismes par lesquels la molécule SCH00013 induit les effets bénéfiques cités plus haut restent à déterminer, mais ces découvertes impliquent que ce sensibilisateur au Ca^{2+} pourrait être une option pour prévenir la progression des laminopathies cardiomyopathiques.

II. Laminopathies touchant les tissus adipeux

En 2000, il a été montré que plusieurs mutations du gène *LMNA* pouvaient toucher les tissus adipeux, et plus spécifiquement causer des lipodystrophies partielles familiales de type Dunnigan (FPLD) (H. Cao and Hegele 2000; Shackleton et al. 2000; Speckman et al. 2000). Cette pathologie autosomique-dominante est caractérisée par une perte des tissus adipeux aux extrémités qui se déclenche au cours de la puberté, et est généralement associée à une insulino-résistance, un diabète, une hyperglycémie et une stéatose hépatique. La majorité des mutations responsables de la FPLD sont hétérozygotes avec des substitutions au niveau de l'exon 8 de *LMNA* (Figure 24), menant à un changement de charge de la surface de l'Ig-fold, comme par exemple la mutation p.Arg482Trp, abrégée en R482W (Krimm et al. 2002).

Il existe cependant également des patients qui présentent des anomalies des tissus adipeux, de la sensibilité à l'insuline et du métabolisme des lipides mais qui n'ont pas les phénotypes typiques de la FPLD (Caux et al. 2003; Decaudain et al. 2007; Dutour et al. 2011).

De plus, des mutations faux-sens homozygotes au niveau de l'Ig-fold causent des dysplasies mandibulo-acrales (MADA), un syndrome caractérisé par une lipodystrophie partielle et des anomalies congénitales affectant le squelette (Novelli et al. 2002).

A. Pathophysiologie des laminopathies touchant les tissus adipeux

1. SREBP1

Au cours de mon stage de master 2, j'ai contribué à l'étude portant sur l'impact des lamines de type A sur la fonction de son partenaire, le facteur de transcription SREBP1 qui joue un rôle central dans la différenciation adipocytaire. Nous avons montré dans un modèle cellulaire que la surexpression de lamines de type A sauvages stabilisait l'expression de SREBP1 mais réduisait son activité transcriptionnelle (Vadrot et al. 2014). Plusieurs hypothèses peuvent expliquer cette perte d'activité. (1) Les lamines de type A en interagissant avec SREBP1 à la périphérie du noyau, le

séquestrerait loin de ses séquences cibles. Cependant nous avons également montré que les lamines de type A se liaient préférentiellement à SREBP1 lié à des séquences d'ADN plutôt qu'à SREBP1 libre et qu'elles interagissaient avec SREBP1 aussi dans le nucléoplasme. (2) Les lamines de type A pourraient s'associer aux complexes [SREBP1 – ADN] et les déplacer vers un compartiment inactif transcriptionnellement, comme l'enveloppe nucléaire ou des domaines associés aux lamines (LADs) (Lund et al. 2013; Lund and Collas 2013). (3) Les lamines de type A pourraient empêcher le recrutement de co-facteurs nécessaires à la transcription régulée par SREBP1 (*e.g.* CBP/P300, SP1, NFY) (Dooley et al. 1998; Giandomenico et al. 2003; Oliner et al. 1996; Sanchez et al. 1995). (4) Les lamines de type A pourraient aussi avoir un rôle indirect sur la fonction de SREBP1, en modulant ses modifications post-traductionnelles. Ainsi, les lamines régulent la fonction de la déacétylase SIRT1 (B. Liu et al. 2012) et l'expression d'ubiquitines ligases (Chaturvedi and Parnaik 2010; Chaturvedi et al. 2012; Muralikrishna et al. 2012), des facteurs impliqués dans l'acétylation et la stabilité de SREBP1, deux éléments clés pour réguler son activité (Bengoechea-Alonso and Ericsson 2009; Ponugoti et al. 2010).

De plus, l'analyse de l'expression des gènes cibles de SREBP1 par RNA-Seq dans des fibroblastes humains contrôles ou de patients atteints de FPLD2 (Vadrot et al. 2014) a montré que, en comparaison aux lamines A sauvages, les lamines A mutées au site responsable de FPLD2 (R482W) formaient moins d'interactions avec SREBP1 *in situ* et stimulaient l'expression d'un grand nombre de gènes cibles de SREBP1. Cette augmentation de l'activité de SREBP1 pourrait contribuer d'une part à l'induction de la sénescence prématurée des fibroblastes de patients (Y.-M. Kim et al. 2010), et d'autre part, à l'inhibition de la différenciation adipogénique causée par l'expression de lamines A R482W (Oldenburg et al. 2014).

Le fait que la suractivation de SREBP1 puisse contribuer à l'altération des tissus adipeux est conforté par certaines études réalisées dans la souris. En effet, la surexpression de SREBP1c spécifiquement dans les tissus adipeux, a généré un syndrome chez la souris qui ressemblait à la lipodystrophie congénitale généralisée chez l'humain (Shimomura et al. 1999). Ces souris ont présenté très peu de tissu adipeux, résultant vraisemblablement d'un défaut de différenciation adipocytaire ; elles ont aussi développé de l'hyperglycémie, de l'hyperinsulinémie et ont accumulé des lipides dans le foie (Shimomura et al. 1999).

2. Wnt- β -caténine-PPAR γ

PPAR γ , facteur de transcription qui joue un rôle clé dans la conversion adipogénique, est régulé entre autres par l'émerine, partenaire des lamines A/C. En effet, dans les fibroblastes *emerine-null* qui ont une augmentation de l'activité de la β -caténine, on observe une accumulation de PPAR γ dans le noyau (Tilgner et al. 2009). Ainsi la dérégulation de PPAR γ pourrait contribuer à la génération des défauts métaboliques dans les laminopathies à aspect lipodystrophique.

B. Traitement des lipodystrophies liées à des mutations du gène *LMNA*

En raison de la pauvreté en tissus adipeux, ces patients ne peuvent pas stocker les triglycérides et ont un déficit dans la sécrétion d'adipocytokines. Au final, ils peuvent développer des

complications graves telles qu'une perte de la sensibilité à l'insuline avec diabète, pancréatite, cirrhose et stéatose du foie et athérosclérose accélérée. A ce jour il n'y a pas de traitement spécifique des laminopathies à caractéristique lipodistrophique. Cependant, pour limiter les complications chez ces patients on peut envisager de :

1) améliorer la sensibilité à l'insuline pour corriger le diabète : Pour le moment la stratégie porte premièrement sur des modifications du mode de vie (régime et activité physique) puis sur la prise de metformine, antidiabétique oral de la famille des biguanides normoglycémiantes. Cependant, certains patients ne parviennent pas à avoir un contrôle de leur glycémie adéquate avec la metformine.

2) réduire l'hypertriglycéridémie car elle peut conduire à une pancréatite qui est souvent résistance aux thérapies conventionnelles. Des dérivés d'acide fibrique (des agonistes de PPAR γ) ou de fortes doses d'acides gras polyinsaturés ω -3 peuvent alors être utiles. Chez certains patients, de faibles doses de statines, qui inhibent la farnésylation de la pré-lamine A, peuvent être ajoutés pour réduire le niveau de cholestérol non HDL.

3) compenser le déficit en adipocytokines grâce à l'utilisation de leptine recombinante (hormone digestive). Ce traitement suivi par des patients atteints de FLPD a donné des résultats encourageants avec une amélioration de l'hyperglycémie, de l'hypertriglycémie et de la sensibilité à l'insuline (Park et al. 2007). De plus, la leptine réduit l'appétit et fait perdre du poids, participant à améliorer les défauts métaboliques. Au-delà de ces effets centraux, la leptine réduit également l'accumulation de lipide ectopique dans le foie et le muscle (Petersen et al. 2002).

4) améliorer l'homéostasie du tissu adipeux en modulant l'activité de facteurs de transcription clés comme SREBP1 et PPAR γ . Etant donné qu'il a été montré que la dérégulation de l'activité de SREBP1 pouvait jouer un rôle majeur dans la pathophysiologie, l'utilisation de molécules capable de moduler l'expression ou l'activité de SREBP1 est considérée comme une approche thérapeutique pertinente. Ainsi, les glitazones, des ligands de PPAR, pourraient permettre de retrouver un processus adipogénique normal. Cependant leurs effets restent équivoques, en effet les glitazones n'inversent pas la perte de gras, et peuvent empirer l'excès d'accumulation de tissus adipeux au niveau cervical (Simha et al. 2008). Chez la plupart des patients de fortes doses d'insuline sont nécessaires.

III. Laminopathies touchant les nerfs périphériques

La mutation R298C homozygote, située au niveau du *rod domain* des lamines de type A, a été reportée comme responsable d'une neuropathie périphérique récessive autosomique, la maladie de Charcot-Marie-Tooth de type 2 (AR-CMT2A) (De Sandre-Giovannoli et al. 2002). Les sujets atteints souffrent d'une neuropathie périphérique axonale dont l'âge d'apparition et l'évolution de la maladie sont très variables.

Il a été montré que les nerfs sciatiques des souris *Lmna*^{-/-} avaient une réduction de la densité en axones, un élargissement axonale et des axones non-myélinisés, des phénotypes similaires à ceux

que l'on retrouve chez des patients atteints de neuropathies axonales périphériques (De Sandre-Giovannoli et al. 2002). La délétion hétérozygote de 15 nucléotides en 5', comprenant le codon d'initiation de la traduction ATG du gène *LMNA*, elle, cause des défauts à la fois de la EDMD et d'une neuropathie périphérique chez l'homme (Walter et al. 2005).

A. Pathophysiologie des neuropathies liées à des mutations du gène *LMNA*

Afin de comprendre les mécanismes physiopathologiques de l'AR-CMT2A, un modèle de souris knock-in a été généré, avec la mutation p.Arg298Cys de *Lmna*, abrégée en R298C. Bien que sans phénotype apparent au niveau des nerfs périphériques, il a été observé une sous régulation du gène *Lmna* dans tous les tissus testés (muscle squelettique, cœur, nerf périphérique, moelle épinière ou encore le tronc cérébral) et une sur-régulation de *Pmp22* spécifiquement dans les nerfs sciatiques (Poitelon et al. 2012). Produit principalement dans les cellules de Schwann, PMP22 est un composant majeur de la myéline exprimé dans la portion compacte de pratiquement toutes les fibres myélinées dans le système nerveux périphérique. Il joue un rôle dans la croissance et la différenciation des cellules de Schwann (Snipes et al. 1992; Spreyer et al. 1991). De plus, chez l'homme, la cause la plus connue de CMT est la duplication du chromosome 17 qui contient le gène PMP22. La possible relation entre *Pmp22* et *Lmna* est une première étape dans la compréhension de la physiopathologie de l'AR-CMT2A, mais les mécanismes plus précis restent encore à être élucidés.

B. Traitement des neuropathies liées à des mutations du gène *LMNA*

Il n'y a pas de remède contre la maladie de Charcot-Marie-Tooth pour l'instant.

En 2004, l'équipe du Dr Michel Fontès a montré un effet bénéfique de l'acide ascorbique (Vitamine C) sur les modèles de souris transgéniques CMT1A (Passage et al. 2004). Quelques années plus tard, il a été montré que l'acide ascorbique inhibait l'expression de PMP22 (Kaya et al. 2007). Cependant les essais cliniques menés sur des patients atteints de CMT1A n'ont montré aucun bénéfice de ce dernier bien qu'il ait été bien toléré par les patients (Micallef et al. 2009).

Afin de limiter la progression de la maladie chez les patients, la kinésithérapie est essentielle. Bien que la rééducation douce soit préconisée, une activité physique intensive est à proscrire. La chirurgie orthopédique peut apporter un soulagement et un maintien de la marche. De même l'usage d'une canne, le port d'attelles ou de chaussure orthopédiques permettent de retrouver une certaine stabilité, diminuent le risque de chutes et prolongent la marche (www.cmt-france.org).

IV. Laminopathies touchant de multiples systèmes dans le cas de vieillissement prématuré

Des patients développent une laminopathie caractérisée par un vieillissement prématuré. Plusieurs symptômes sont regroupés dans cette catégorie, tels que le syndrome de Hutchinson-Gilford (HGPS), la dermatopathie restrictive (RD), la dysplasie acro mandibulaire (MADA), le syndrome de la progeria de Nestor-Guillermo (NGPS) et LIRLLC (*Lipoatrophy, Insulin-Resistant diabetes, Leukomelanodermic papules, Liver steatosis and hypertrophic Cardiomyopathy*). Des patients qui ont une MADA ont, comme j'ai déjà pu le dire une lipodystrophie partielle, mais également des anomalies phénotypiques qui chevauchent celles présentes dans les symptômes progéroïdes, tels que le retard de croissance et les rétractions articulaires.

La progéria ou syndrome de Hutchinson-Gilford (HGPS) qui est une maladie sporadique, autosomique-dominante est la laminopathie la plus étudiée. Les patients sont atteints d'un vieillissement prématuré caractérisé par une peau fine atrophique avec absence de tissu adipeux sous cutané, des rétractions articulaires, les doigts en flexion, une micrognathie, une alopecie, et des anomalies vasculaires, menant généralement à la mort des patients entre 13 et 16 ans. Ce syndrome est dû à une mutation de transversion d'une cytosine en thymine au niveau du codon 608 de l'exon 11 du gène *LMNA*. Cette mutation crée un site d'épissage supplémentaire, ce qui va entraîner la synthèse d'une pré-lamine A dépourvue de 50 acides aminés au niveau C-terminal (del a.a. 607-656). C'est dans cette région délétée que se situe normalement le site de clivage par la protéase ZMPSTE24. En conséquence, la pré-lamine A mutée qu'on appelle alors progérine, ne peut suivre correctement le processus de maturation, et reste farnesylée de manière permanente. La pré-lamine A ne subit pas non plus le processus de maturation complet dans le cas de mutations homozygotes du gène codant la ZMPSTE24 causant également des symptômes progéroïdes, la dermatopathie restrictive létale (Figure 28).

L'accumulation de pré-lamine A farnesylée n'est pas toujours l'élément déclencheur de la pathophysiologie des phénotypes progéroïdes. En effet, il existe des mutations du gène *LMNA* qui ne donnent pas lieu à une protéine précurseur farnésylée mais qui ont tout de même été associées à des syndromes progéroïdes atypiques (les mutations p.Pro4Arg, p.Ala57Pro, p.Glu111Lys, p.Arg133Leu, p.Asp136His, p.Leu140Arg, p.Glu159Lys, p.Thr528Met, p.Met540Thr et p.Cys588Arg abrégées respectivement en P4R, A57P, E111K, R133L, D136H, L140R, E159K, T528M, M540T et C588R) (L. Chen et al. 2003; Verstraeten et al. 2006; Garg et al. 2009).

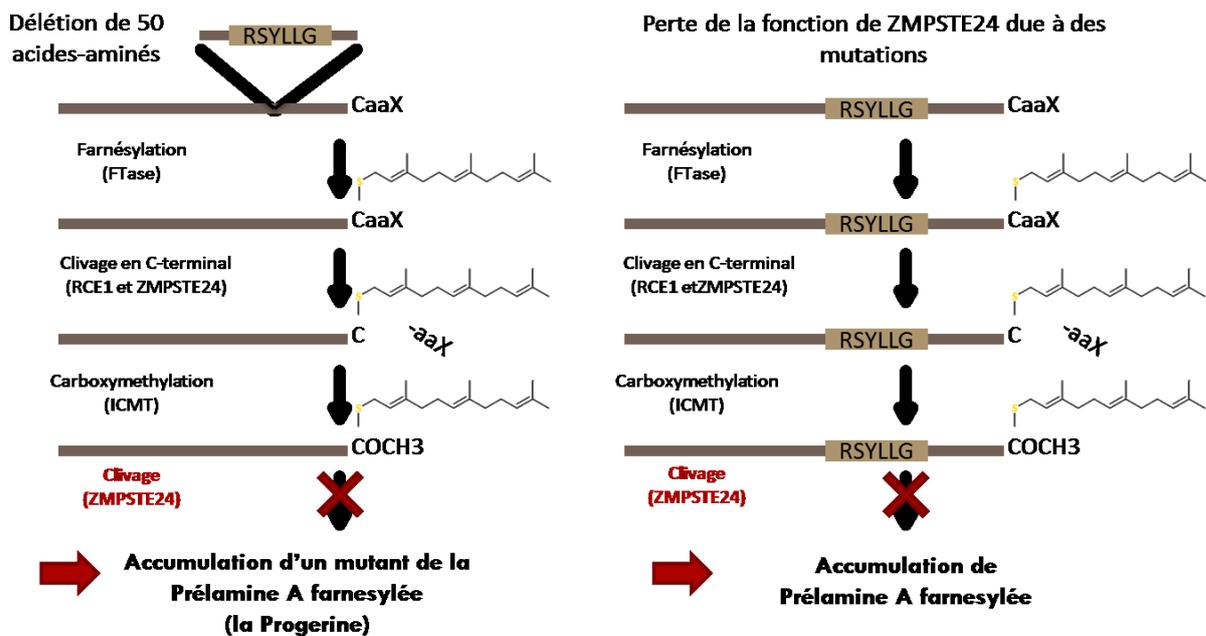


Figure 28 : Accumulation de pré-lamine A dans HGPS et la dermatopathie restrictive

Nous aborderons dans les parties suivantes la pathophysiologie et les traitements potentiels concernant la progéria (HGPS), aussi je me suis inspirée majoritairement de la revue de Pierre Cau et al. (Cau et al. 2014).

A. Pathophysiologie de la progéria (HGPS)

Les études réalisées avec les modèles animaux HGPS et les fibroblastes de patients ont permis de mettre en évidence les conséquences de l'accumulation de progérine sur de nombreuses fonctions cellulaires. Certaines de ces fonctions sont citées ci-dessous.

1. Intégrité du noyau

Il a été montré par microscopie électronique et photonique dans des fibroblastes de peau de patients atteints de HGPS cultivés *ex-vivo* que les noyaux avaient des formes anormales, avec notamment des bourgeonnements ainsi qu'un épaissement de la lamina associé à une perte de l'hétérochromatine à la périphérie du noyau. (Eriksson et al. 2003; R. D. Goldman et al. 2004). De plus, la distribution irrégulière des pores nucléaires suggère des répercussions sur le transport nucléo-cytoplasmique de protéines et d'ARNs, et en conséquence sur tous les aspects métaboliques du génome nucléaire. De même, dans des souris exprimant la progérine, les noyaux des kératinocytes ont des formes anormales (Y. Wang et al. 2008).

Ainsi, l'observation de noyaux « anormaux » peut s'observer dans différents tissus. De manière très intéressante, on sait maintenant qu'au cours du processus de vieillissement physiologique, la progérine est exprimée en particulier dans les kératinocytes et les fibroblastes dermiques (McClintock et al. 2007; Skoczyńska et al. 2015).

Des expériences sur noyaux isolés de fibroblastes de patients (aspiration par micropipette, analyse en lumière polarisée) ont permis de montrer que la lamina dans les cellules HGPS avait une capacité significativement réduite à se réarranger suite à un stress mécanique, probablement en raison de son agencement en microdomaines ayant une orientation très ordonnée (Dahl et al. 2006). Ainsi, alors que les noyaux WT peuvent s'étendre facilement et de manière réversible, les noyaux HGPS eux peuvent s'étendre mais ne peuvent pas retrouver leur forme/taille d'origine (Figure 29).

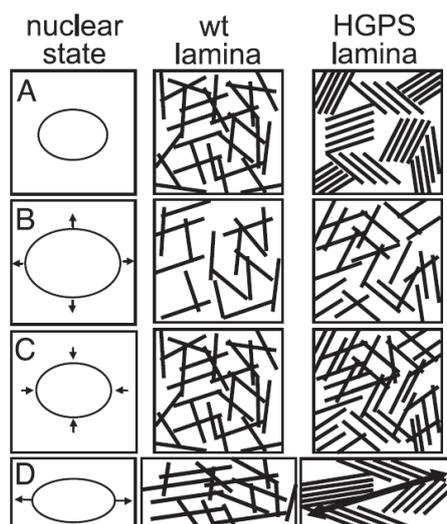


Figure 29 : Modèle de réarrangement de la lamina dans les cellules HGPS
(Dahl et al. 2006)

Pour ce qui est de la chromatine, les cellules HGPS présentent de nombreux défauts concernant la distribution de l'hétérochromatine, l'organisation des territoires chromosomiques (Mehta et al. 2011; Taimen et al. 2009) et les modifications épigénétiques telles que la méthylation de l'ADN et des histones (Heyn et al. 2013; McCord et al. 2013). Il a également été montré que la progérine altérait la réparation de l'ADN (Y. Liu et al. 2006; Musich and Zou 2011; Manju et al. 2006) mais aussi que les cellules de souris de modèle HGPS présentaient une aneuploïdie anormale (B. Liu et al. 2005; Pratt et al. 2011; Gonzalo and Kreienkamp 2015), causant une instabilité génomique qui représente un aspect important dans le processus de vieillissement. De plus un raccourcissement accéléré des télomères est observé dans des cellules surexprimant des mutants de lamines associés à des syndromes progéroïdes (Huang et al. 2008).

Réversion des phénotypes cellulaires anormaux associée à la pathologie HGPS : modèles in vitro

Corriger le niveau d'expression de la protéine SUN1 (du complexe LINC), en le réduisant, a permis de corriger les défauts nucléaires et la sénescence cellulaire (C.-Y. Chen et al. 2012). L'implication du couplage nucléo-cytosquelette dans l'induction des phénotypes cellulaires anormaux a aussi été observée dans des fibroblastes HGPS incubés en présence de molécules affectant le réseau de microtubules. En particulier, une petite molécule du nom de Remodeline qui inhibe l'acétyl-transferase NAT10 impliquée notamment dans la l'organisation du réseau de microtubules a été identifiée comme permettant d'améliorer l'architecture nucléaire, l'organisation

de la chromatine et de diminuer les marqueurs de dommage à l'ADN dans les cellules de patients HGPS (Larrieu et al. 2014).

Récemment, l'équipe de Xavier Nissan a également réalisé un screening de 21 608 molécules sur des cellules iPS (*induced pluripotent stem cells*) dérivées de cellules de patients HGPS et différenciées en MSC (cellules souches mésenchymateuses), visant à corriger les phénotypes cellulaires anormaux. Cette équipe a identifié une nouvelle famille de molécules, les mono-aminopyrimidines (mono-APs) qui permettent d'inhiber deux enzymes clés du processus de farnesylation, la farnésyl pyrophosphate synthase et la farnésyl transférase, avec pour effet cellulaire de réduire la déformation des noyaux et d'empêcher la différenciation trop précoce des MSCs en osteocytes (Blondel et al. 2016).

2. ROS

Les laminopathies progéroïdes sont accompagnées de niveaux altérés de ROS (espèces réactives de l'oxygène) et d'une susceptibilité au stress oxydatif accrue (Viteri et al. 2010). De plus la transcription de gènes codant des protéines mitochondriales est altérée, et plus particulièrement les protéines impliquées dans la production de ROS (Rivera-Torres et al. 2013).

3. pRb

Dans les cellules HGPS, l'expression de progérine ralentit le cycle cellulaire via un défaut de signalisation de la voie lamine A-pRb (Marji et al. 2010). Or, la perte de pRb compromet la fonction et la cohésion des centromères, et peut causer des erreurs d'agrégation de chromosomes, créant des cellules aneuploïdes (Manning et al. 2010). Ainsi le défaut de signalisation de pRb pourrait être responsable des aneuploïdies observées dans les cellules de modèles HGPS (B. Liu et al. 2005; Pratt et al. 2011; Gonzalo and Kreienkamp 2015).

4. NFκB

Il a été montré dans différents modèles de souris progéroïdes que la voie de signalisation de NFκB était activée (Tilstra et al. 2012; Osorio et al. 2012). Or NFκB est impliqué dans l'induction de la sénescence.

5. p53

La voie de signalisation p53 est activée dans des souris présentant un syndrome progéroïde (Varela et al. 2005). Etant donné que p53 est un facteur de transcription impliqué dans le contrôle du cycle cellulaire, de la réparation de l'ADN, de l'apoptose et des réponses au stress cellulaire, toutes ces fonctions sont potentiellement également touchées.

6. Wnt et Notch

Aussi bien dans des cellules issues de patients HGPS ou des modèles de souris HGPS ou *Zmpste24*^{-/-}, des modifications des voies de signalisation de Wnt ou Notch ont été observées (Scaffidi and Misteli 2008; Hernandez et al. 2010; Espada et al. 2008). L'hyper activation de la signalisation

Notch-dépendante a pour conséquence la diminution de la conversion adipogénique des cellules souches mésenchymateuses humaines via l'altération de l'activité de transactivation du facteur de transcription PPAR γ (Scaffidi and Misteli 2008). Le dysfonctionnement des cellules souches pourrait ainsi être un facteur de pathogénie dans les progéras.

7. mTOR

Il a été montré que la rapamycine permettait l'augmentation de la dégradation de la progérine et améliorait les phénotypes anormaux des cellules de patients atteints de HGPS, suggérant que la voie de signalisation mTOR pourrait également être affectée dans ces pathologies (K. Cao et al. 2011).

8. IGF1-GH

La voie de signalisation de l'IGF1 est un régulateur important de la longévité dans de nombreux organismes (Fadini et al. 2011). Or les souris progéroïdes *Zmpste24*^{-/-} présentent des altérations transcriptionnelles des gènes qui régulent l'axe somatotrope, ainsi que des hauts niveaux d'hormones de croissance circulantes et une réduction drastique de l'IGF1 dans le plasma (Mariño et al. 2010). Il semblerait que ce défaut de signalisation serait dû à une altération de la réponse à la GH (*Growth Hormone*).

Il a également été montré qu'un traitement par IGF-1 recombinante restaurait la balance entre l'IGF1 et GH dans les souris *Zmpste24*^{-/-}, retardait l'apparition de plusieurs symptômes progéroïdes et prolongeait significativement la durée de vie de ces animaux (Mariño et al. 2010).

B. Traitements potentiels de HGPS

Trois stratégies visant à inhiber l'accumulation de pré-lamine A mutée farnesylée avérée toxique pourraient être envisagées : (1) diminuer la toxicité du précurseur pré-lamine A (WT ou progérine) en inhibant sa farnesylation. (2) bloquer le site d'épissage responsable de la production d'ARNm de progérine. (3) dégrader la progérine ou lamine A farnesylée au sein de la cellule. A ce jour, seule la première stratégie a été évaluée par des essais cliniques.

En 2005 il a été montré par six équipes différentes qu'inhiber la farnesylation de la progérine permettait d'améliorer la forme des noyaux de différentes cellules modèles d'HGPS (Columbaro et al. 2005; Scaffidi and Misteli 2005; Capell et al. 2005; Glynn and Glover 2005; Mallampalli et al. 2005; S. H. Yang et al. 2005). Le premier essai clinique a eu lieu entre 2007 et 2009, un inhibiteur de la farnésyl-transférase (FTI), le lonafarnib, a été donné à 25 patients atteint de HGPS (Gordon et al. 2012). Les résultats publiés n'ont pas mis en évidence d'améliorations claires sur les points clefs de la maladie, même s'ils laissent penser qu'une amélioration de la structure/densité des os et de la rigidité des vaisseaux sanguins serait possible. Il s'est avéré qu'en présence de FTI, un processus alternatif de prénylation à la farnesylation, qui est la geranyl-geranylation prenait place et rendait la pré-lamine A aussi toxique. C'est pourquoi la combinaison d'un aminobisphosphate (zoledronate, Zo) et de statine (pravastatine, Pra) a été utilisée pour bloquer à la fois la farnesylation et la geranyl-geranylation de la progérine/pré-lamine A (Varela et al. 2008). Vingt patients ont reçu la combinaison ZoPra entre 2008 et 2013, les résultats n'ont pas encore été publiés.

Chapitre 5

Présentation du projet de recherche et de ses objectifs

Chapitre 5 Présentation du projet de recherche et de ses objectifs

I. Contexte général à l'origine du projet de thèse

A mon arrivée dans l'équipe de Patrick Vicart, les thématiques de recherche étaient axées autour de deux protéines des filaments intermédiaires et de leur implication dans des pathologies, la desmine et la lamine. Plus particulièrement, le groupe de Brigitte Buendia, Isabelle Duband-Goulet et Nathalie Vadrot travaillait sur les laminopathies et cherchait à déterminer les mécanismes moléculaires sous-jacents à ces pathologies associées à des mutations dans le gène *LMNA* dans différents modèles cellulaires. Depuis près de 15 ans, Brigitte Buendia a étudié ces mécanismes dans le contexte des pathologies FPLD, AD-EDMD et progéria (HGPS). Ayant rejoint le laboratoire pour mon stage Master 2, j'ai contribué à une étude qui a mis en évidence la dérégulation de l'activité du facteur de transcription SREBP1 dans le contexte FPLD (Vadrot et al. 2014). Par la suite, c'est le Dr Corinne Vigouroux, collaboratrice de longue date de Brigitte Buendia, qui nous a informé du cas d'une patiente atteinte d'une laminopathie d'un autre type, une L-CMD avec atteinte lipodystrophique, causée par une nouvelle mutation du gène *LMNA*, la mutation p.Arg388Pro abrégée en R388P. En effet, le Dr C. Vigouroux a commencé à suivre cette patiente sur le plan endocrinologique lorsque le phénotype lipodystrophique est apparu, quelques années après que l'identification de la mutation *LMNA* ait été faite. Ainsi, en accord avec le Dr Corinne Vigouroux, mon projet de thèse concernant le rôle de la mutation *LMNA* p.R388P a pris le jour.

II. Axes du projet de recherche

Mon projet de recherche a été défini afin d'évaluer l'impact de la mutation de la lamine A R388P au niveau cellulaire et d'aborder les mécanismes physiopathologiques responsables des phénotypes associés chez la patiente. Nous avons développé différents axes de recherche correspondant à différentes questions posées dans différents modèles utilisés.

Dans un premier temps, nous nous sommes demandé quel impact les lamines A R388P pouvaient avoir au niveau cellulaire quand elles étaient exprimées de manière physiologique. Les fibroblastes que nous avons pu récupérer de la patiente grâce au Pr/Dr C. Vigouroux nous ont permis de répondre à cette question. J'ai étudié d'une part l'expression et les propriétés de localisation et de solubilité des lamines A/C, et d'autre part, la capacité de prolifération de ces cellules. En fait, l'entrée prématurée en sénescence des fibroblastes de la patiente ne nous a pas permis d'élargir notre étude dans ce modèle cellulaire. Nous avons alors utilisé d'autres modèles cellulaires pour déterminer l'impact de l'expression de la lamine mutante sur l'intégrité du compartiment nucléaire (dans des cellules HeLa et les myoblastes C2C12), l'organisation du génome (dans des cellules HeLa)

et la capacité de myoblastes à suivre le programme de différenciation myogénique (dans les myoblastes C2C12). Ces deux modèles cellulaires nous ont permis de comparer les propriétés des lamines mutantes dans des types cellulaires différents mais aussi dans des espèces différentes (humaine et murine pour les cellules HeLa et C2C12 respectivement).

Nous nous sommes également demandé quel impact l'expression de la lamine mutante pouvait avoir sur un muscle entier et sur l'intégrité des fibres musculaires. Pour cela nous avons développé une approche d'investigation de l'animal en utilisant l'injection d'AAV (*Adeno Associated Virus*) porteurs du gène *LMNA* sauvage ou portant la mutation p.R388P dans un muscle de souris.

Chapitre 6

Présentation du cas clinique de la patiente HER Lo

Chapitre 6 Présentation du cas clinique de la patiente HER Lo

L'identification de la mutation p.R388P dans le gène *LMNA* comme responsable de dystrophie musculaire congénitale a été faite chez la patiente Lo HER l'année de ses 11 ans, elle a aujourd'hui 21 ans.

I. Dystrophie musculaire congénitale

La patiente nommée ici HER Lo, née de parents caucasiens non apparentés, a présenté dès l'âge de 12 mois des signes d'instabilité responsables de chutes fréquentes. Par la suite, elle a eu des difficultés à apprendre à courir et à monter les escaliers. A l'âge de 3 ans elle a été suivie par le Dr Michèle Mayer suite à un examen ayant mis en évidence une démarche dandinante en hyperlordose, un déficit des ceintures surtout pelvien, une hypertrophie des mollets et une aréflexie tendineuse. L'électromyographie était myogène, c'est à dire caractéristique d'une myopathie alors que l'IRM cérébrale était normale. L'analyse sanguine a détecté un niveau de créatine kinase (CK) sérique élevé (révélant la nécrose des fibres musculaires). L'analyse d'une biopsie musculaire a montré une dystrophie typique avec une expression normale des protéines sarcolemmiques, de la calpaïne et de la dysferline (des protéines dont des mutations sont responsables de dystrophie musculaire). Le séquençage du gène *FKRP* (*Fukutin Related Protein*) (un gène dont des mutations causent entre autres des dystrophies musculaires congénitales) n'a pas révélé de mutations.

A 5 ans, la patiente ne marchait plus à l'extérieur et se fatiguait à la marche domestique. A partir de 6 ans et demi, des rétractions des muscles axiaux rendant la colonne rigide et un équin-varus du pied droit sont apparus, ainsi qu'une hyperextension du genou (*recurvatum* du genou). Des corrections par plâtres et appareils orthopédiques ont alors été mis en place. Cependant, à partir de l'âge de 11 ans, la patiente a perdu totalement la déambulation et a présenté des rétractions myotendineuses généralisées (rigidité de la colonne vertébrale, des coudes, des genoux, des hanches et des chevilles).

II. Lipodystrophie

La lipodystrophie de la patiente s'est installée progressivement à la puberté avec une accumulation de tissu adipeux sous cutané au niveau du cou avec une petite bosse de bison ou *buffalo neck* et un comblement des creux sus-claviculaires, une accumulation proximale de tissu adipeux (bras, cuisses, abdomen et visage avec un faciès arrondi), une lipoatrophie qui atteint la partie distale des membres (avant-bras et jambes) puis avec une oligomenorrhée, une intolérance

glucidique et une insulino-résistance sans retentissement endocrinien. Ses symptômes lipodystrophiques se sont nettement améliorés suite à la perte de poids de la patiente (moins 12 kg en deux ans). C'est le Dr Corinne Vigouroux, qui a suivi cette patiente sur le plan endocrinologue après l'apparition des symptômes lipodystrophiques.

III. Atteinte respiratoire

Depuis l'âge de 9 ans, l'hyperlordose a conduit à une insuffisance respiratoire restrictive qui a progressé lentement. Chez la patiente âgée de 18 ans, l'insuffisance a présenté un index de Tiffeneau-Pinelli de 49% (cet index qui correspond au rapport du volume maximal expiré pendant la première seconde d'expiration forcée sur la capacité vitale forcée est considéré comme anormal en dessous de 65%) et des anomalies polysomnographiques modérées.

IV. Atteinte cardiaque

Des analyses par Holter, des dispositifs portables permettant l'enregistrement en continu de l'électrocardiogramme pendant au moins 24 h, ont révélé une hyperexcitabilité supra ventriculaire fréquente, une brève salve de tachycardie atriale sans pause et la notion de deux accès de tachycardie mal supportés à 10 ans. Du bisoprolol (cardensiel) lui a alors été administré. Bien qu'à 12 ans l'ECG n'a plus montré d'élément d'hyperexcitabilité, à 13 ans le Holter-ECG a détecté une hyperexcitabilité mixte (supra- et ventriculaire) symptomatique. Le bisoprolol a ensuite été augmenté progressivement pour améliorer les fonctions cardiaques de la patiente et le traitement est toujours suivi.

V. Identification de la mutation du gène *LMNA*

C'est l'association d'une dystrophie musculaire avec rétractions et le développement progressif d'un morphotype lipodystrophique depuis le début de la puberté de la patiente (à 11 ans) qui a amené la même année à faire séquencer le gène *LMNA* (en 2006). En effet, comme mentionné au Chapitre 4 « Les laminopathies » des mutations dans le gène *LMNA* avaient été reconnues comme responsables de dystrophie musculaires ou de lipodystrophies quelques années auparavant (Bonne et al. 1999; Shackleton et al. 2000; Vigouroux et al. 2001). Au CHU de la Pitié Salpêtrière (Paris), Le Dr Delphine Héron et ses collègues ont alors identifié une mutation hétérozygote dans l'exon 7 du gène, correspondant au niveau de la protéine à la mutation Arg388Pro.

Chapitre 7

Les lamines A/C R388P et leur impact dans des fibroblastes de peau de la patiente

Chapitre 7 Les lamines A/C R388P et leur impact dans des fibroblastes de peau de la patiente

Grâce à notre collaboration avec le Dr Corinne Vigouroux au centre de recherche Saint-Antoine (Paris), nous avons obtenu des fibroblastes de peau issus de biopsies de peau réalisées chez la patiente HER Lo et chez des contrôles (dont les fibroblastes HER contrôles prélevés chez la mère de la patiente). Bien que ce type cellulaire n'est à priori pas atteint dans la pathologie, les fibroblastes de peau présentent l'énorme avantage d'exprimer les lamines A/C WT et R388P à un niveau physiologique. De plus, des phénotypes typiques des laminopathies ont déjà été décrits dans ce type cellulaire, avec notamment une (dés-)organisation en nid d'abeille du réseau des lamines A/C (Vigouroux et al. 2001; Muchir et al. 2004; Verstraeten et al. 2009). Du fait qu'en cultivant ces fibroblastes, je me suis rapidement rendue compte qu'ils proliféraient beaucoup moins vite que les contrôles, j'ai donc décidé d'évaluer leur capacité à entrer prématurément en sénescence, un critère préalablement associé à différents contextes de laminopathies.

I. Dans une sous-population de fibroblastes de la patiente, le réseau de lamina est désorganisé

A. Expression des lamines A/C

Dans un premier temps nous avons testé si la mutation dans le gène *LMNA* conduisait à une altération de l'expression des protéines Lamines A/C. Nous avons comparé des extraits protéiques préparés à partir de différentes populations de fibroblastes (aux passages 10, 11, 12 et 14), par la technique de western blot. Les anticorps primaires que nous avons utilisés pour révéler les lamines de type A endogènes sont dirigés contre la région NLS située en aval de l'a.a 388 ; c'est pourquoi, ils reconnaissent aussi bien les deux isoformes, A et C, sauvages et mutants (Figure 30). La quantification des signaux ainsi obtenus par western blot n'a pas révélé de différence d'expression au niveau protéique de la lamine A entre les fibroblastes de la patiente et les fibroblastes contrôles. Cependant, de manière inattendue, l'analyse par qPCR des ARNm codant spécifiquement la lamine A a mis en évidence une augmentation de 2,7 fois dans la quantité des ARNm codant la lamine A dans les fibroblastes de la patiente HER Lo versus les fibroblastes contrôles. Nous pouvons donc imaginer que l'accroissement de la quantité d'ARNm compenserait une diminution de la stabilité des protéines lamines A WT/R388P dans les fibroblastes de la patiente par rapport aux lamines A WT dans les fibroblastes contrôles. Malheureusement, le manque de matériel cellulaire à notre disposition ne nous a pas permis de tester cette hypothèse. Pour ce qui est de la lamine C, nous n'avons pas pu créer d'amorces spécifiques utilisables pour des expériences de qRT-PCR et n'avons donc pas pu

comparer les niveaux d'expression des ARNm codant la lamine C dans les différentes populations de fibroblastes. Par contre, les analyses de western blots ont révélé que les fibroblastes de la patiente exprimaient 40% moins de lamine C que les fibroblastes contrôles (signal relatif : $0,61 \pm 0,13$ vs 1, respectivement). En conclusion, ces résultats indiquent que la mutation du gène *LMNA* responsable de L-CMD affecte l'expression des lamines de type A dans les fibroblastes de peau.

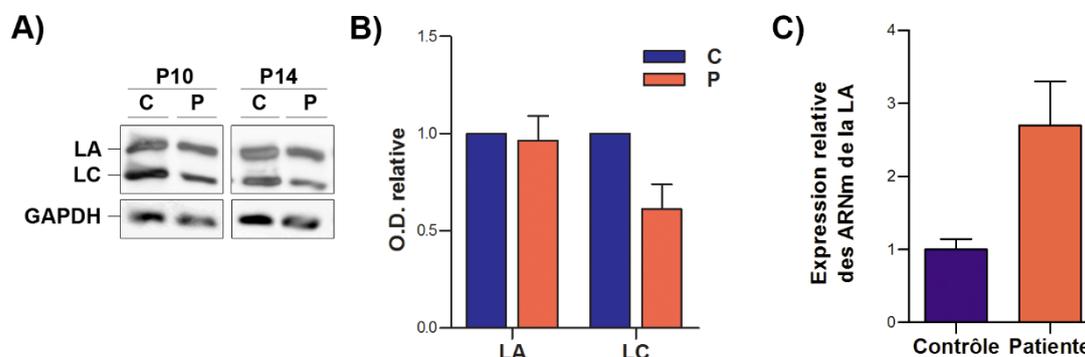


Figure 30 : Expression protéique et transcriptomique des lamines A/C dans des fibroblastes de patiente.

A) Expression des lamines A/C dans les fibroblastes de la patiente HER Lo par rapport aux fibroblastes contrôles au cours des passages 10 et 14. Les Western blots ont été révélés avec des anticorps de lapin anti-LA/C et lapin anti-GAPDH. La quantification des signaux ECL observée en A est illustrée en B). **C)** Quantification relative des ARNm du gène *LMNA* (amorces qPCR désignées comme spécifiques pour l'isoforme lamine A) dans les fibroblastes de la patiente et des fibroblastes contrôles.

B. Distribution des lamines A/C

Dans le but d'identifier s'il existait des anomalies d'organisation du réseau de lamina dues à la mutation *LMNA* R388P, la localisation des lamines A/C a été étudiée par immunofluorescence des fibroblastes à différents passages (p10, p11 et p12 pour les cellules de la patiente, p8, p9 et p10 pour les cellules contrôles).

Dans les fibroblastes contrôles, les lamines A/C sont localisées particulièrement à la périphérie du noyau mais également dans le nucléoplasme. Deux phénotypes majeurs ont été observés relatifs à la morphologie du noyau, soit normal où les noyaux sont ovales ou dysmorphique où le noyau a une forme non ovoïde. Les fibroblastes contrôles et ceux de la patiente HER Lo présentent ces phénotypes avec des pourcentages similaires ($84 \pm 4\%$ vs $81 \pm 2\%$ de noyaux normaux et $16 \pm 4\%$ vs $15 \pm 2\%$ de noyaux dysmorphiques).

De plus, un phénotype rare ($4 \pm 3,5\%$ des cellules) et spécifique des fibroblastes de la patiente est caractérisé par un réseau de lamines A/C présentant un aspect en nid d'abeille (Figure 31). Nous n'avons pas observé de corrélation entre le nombre de passage des cellules et le pourcentage de noyaux avec un réseau de lamine A/C ayant une structure en nid d'abeille. Ce phénotype n'est pas nouveau car il a déjà été observé dans d'autres contextes de laminopathies (par ex. dans 3-10% des fibroblastes de patients atteints de FPLD en raison de la mutation *LMNA* p.R482W (Vigouroux et al. 2001) et dans 7,5% des myoblastes C2C12 surexprimant une mutation responsable d'Emery-Dreifuss en raison de la mutation p.R453W (Favreau et al. 2004)).

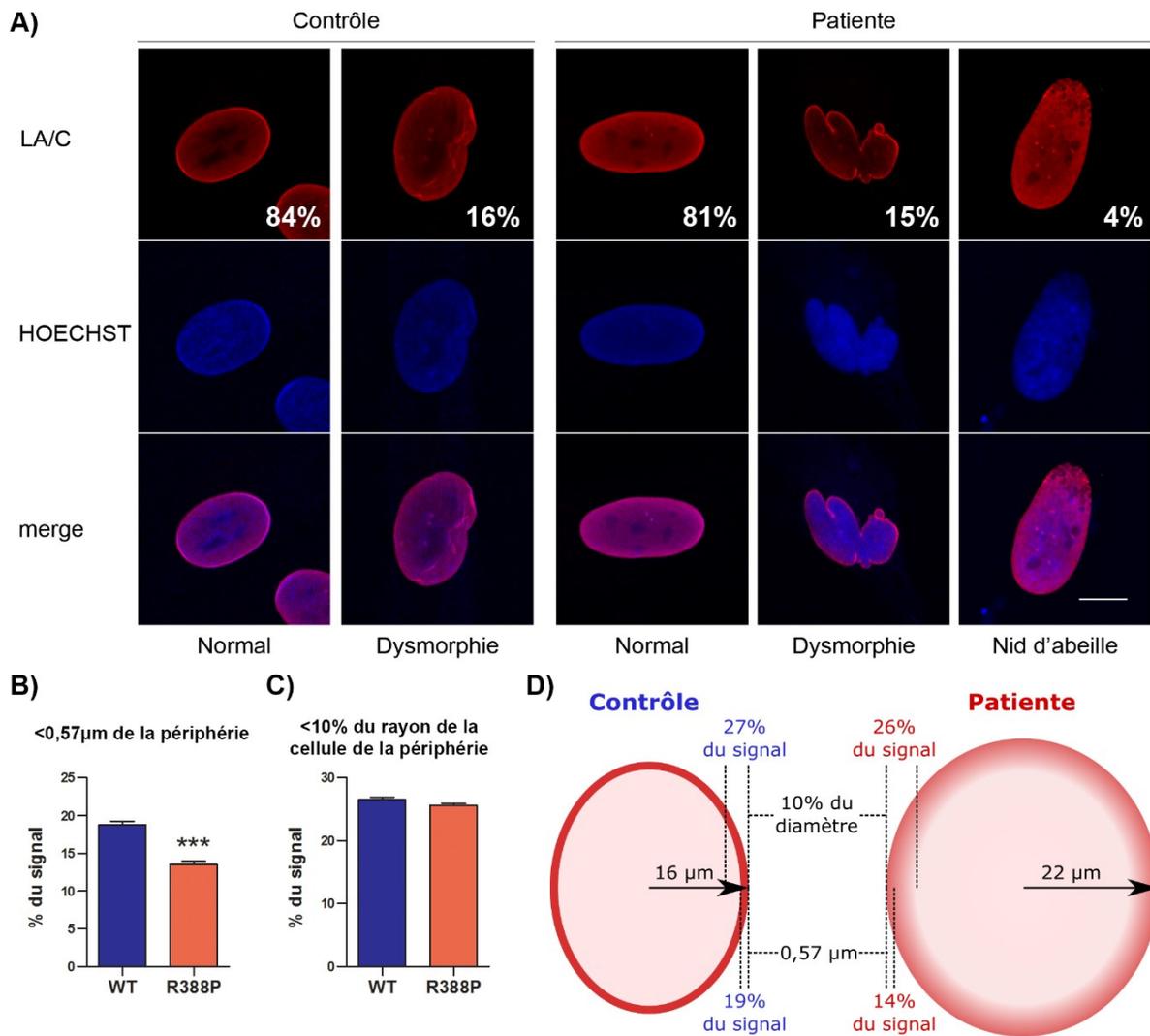


Figure 31 : Localisation des lamines A/C dans des fibroblastes de peau.

Des fibroblastes contrôles et de la patiente ont été fixés puis soumis à une immunofluorescence avec un anticorps anti-LA/C (rouge) et l'ADN marqué au HOECHST (bleu). Barre d'échelle 10 µm (A)). B) Pourcentage des signaux des lamines A/C localisés à moins de 0,57 µm de la périphérie des noyaux pour chaque type cellulaire. C) Pourcentage des signaux des lamines A/C localisés à une distance inférieure à 10% du rayon de chaque cellule de la périphérie. Test de Mann Whitney. D) Schéma représentant la localisation des lamines A/C dans les fibroblastes de peau.

Nous pouvons également noter que la répartition intranucléaire (périphérie vs centre du noyau) des lamines A/C est légèrement différente entre les fibroblastes HER contrôles (mère de la patiente) et les fibroblastes de la patiente. En effet, après immunofluorescence et observation au microscope confocal, j'ai quantifié les signaux lamines A/C sur les acquisitions d'images grâce à un plugin ImageJ développé pour nous par le Dr Fabien Gerbal (Université Paris Diderot, laboratoire Matière et Systèmes Complexes). Alors que 19% du signal des lamines A/C dans les fibroblastes contrôles est localisé à moins de 0,57 µm de la périphérie des noyaux, seulement 14% du signal est localisé à cette même distance dans les fibroblastes de la patiente (Figure 31 B)). Cependant, les noyaux des fibroblastes de la patiente sont plus gros que ceux des contrôles (Figure 38 D)). En prenant en compte ce paramètre et ne déterminant pas une distance à la périphérie fixe mais relative à la taille des noyaux (10% du rayon), nous n'observons plus de différence de la proportion de signal périphérique (Figure 31 C)). La localisation des lamines A/C à la périphérie des noyaux des fibroblastes de la patiente est donc plus diffuse que celle des fibroblastes contrôles, nous ne pouvons

cependant pas dire si ce défaut de localisation est dû aux propriétés des lamines A/C R388P ou si elle est due à l'augmentation de la taille des noyaux (Figure 31 D)).

C. Solubilité des lamines A/C

Dans les cellules, en raison de leur assemblage en polymères, les lamines sauvages sont résistantes à des extractions biochimiques en présence de sel (NaCl) et détergeant (Triton X-100). La résistance à l'extraction des lamines A/C mutantes R388P a été évaluée en suivant un protocole d'extraction différentiel, initialement développé par Fey et ses collaborateurs (Fey et al. 1984). Ce protocole permet de récupérer dans un premier temps la fraction S1 enrichie en protéines solubles et les phospholipides grâce au Triton X-100, puis la fraction S2 enrichie en éléments du cytosquelette peu résistants aux sels, puis la fraction S3 enrichie en protéines associées à la chromatine, et enfin la fraction insoluble (Ins) comprenant les protéines liées aux filaments intermédiaires et à la matrice nucléaire.

La solubilité des lamines A/C endogènes de fibroblastes contrôles et de fibroblastes de la patiente a été étudiée. Du fait des difficultés des fibroblastes de la patiente HER Lo à proliférer, nous n'avons pu réaliser l'expérience qu'une seule fois. Dans les fibroblastes HER contrôles, la majorité des lamines A/C sont présentes dans la fraction insoluble (93,6%). Il en est de même avec les fibroblastes HER Lo, puisque 85,7% des lamines A/C sont présentes dans la fraction insoluble et 11,8% dans la fraction du cytosquelette (Figure 32). Ces résultats n'ont pas montré de différence importante de solubilité des lamines A/C chez la patiente HER Lo avec 85,7% des lamines insolubles versus 93,6% chez le contrôle.

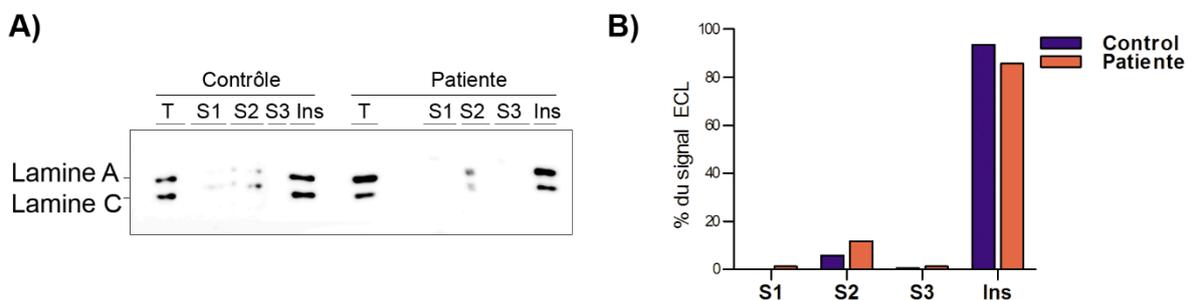


Figure 32 : Solubilité des lamines A/C dans des fibroblastes de peau.

Les protéines ont été extraites séquentiellement afin de récupérer les fractions (S1) solubles, (S2), du cytosquelette, (S3) associées à l'ADN et (Ins) insolubles. **A)** Les extraits protéiques totaux (T) et les différentes fractions ont été analysés par western blot et les protéines révélées avec des anticorps de lapin anti-LA/C, **B)** le % des signaux ECL a été calculé pour chaque fraction par rapport à la somme des intensités des signaux ECL.

II. Localisation *in situ* de différentes protéines associées à l'enveloppe nucléaire et à la chromatine, dans le contexte L-CMD.

Nous avons testé si la désorganisation du réseau de lamines A/C observée dans une sous population de fibroblastes de la patiente, entraînait une altération dans la localisation d'autres composants nucléaires.

A. Déplétion locale de lamine B1

La lamine B1 est un partenaire direct des lamines A/C, localisé à l'enveloppe nucléaire. Nous avons dans un premier temps réalisé des co-immunofluorescences avec des anticorps de lapin anti-Lamine B1 et de souris anti-Lamines A/C. Comme attendu, dans les fibroblastes contrôles et ceux de la patiente qui présentaient un phénotype normal, les lamines A/C et la lamine B1 colocalisent à la périphérie nucléaire (Figure 33). Dans les cellules où le réseau de lamines A/C forme des structures en nid d'abeilles, la lamine B1 colocalise avec les lamines A/C. Cependant, dans les fibroblastes de la patiente présentant des dysmorphies nucléaires, la lamine B1 est déplétée localement à un pôle du noyau. Ces phénotypes anormaux de la lamine B1 ont déjà été décrits pour des fibroblastes de peau de patients atteints de FPLD (Vigouroux et al. 2001) ou encore dans des MEFs *Lmna*^{-/-} pour les dysmorphies nucléaires (Sullivan et al. 1999). Ainsi, en altérant la localisation de son partenaire la lamine B1, les lamines A/C mutantes p.R388P conduisent à une désorganisation globale de la lamina.

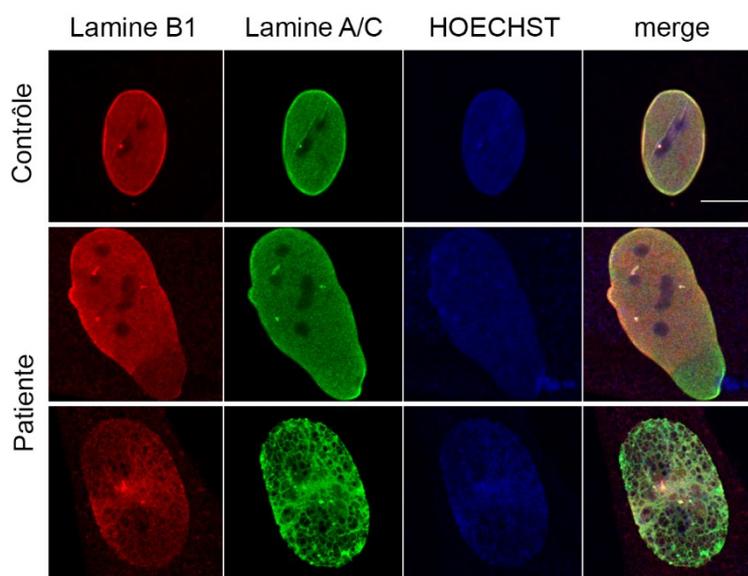


Figure 33 : Localisation de la lamine B1 dans des fibroblastes de peau.

Des fibroblastes contrôles et de la patiente HER Lo ont été fixés et les protéines d'intérêt marquées par co-immunofluorescence avec des anticorps de lapin anti-LB1 (lamine B1, rouge) et de souris anti-LA/C (lamines A/C, vert). L'ADN a été marqué par du Hoechst (Bleu). Barre d'échelle 10 µm.

B. Altération conjointe de la localisation des lamines A/C R388P et de l'émerine à l'enveloppe nucléaire

Comme attendu du fait que l'émerine est un partenaire directe des lamines A/C, elles colocalisent à l'enveloppe nucléaire dans les fibroblastes contrôles mais aussi dans les fibroblastes de la patiente qui présentent un phénotype normal (Figure 34). De même, l'émerine colocalise avec les lamines A/C qui forment un réseau en nid d'abeilles dans les fibroblastes de la patiente. Nos données suggèrent que les lamines A/C R388P seraient toujours capables d'interagir avec l'émerine, et entraîneraient leur délocalisation. Ce type d'observation avait aussi été décrit dans les fibroblastes de patients atteints de FPLD (Vigouroux et al. 2001).

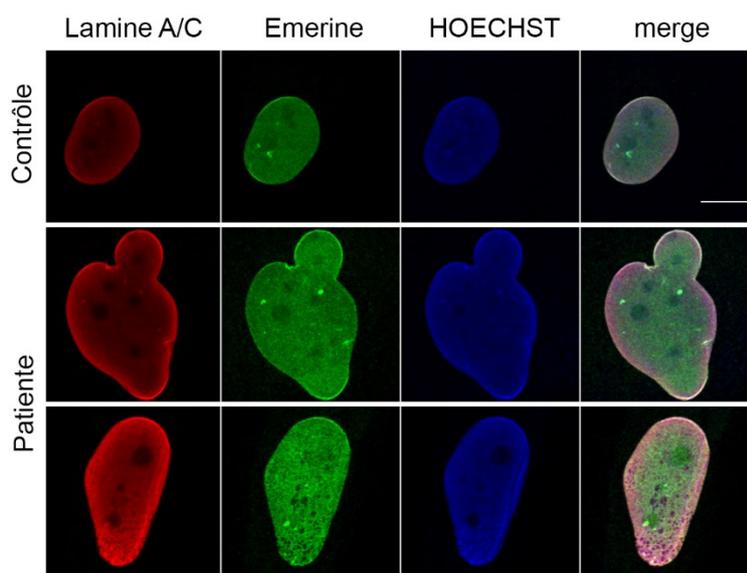


Figure 34 : Localisation de l'émerine dans des fibroblastes de peau.

Des fibroblastes contrôles et de la patiente HER Lo ont été fixés et les protéines d'intérêt révélées par co-immunofluorescence avec des anticorps de souris anti-émerine (vert) et de lapin anti-LA/C (rouge) ; l'ADN est marqué avec du Hoechst (Bleu). Barre d'échelle 10µm.

C. Déplétion non systématique de Nup153 au niveau des dysmorphies nucléaires

La protéine Nup153 est une nucléoporine localisée au niveau du panier des pores nucléaires. Dans les fibroblastes de peau contrôles et de la patiente, les anticorps anti-Nup153 révèlent par immunofluorescence les pores au niveau de l'enveloppe nucléaire sous forme d'un marquage ponctiforme homogène (Figure 35). Dans les fibroblastes de la patiente ayant des noyaux dysmorphiques, le marquage Nup153 est parfois absent des zones dysmorphiques.

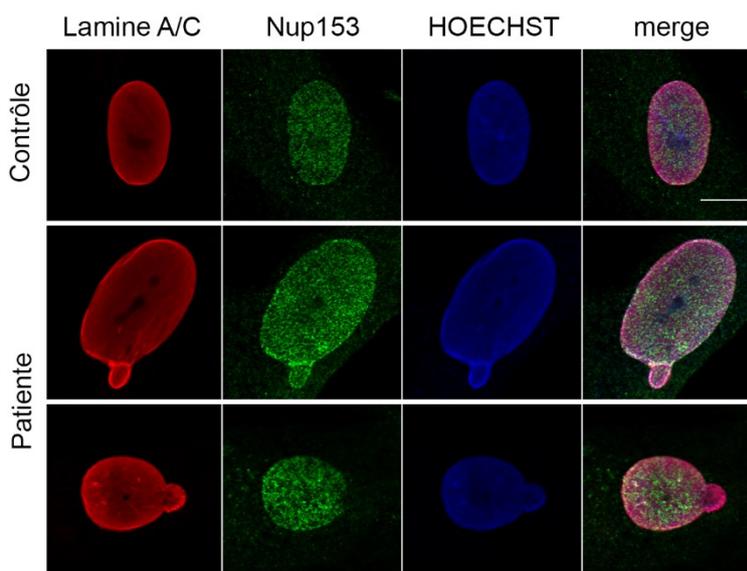


Figure 35 : Localisation de la nucléoporine Nup153 dans des fibroblastes de peau.

Des fibroblastes contrôles et de la patiente HER Lo ont été fixés et les protéines d'intérêt marquées par co-immunofluorescence avec des anticorps de souris anti-Nup153 (vert) et de lapin anti-LA/C (rouge) ; l'ADN a été marqué avec du Hoechst (Bleu). Barre d'échelle 10 µm.

D. Perte des foci d'HP1 α dans les cellules présentant un réseau de lamina structuré en nid d'abeille

La protéine HP1 α est couramment utilisée comme marqueur de l'hétérochromatine. Par immunofluorescence, HP1 α est détectée de manière homogène dans tout le noyau avec en plus quelques foci plus intenses ; et ce dans les fibroblastes contrôles et les fibroblastes de la patiente. Cependant, on note que plus les structures en nid d'abeille formées par les lamines A/C sont importantes moins on détecte de foci de HP1 α (Figure 36), témoignant ainsi d'un changement dans l'organisation globale de la chromatine.

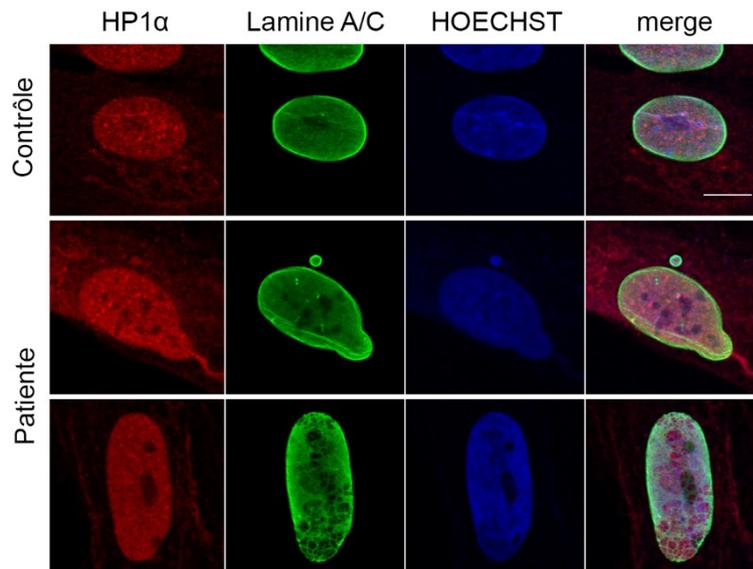


Figure 36 : Localisation de la protéine de l'hétérochromatine HP1 α dans des fibroblastes de peau.

Des fibroblastes contrôles et de la patiente HER Lo ont été fixés puis les protéines d'intérêt marquées par co-immunofluorescence avec des anticorps de lapin anti-HP1 α (rouge) et de souris anti-LA/C (vert) ; l'ADN a été marqué avec du Hoechst. Barre d'échelle 10 μ m.

E. Localisation normale de LAP2 α dans des fibroblastes de la patiente HER Lo

Par immunofluorescence, LAP2 α qui est un partenaire nucléoplasmique des lamines A/C est détecté dans le nucléoplasme de manière diffuse dans toutes les populations de fibroblastes analysées. (Figure 37). L'immunofluorescence ne permet donc pas de révéler un impact particulier des lamines A/C R388P sur la localisation nucléoplasmique de LAP2 α .

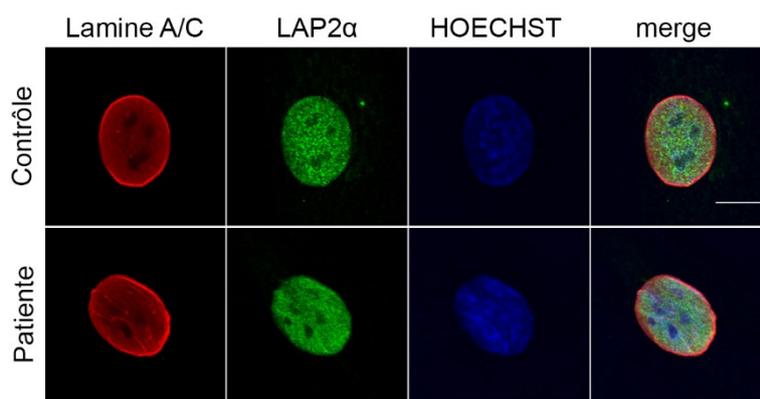


Figure 37 : Localisation de LAP2 α dans des fibroblastes de peau.

Des fibroblastes contrôles et de la patiente HER Lo ont été fixés puis les protéines d'intérêt marquées par co-immunofluorescence avec des anticorps de lapin anti-LAP2 α (vert) et de souris anti-LA/C (rouge) ; l'ADN a été marqué par du Hoechst. Barre d'échelle 10 μ m.

III. Les fibroblastes de la patiente HER Lo sont sénescents prématurément

Le temps de doublement de la population pour les fibroblastes de la patiente étant 1,7 fois plus important que celui des fibroblastes contrôles, (Figure 38 E)), j'ai testé si la raison en était l'entrée en sénescence prématurée d'une partie de cette population. C'est pourquoi, j'ai évalué différents critères connus pour caractériser la sénescence, tels que l'augmentation de la taille du cytoplasme et du noyau (Mitsui and Schneider 1976), la diminution de l'expression de lamine B1 (Dreesen et al. 2013; Shimi et al. 2011) et l'augmentation de l'activité de la β -galactosidase.

Alors que les fibroblastes contrôles en prolifération ont une forme fusiforme ou étoilée (passage 11), les fibroblastes de la patiente sont beaucoup plus étalés (passage 9) (Figure 38 C). De plus, le diamètre moyen des noyaux était de $16 \pm 3\mu$ m et de $21 \pm 5\mu$ m pour les fibroblastes contrôles (passage 11) et les fibroblastes de la patiente (passage 13), respectivement (Figure 38 D)).

Le ratio de lamine B1 entre les fibroblastes de la patiente et les fibroblastes contrôles a diminué au fur et à mesure des passages des cellules, variant de 1,13 au passage 10 à 0,645, 0,362 et 0,255 aux passages 11, 12 et 14, respectivement (Figure 38 A) et B)). En comparaison, l'expression de lamine A est restée similaire dans les deux types de fibroblastes au fur et à mesure des passages (Figure 30A-B)).

L'enzyme β -galactosidase catalyse l'hydrolyse de β -galactosides en monosaccharides à pH 6,0, uniquement dans les cellules sénescents. J'ai quantifié à 21% et 65% la fréquence des cellules sénescents pour les fibroblastes contrôles (Passage 9) et les fibroblastes de la patiente HER Lo (Passage 6), respectivement (Figure 38 F)).

Du fait justement de la difficulté de cultiver les fibroblastes de la patiente, toutes les expériences n'ont pas pu être répétées trois fois. Cependant, les différentes données obtenues indiquent toutes que les fibroblastes de la patiente HER Lo entrent en sénescence prématurément.

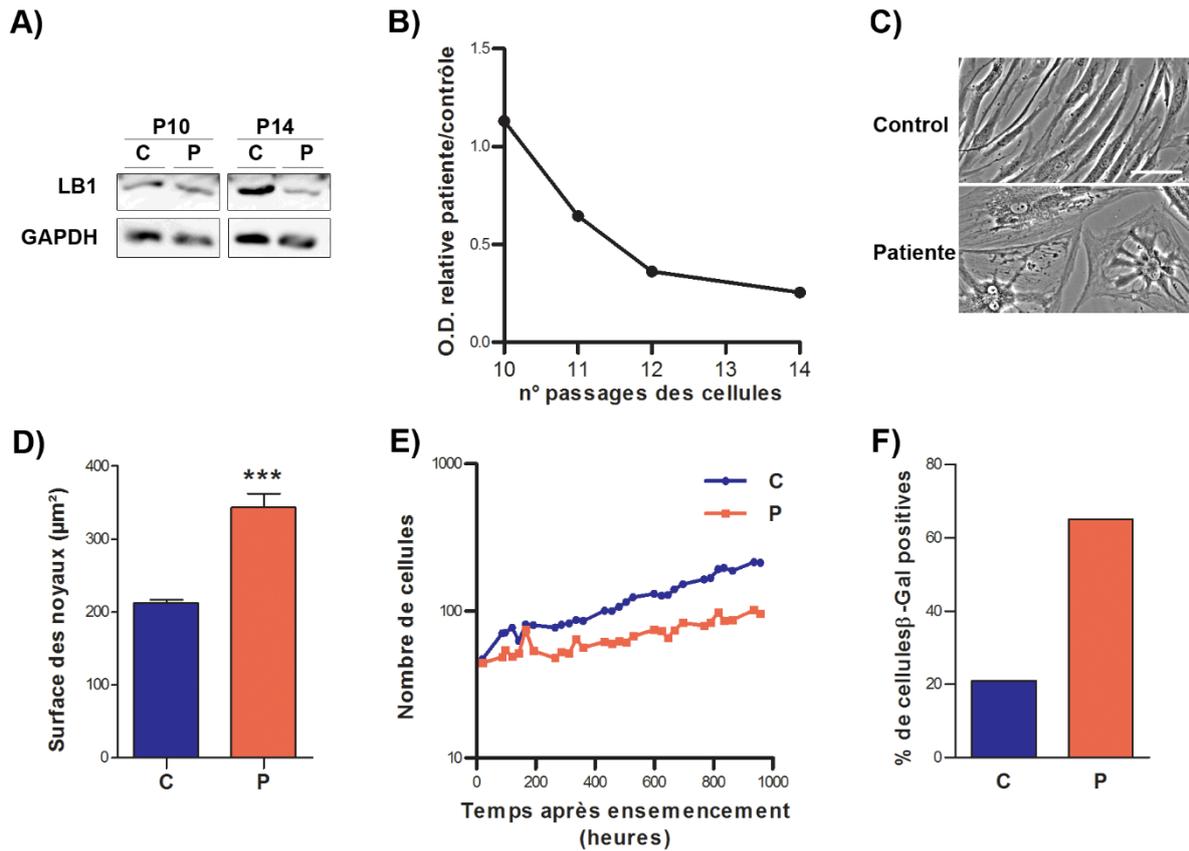


Figure 38 : Senescence des fibroblastes de la patiente HER Lo.

A) Analyse de l'expression de la lamine B1 et de la lamine A dans les fibroblastes de la patiente HER Lo par rapport aux fibroblastes contrôles aux passages 10 et 14 par Western blots révélés avec des anticorps anti-LB1 et anti-GAPDH. La quantification des signaux ECL est illustrée en **B)** pour la lamine B1 (ratio patiente/contrôle). $n = 3$ **C)** Morphologie des fibroblastes contrôles (P11) et de la patiente HER Lo (P9) par observation au microscope en contraste de phase. Barre = 100 µm. **D)** Taille des noyaux de fibroblastes contrôles et de la patiente HER Lo. **E)** Nombre de fibroblastes de la patiente HER Lo ou de contrôles après ensemencement au cours du temps. **F)** Test à la β-galactosidase pour détecter la senescence de fibroblastes contrôles (P9) et de la patiente HER Lo (P6). Les pourcentages de cellules sénescents sont illustrés.

Chapitre 8

**Impact de la mutation R388P de
la lamine A dans le modèle
cellulaire humain des cellules
HeLa**

Chapitre 8 Impact de la mutation R388P de la lamine A dans le modèle cellulaire humain des cellules HeLa

Etant donné la difficulté de cultiver les fibroblastes de la patiente HER Lo, nous avons décidé d'utiliser un autre modèle cellulaire qui nous permettrait d'approfondir l'impact de la mutation R388P de la lamine A. En un premier temps, nous avons opté pour des cellules HeLa que nous avons transfectées transitoirement afin de surexprimer la lamine A sauvage ou mutée R388P. Ces cellules ont l'avantage d'être d'origine humaine et facilement transfectables.

I. Génération d'outils pour étudier l'expression ectopique des lamines A sauvages et mutées

Nous avons tout d'abord décidé de générer un plasmide pSVK3-lamine A R388P pour exprimer la lamine mutante avec une étiquette FLAG. Ce choix venait (1) du souhait de pouvoir comparer nos résultats avec d'autres préalablement obtenus dans le laboratoire concernant différents mutants lamines; (2) du fait que le promoteur SV40 du vecteur pSVK3 permet une expression modérée des protéines ectopiques. Cependant, pour des raisons inconnues, le séquençage de la construction de pSVK3-FLAG-preLA-R388P n'a jamais abouti. Ne prenant pas le risque de travailler avec un plasmide ayant une séquence non validée, nous avons décidé de générer d'autres plasmides. Ainsi, les séquençages corrects ont été obtenus pour les plasmides pCMV-FLAG-preLA-R388P et pEGFP-preLA-R388P. Les différents vecteurs utilisés au cours de nos études sont illustrés dans la Figure 39.

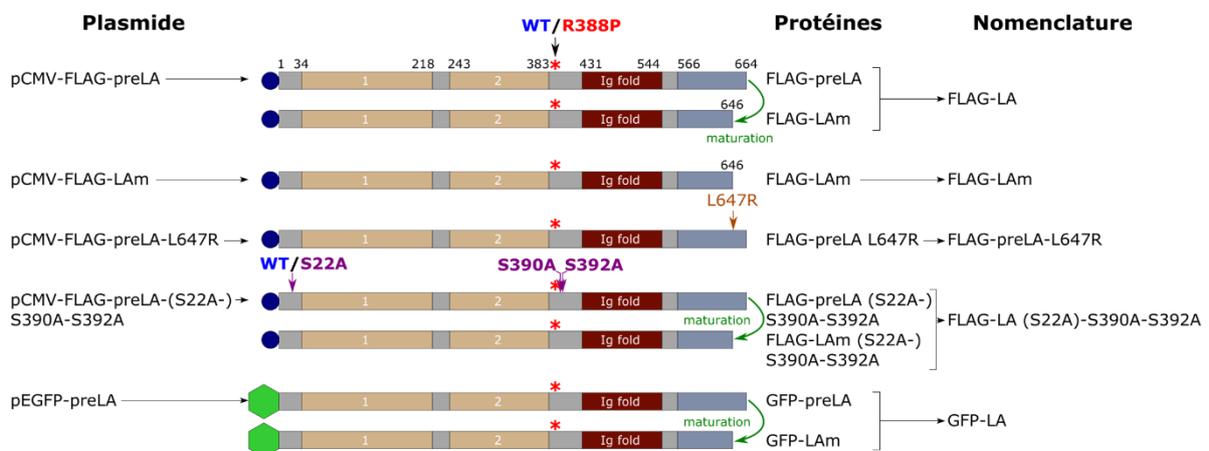


Figure 39 : Vecteurs utilisés au cours de ma thèse

Afin d'évaluer, l'expression des protéines ectopiques exprimées, nous avons effectué des westerns blots sur des extraits cellulaires totaux préparés 24 h post-transfection (Figure 40). La révélation avec un anticorps anti-FLAG a montré un doublé pour les lamines A ectopiques WT et R388P. La bande au plus faible poids moléculaire qui migre au même niveau que la lamine A issue des extraits de cellules transfectées avec le pCMV-FLAG-LAm-WT, correspond à la forme mature de lamine A. La bande au plus haut poids moléculaire qui migre au même niveau que la lamine A issue des extraits de cellules transfectées avec le pCMV-FLAG-preLA-L647R correspond à la forme précurseur nommée pré-lamine A. En effet, la pré-lamine A mutée p.Leu647Arg, abrégée en L647R, ne peut suivre le processus de maturation en lamine A en raison d'une mutation dans le site normalement reconnu par la protéase zmpste24 (voir le paragraphe « Processus de maturation des lamines et de leur import nucléaire »). L'accumulation d'un pool de pré-lamine A a été confirmé en utilisant un anticorps spécifique de la forme précurseur de la lamine A (Figure 40). Ainsi, dans nos conditions de transfection, les cellules HeLa expriment de manière ectopique de la lamine A mature mais également un pool de pré-lamine A, et ce aussi bien avec les lamines A sauvages que mutées R388P. Pour la suite de l'exposé de mes résultats, l'appellation lamines A (LA) concernera l'ensemble des lamines A, c'est à dire FLAG-preLA et FLA-LAm (Figure 40).

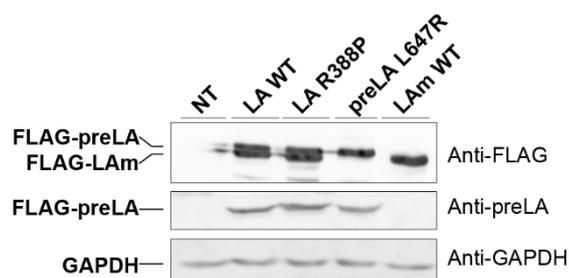


Figure 40 : Expression à la fois de pré-lamine A et de lamine A mature dans les cellules HeLa transfectées.
Western blots de protéines extraites de cellules HeLa transfectées avec le pCMV-FLAG-preLA WT, R388P ou L647R ou avec le pCMV-FLAG-LAm-WT révélés avec des anticorps anti-FLAG, anti-preLA et anti-GAPDH.

II. Comment estimer l'impact de la mutation lamine A R388P au sein des cellules ?

Entant donné la position (entre le coil-coil 2 et la région C-ter) et la nature de la mutation (R/P), on s'attendait à une altération de la formation des polymères stables (voir le Chapitre 11 « Discussion »). C'est pourquoi, nous avons décidé dans un premier temps d'étudier les propriétés d'assemblage des lamines A R388P dans les cellules HeLa (localisation, dynamique, solubilité). En un second temps, nous avons étudié les conséquences de l'expression de la lamine A mutante sur la localisation et les propriétés d'ancrage à la matrice nucléaire de quelques partenaires (les lamines A/C endogènes, la lamine B1, l'émerine, LAP2 α , SREBP1c). En parallèle, nous avons également commencé à nous intéresser à l'impact des lamines A R388P sur la morphologie des noyaux et l'organisation de la chromatine par immunofluorescence (marquage de l'ADN au Hoechst, histone H1 et histones modifiées). D'autre part, tirant avantage des propriétés très particulières et excitantes des lamines A R388P que nous avons mis en évidence dans les cellules HeLa, nous avons rapidement initié une collaboration avec le Pr Philippe Collas (Université d'Oslo, Norvège) dont le laboratoire a

une expertise dans la caractérisation des régions de la chromatine liées par les lamines. Ainsi, nous avons obtenu des informations concernant l'identification des domaines associés aux lamines (LADs) A mutées R388P, lesquelles ont été intégrées dans le projet dirigé par le Pr P. Collas concernant la modélisation de l'organisation du génome en 3D (article soumis à Genome Research).

III. Propriétés de la lamine A R388P dans les cellules HeLa

A. Localisation nucléoplasmique des lamines A R388P

Des cellules HeLa ont été transfectées avec le pCMV-FLAG-preLA-WT ou le pCMV-FLAG-preLA-R388P et soumises à une immunofluorescence avec des anticorps anti-FLAG afin de détecter spécifiquement les lamines ectopiques sauvages ou mutantes.

La lamine A dans les cellules HeLa est localisée comme dans les fibroblastes, c'est-à-dire qu'elle forme un liseré à la périphérie du noyau et est également présente dans le nucléoplasme. Ce phénotype normal est observé dans la majorité ($99 \pm 1\%$) des cellules transfectées avec le pCMV-FLAG-preLA-WT tandis que seulement $1 \pm 1\%$ des cellules présentent une distribution de lamine A uniquement nucléoplasmique. Dans les cellules transfectées avec le pCMV-FLAG-preLA-R388P, seulement $15 \pm 2\%$ ont un phénotype normal (lamine A à l'enveloppe nucléaire et dans le nucléoplasme) alors que la majorité ($85 \pm 2\%$) présentent la lamine A uniquement dans le nucléoplasme. Fréquemment ($46 \pm 4\%$ des noyaux dans les cellules transfectées), les lamines mutantes FLAG-LA R388P s'assemblent sous forme d'agrégats plus ou moins importants localisés ou non à la périphérie du noyau (Figure 41). Par immunofluorescence, les anticorps FLAG ne marquent que la périphérie de ces agrégats. Lorsque les lamines sont étiquetées avec GFP au lieu de FLAG, cela n'affecte pas la proportion des phénotypes observés. Dans ce cas, alors que le marquage avec des anticorps anti-GFP ne permet de visualiser que la périphérie des agrégats, l'observation directe de GFP permet de détecter les lamines A R388P aussi bien dans le contour des agrégats qu'à l'intérieur de ceux-ci (Figure 41 C)). J'ai observé que la formation de ces agrégats était lamine A dose dépendante puisqu'en réduisant de 3 fois la quantité de plasmide pour la transfection des cellules, il n'y a plus que 7% des noyaux qui présentent des agrégats de lamine A ($n = 1$). Par contre, l'accumulation nucléoplasmique exclusive de lamine A n'est pas dose dépendante.

De manière générale, les lamines A/C endogènes des cellules HeLa transfectées par le pCMV-FLAG-preLA-R388P sont localisées normalement à la périphérie du noyau et au sein du nucléoplasme. Dans le cas des fortes surexpressions de FLAG-LA R388P, le signal en immunofluorescence du FLAG ou des lamines A/C au sein du nucléoplasme est trop fort pour pouvoir déterminer s'il y a ou non une accumulation des lamines A/C à la périphérie nucléaire (Figure 41 D)).

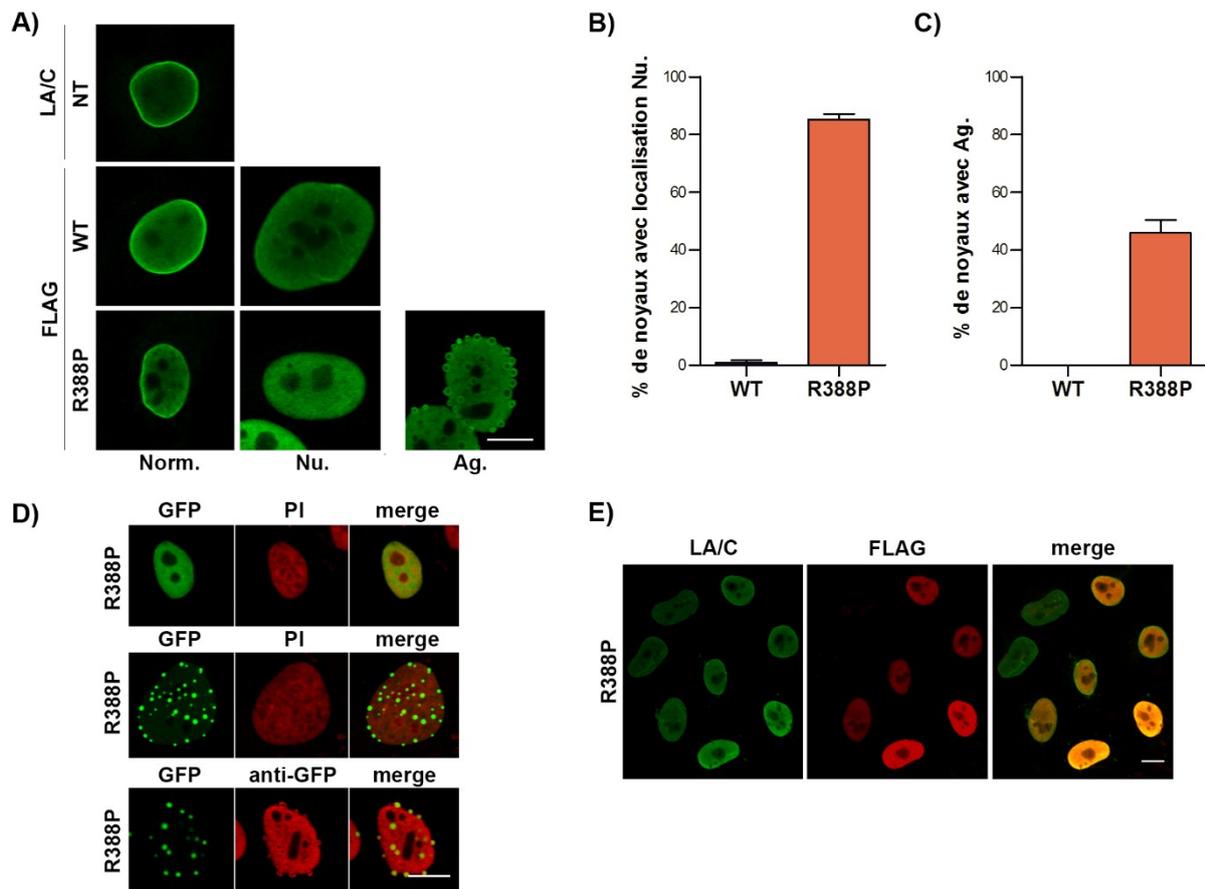


Figure 41 : Dans les cellules HeLa, les protéines FLAG/GFP-LA-R388P sont principalement nucléoplasmiques et s'accumulent dans des agrégats.

A) Des cellules HeLa non transfectées (NT), transfectées avec le pCMV-FLAG-preLA-WT ou R388P ont été fixées puis les protéines d'intérêt révélées par immunofluorescence avec des anticorps de lapin anti-LA/C ou lapin anti-FLAG. Quatre phénotypes ont été observés, Normal (Norm.), Nucléoplasmique (Nu.) ou Agrégats (Ag.). Barre d'échelle, 10 μm. Les pourcentages de noyau présentant chaque phénotype sont illustrés en **B)** et **C)** (n = 3). **D)** Des cellules HeLa ont été transfectées avec le pEGFP-preLA-R388P. L'ADN a été observé soit directement via la GFP soit grâce à des anticorps anti-GFP suite à une immunofluorescence. Entre le panel du haut et ceux du milieu et du bas, la force des lasers a été baissée car les agrégats de GFP-LA saturaient le signal. Barre d'échelle, 10 μm. **E)** Des cellules HeLa ont été transfectées avec le pCMV-FLAG-preLA-R388P et immunomarquées avec des anticorps anti-LA/C et anti-FLAG. Barre d'échelle, 10 μm.

B. Augmentation de la solubilité des lamines A R388P

24h post-transfection, les cellules ont été extraites selon le protocole développé par Fey et al. décrit précédemment (Fey et al. 1984) (Figure 42). Alors que les protéines FLAG-LA WT sont majoritairement insolubles ($61 \pm 5\%$), la fraction insoluble des FLAG-LA R388P ne représente que $16 \pm 7\%$ des protéines. Les fractions majoritaires pour les FLAG-LA R388P sont les fractions solubles (S1) et celle du cytosquelette (S2) avec respectivement $41 \pm 6\%$ et $30 \pm 7\%$ des protéines. En contraste, seulement $5 \pm 1\%$ des protéines FLAG-LA WT sont dans la fraction S1 et $19 \pm 2\%$ dans la fraction S2. La fraction S3 représente $15 \pm 3\%$ et $12 \pm 4\%$ des protéines respectivement pour les FLAG-LA WT et FLAG-LA R388P (Figure 42). En conclusion, Les protéines FLAG-LA R388P sont plus solubles que les FLAG-LA WT dans les cellules HeLa, témoignant d'une altération de la matrice nucléaire.

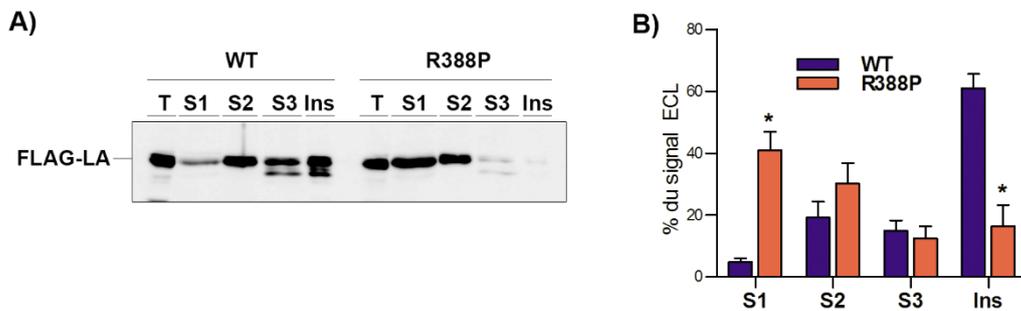


Figure 42 : Les protéines FLAG-LA R388P sont plus solubles que les protéines FLAG-LA WT dans les cellules HeLa.
A) Des cellules HeLa ont été transfectées avec le pCMV-FLAG-preLA WT ou R388P. Les protéines ont été extraites séquentiellement pour obtenir les fractions S1, S2, S3 et Ins. En parallèle, des extraits totaux ont également été réalisés. Les différentes fractions ainsi que les extraits totaux ont été analysés par western blots et les lamines ectopiques révélées par des anticorps anti-FLAG. Le pourcentage de signal ECL dans chaque fraction par rapport à la somme des signaux ECL est illustré en **B)**. $n = 3$ (Test de Kruskal-Wallis pour chaque fraction)

C. Augmentation de la dynamique des lamines A R388P

Nous avons collaboré avec le Dr Erwan Delbarre (laboratoire du Pr P. Collas, Oslo, Norvège), afin de faire des expériences de *Fluorescence Recovery After Photobleaching* (FRAP). Des cellules HeLa ont ainsi été transfectées avec le pEGFP-preLA-WT et pEGFP-preLA-R388P. Neuf cellules ont été analysées par condition, et le blanchiment (*bleach*) du signal a été réalisé dans le nucléoplasme. Des acquisitions au microscope ont été prises toutes les 5 secondes dès 25 secondes avant le *bleach* et jusqu'à 5 min après le *bleach*.

Ce n'est qu'une minorité (25%) des protéines EGFP-LA-WT mais une majorité (80%) des protéines EGFP-LA-R388P qui est hautement mobile, comme indiqué par le recouvrement de fluorescence 10 secondes après le *bleach* (Figure 43). Cinq minutes après le *bleach*, 70% de la fluorescence n'a toujours pas été récupérée pour la lamine A sauvage. En conclusion, la mobilité intranucléaire est significativement augmentée pour la protéine EGFP-LA-R388P par rapport à la protéine EGFP-LA WT.

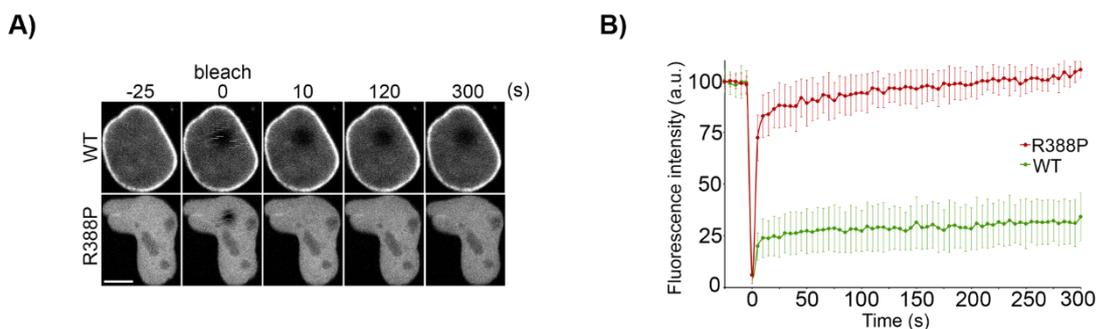


Figure 43 : La protéine EGFP-LA-R388P est plus mobile que la protéine EGFP-LA-WT.
Analyses par FRAP de la dynamique des lamines A étiquetées GFP dans une région nucléoplasmique. 9 noyaux ont été comptés par condition. **A)** Exemple du signal fluorescent de la GFP tel qu'observé au microscope pour deux noyaux exprimant les protéines EGFP-WT ou EGFP-R388P respectivement, à différents temps de l'expérience : 25 sec avant (-25) et 10, 20, 120 et 300 sec après le photoblanchiment (*bleach* au temps 0). **B)** Courbes de récupération de la fluorescence au cours du temps.

D. Les lamines A WT et R388P ont des stabilités similaires

Nous nous sommes demandé si les changements de propriétés des lamines A R388P tels que décrits plus haut s'accompagnaient également d'une modification de leur stabilité. 24 h après

transfection avec le pCMV-FLAG-preLA-WT ou le pCMV-FLAG-preLA-R388P, de la cycloheximide a été ajoutée au milieu de culture afin de bloquer la synthèse protéique. Aux différents temps de l'incubation avec la drogue (0, 15 h, 24 h et 48 h), des extraits protéiques ont été préparés et analysés par western blot afin de révéler la quantité des lamines ectopiques. J'ai trouvé que les deux lamines A, sauvage et mutante, avaient une demie-vie de l'ordre de 15 h. Nous en avons conclu que la mutation R388P n'avait donc pas d'impact sur la stabilité de la lamine A (ectopique) dans les cellules HeLa (Figure 44).

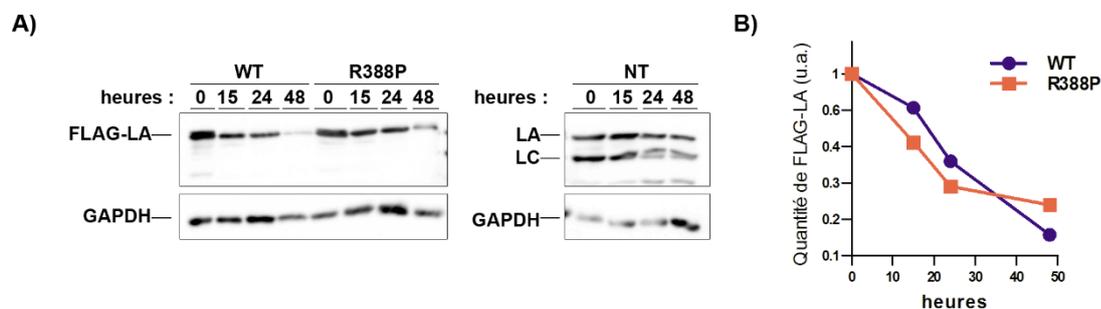


Figure 44 : Stabilité semblable des protéines FLAG-LA R388P et WT dans les cellules HeLa.

Des cellules HeLa non transfectées ou transfectées par le pCMV-FLAG-preLA WT ou R388P ont été traitées par la cycloheximide (CHX) pendant 15, 24 ou 48 h. Des extraits protéiques ont ensuite été réalisés et analysés par western blot (A) avec des anticorps anti-FLAG et anti-LA/C. La quantification des western blots est illustrée en B).

E. Les lamines A R388P présentent quelques propriétés spécifiques

En conclusion, nous avons démontré que 1) les lamines A R388P sont localisées principalement dans le nucléoplasme contrairement aux lamines A WT qui sont localisées principalement à la périphérie du noyau et dans une moindre mesure dans le nucléoplasme, 2) les lamines A R388P ont des propriétés de solubilité et de dynamique plus importantes que les lamines A sauvages, même si la stabilité de ces deux types de protéines semble similaire. Ces données supportent l'hypothèse selon laquelle les lamines A R388P seraient moins efficaces que les lamines A WT pour former des polymères ancrés dans la matrice nucléaire.

IV. Impact des lamines A R388P sur l'expression et la localisation de partenaires

Etant donné les propriétés particulières des lamines A R388P, nous nous sommes demandé si elles pouvaient avoir un impact sur la localisation in situ de partenaires des lamines A WT telles que la lamine B1, l'émerine et LAP2 α .

A. Expression et localisation de la Lamine B1 dans les cellules HeLa exprimant les protéines FLAG-LA R388P

Dans les cellules non transfectées, la lamine B1 est localisée comme attendu à la périphérie du noyau, au sein de la lamina. Cependant, lors de la surexpression de la protéine FLAG-LA WT, on observe une diminution totale du signal pour la lamine B1 dans le noyau mais l'apparition d'un signal

dans le cytoplasme, possiblement au niveau du réticulum endoplasmique. En effet, plus de 8% des noyaux présentent un niveau d'intensité de marquage anti-lamine B1 qui est inférieur à 50% de l'intensité médiane des noyaux contrôles (non transfectés) (Figure 45). Ces différents impacts sur la lamine B1 ne sont pas observés suite à l'expression des protéines FLAG-LA R388P. En exemple, seulement 2% des noyaux ont une intensité du marquage anti-lamine B1 inférieure à 50% de la médiane des intensités des noyaux contrôles. On observe donc là une perte de fonction des protéines FLAG-LA R388P par rapport aux protéines FLAG-LA WT pour ce qui est de moduler l'accumulation/localisation nucléaire de la lamine B1 (Figure 45).

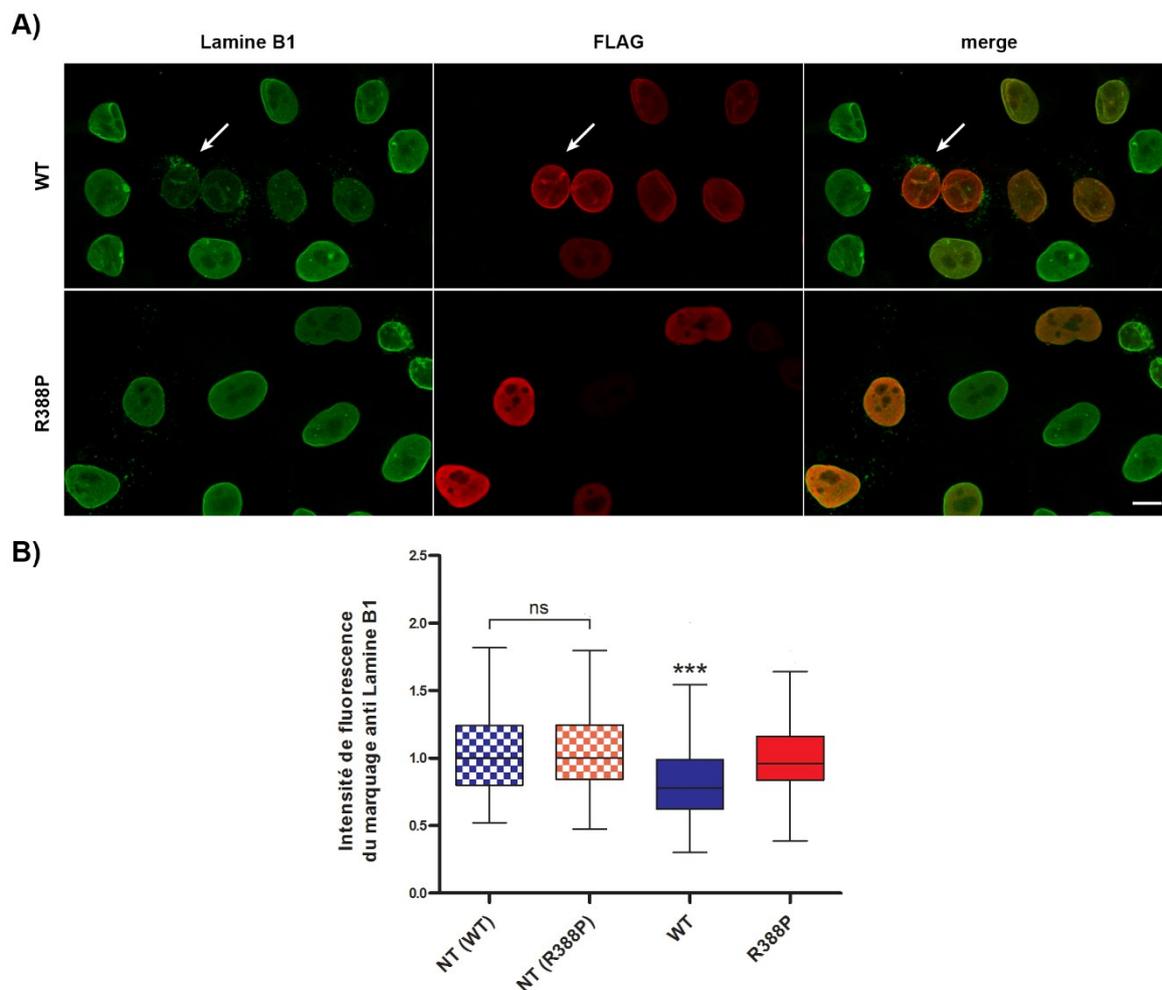


Figure 45 : Les protéines ectopiques FLAG-LA R388P n'ont pas d'impact majeur sur la détection in situ de la lamine B1 endogène, contrairement aux protéines FLAG-LA WT.

Des cellules HeLa ont été transfectées par les pCMV-FLAG-preLA WT ou R388P puis immunomarquées avec des anticorps anti-LB1 et anti-FLAG. **A)** Acquisitions des cellules au microscope confocal (objectif x40). La flèche blanche indique un noyau ayant une diminution du signal pour la lamine B1 nucléaire. Barre d'échelle 10 μ m. **B)** Quantification des intensités de fluorescence sur Image J. Les intensités ont été normalisées par la médiane des intensités des cellules non transfectées (NT) de la lamelle. $n > 100$ noyaux. Test Statistique : Kruskal Wallis couplé avec le test de comparaison multiple de Dunn, la significativité est indiquée pour les cellules transfectées par rapport aux cellules non transfectées de la même lamelle.

B. Localisation de l'émerine dans les cellules HeLa exprimant les protéines FLAG-LA R388P

Dans les cellules non transfectées, l'émerine est localisée comme attendu à l'enveloppe nucléaire. Cependant, lors de surexpression de la protéine FLAG-LA WT, plusieurs localisations de

l'émerine sont observées, soit (1) normale à la périphérie nucléaire, (2) partiellement délocalisée dans le réticulum endoplasmique, soit (3) exclusivement délocalisée dans le réticulum endoplasmique. Dans les noyaux où la protéine FLAG-LA R388P est nucléoplasmique, l'émerine est localisée à l'enveloppe nucléaire et éventuellement légèrement accumulée au niveau du réticulum endoplasmique, phénotype exacerbé dans les noyaux où les protéines FLAG-LA R388P forment des agrégats (Figure 46). Il faudrait cependant confirmer cette localisation dans le réticulum endoplasmique par un contre marquage à la protéine disulfure isomérase par exemple.

En conclusion, l'ancrage de l'émerine à la membrane nucléaire interne est perturbé dans les cellules HeLa lors de la surexpression de lamines A, qu'elles soient sauvages ou mutées (Figure 46).

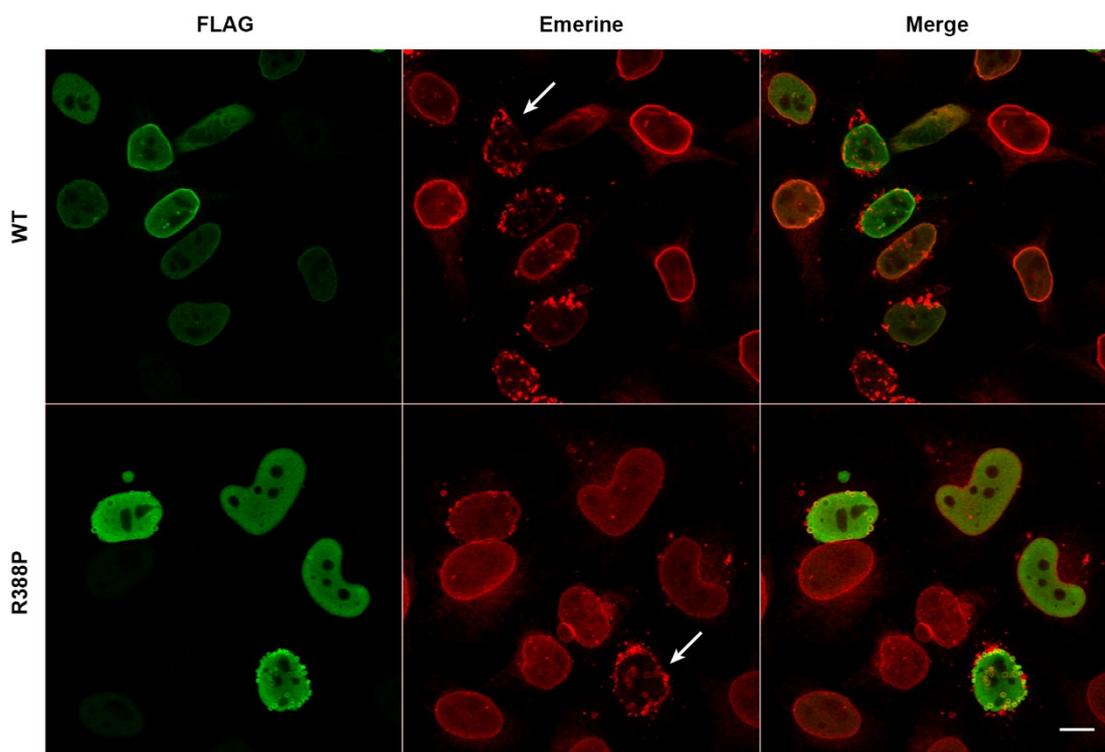


Figure 46 : Délocalisation de l'émerine lors de la surexpression de FLAG-LA WT et R388P

Des cellules HeLa ont été transfectées par les pCMV-FLAG-preLA WT ou R388P puis immunomarquées avec des anticorps anti-émerine et anti-FLAG. Les flèches indiquent les cellules présentant un fort marquage de l'émerine au niveau du réticulum endoplasmique dans le cytoplasme et une déplétion au niveau nucléaire. Acquisitions des images de cellules au microscope confocal (objectif x63). Barre d'échelle 10 μ m.

C. Expression et localisation de LAP2 α dans les cellules HeLa exprimant les protéines FLAG-LA R388P

J'ai ensuite regardé la localisation d'un partenaire nucléoplasmique des lamines A/C, LAP2 α . Alors que la localisation de LAP2 α est similaire (nucléoplasmique homogène) dans les cellules HeLa exprimant les protéines FLAG-LA WT et R388P, c'est son niveau d'expression au sein des cellules qui nous a interloqué. En effet, par immunofluorescence, le signal correspondant à LAP2 α est réduit dans une sous population des cellules HeLa surexprimant les protéines FLAG-LA WT (Figure 47). Après quantification des signaux sur les acquisitions avec le logiciel ImageJ, j'ai déterminé que 12% des cellules exprimant les FLAG-LA WT présentent un signal inférieur à 25% du signal de la médiane des cellules non transfectées. Les cellules exprimant les FLAG-LA R388P quant à elles, n'ont pas d'impact apparent sur l'intensité de fluorescence de LAP2 α . On observe donc là une perte de fonction des

protéines FLAG-LA R388P par rapport aux protéines FLAG-LA WT pour ce qui est de moduler l'accumulation nucléoplasmique de LAP2 α (Figure 47).

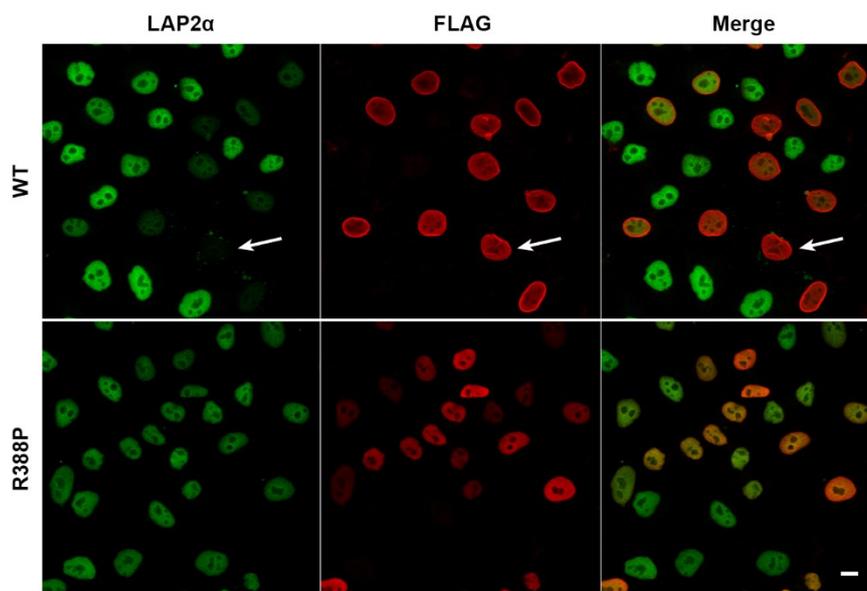


Figure 47 : La surexpression des protéines FLAG-LA R388P n'induit pas une diminution de la détection in situ de LAP2 α
Des cellules HeLa ont été transfectées avec les pCMV-FLAG-preLA WT ou R388P et immunomarquées avec des anticorps anti-LAP2 α et anti-FLAG. La flèche indique un noyau dépourvu de signal fluorescent pour LAP2 α dans une cellule exprimant la protéine FLAG-LA WT. Barre d'échelle 10 μ m.

D. Les lamines A R388P n'ont pas le même impact que les lamines A sauvages sur l'expression et/ou la localisation de partenaires

En conclusion, nous avons montré que la surexpression de lamines A sauvages pouvait altérer l'expression et/ou la localisation de partenaires à l'enveloppe nucléaire et au sein du nucléoplasme mais que la surexpression des lamines A R388P n'avait pas des effets comparables. En particulier, lors de la surexpression de lamine A WT, certains noyaux présentent une diminution de la détection des lamines B1, de LAP2 α et une délocalisation de l'émerine dans le réticulum endoplasmique, alors que lors de la surexpression de lamine A R388P, seule la délocalisation de l'émerine a été observée dans une sous population de cellules où les lamines mutées forment des agrégats.

V. Expression/localisation de SREBP1c et interaction avec les lamines A

Comme indiqué dans l'introduction, SREBP1c est un facteur de transcription lié par les lamines A/C sauvages (Vadrot et al. 2014) impliqué à la fois dans la différenciation adipogénique mais aussi dans la myogenèse. La patiente Her Lo ayant une atteinte du tissu adipeux et des muscles, il nous a semblé pertinent d'étudier l'impact que la protéine FLAG-LA R388P pouvait avoir sur SREBP1.

Pour ce faire, des cellules HeLa ont été co-transfectées avec le pCMV-FLAG-preLA-WT ou le pCMV-FLAG-preLA-R388P et le pcDNA-HA-SREBP1c (promoteur CMV, acide aminé 1-463 de la séquence humaine mature de SREBP1c). Les conditions de co-transfection avaient déjà été optimisées dans le passé dans le laboratoire. Nous ferons un abus de langage en appelant « cellules simple transfectées » des cellules qui ont été transfectées avec le pCMV-FLAG-preLA-WT ou le pCMV-FLAG-preLA-R388P et le pcDNA-vide, ou bien avec le pCMV-vide et le pcDNA-HA-SREBP1c.

A. Diminution du recrutement de SREBP1c à la périphérie nucléaire par les lamines A R388P

Par immunofluorescence, on voit qu'HA-SREBP1c se localise dans le nucléoplasme de manière diffuse (Figure 48). Lors de co-transfections, il s'est avéré que l'expression de HA-SREBP1c n'avait pas d'impact sur la fréquence des phénotypes préalablement décrits pour les lamines ectopiques (normal, nucléoplasmique, agrégats, dysmorphiques) (Figure 48).

A l'inverse, la surexpression des protéines FLAG-LA WT modifie la localisation d'HA-SREBP1c dans $8,2 \pm 1,0\%$ des noyaux ; on distingue alors l'accumulation d'un pool de SREBP1c à la périphérie intranucléaire. La fréquence de ce phénotype est réduite à $0,8 \pm 0,4\%$ dans les cellules HeLa exprimant les protéines FLAG-LA R388P (Figure 48).

Ces données suggèrent que les protéines FLAG-LA WT lieraient et séquestreeraient un pool des protéines SREBP1c à la périphérie intranucléaire alors que les protéines FLAG-LA R388P auraient perdu cette fonction.

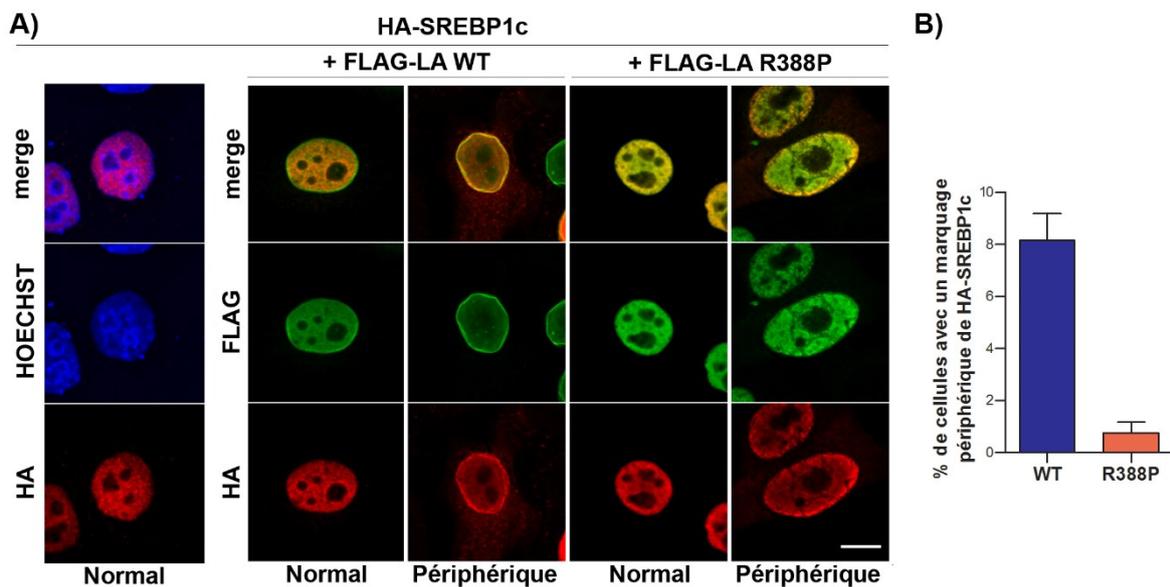


Figure 48 : Localisation du facteur de transcription HA-SREBP1c après une simple ou co-transfection dans des cellules HeLa.

Barre d'échelle 10 μ m. **A)** Des cellules HeLa ont été simple-transfectées avec pcDNA-HA-SREBP1c, puis le facteur de transcription a été révélé par immunofluorescence avec un anticorps anti-HA, l'ADN est marqué par du HOECHST. Dans les cellules non transfectées, 100% des 2761 noyaux comptés présentent un phénotype normal de HA-SREBP1c (nucléoplasmique). Des cellules HeLa ont été co-transfectées avec pcDNA-HA-SREBP1c et pCMV-FLAG-LA-WT ou R388P et les protéines ectopiques révélées par immunofluorescence avec des anticorps anti-FLAG et anti-HA. HA-SREBP1c a soit une localisation normale (nucléoplasmique) soit modifiée (accumulation à la périphérie intranucléaire). **B)** Le pourcentage de noyaux présentant un marquage périphérique de HA-SREBP1c a été obtenu après comptage de > 2000 noyaux pour chaque condition et est illustré dans le graphique. $n = 3$

B. Augmentation de la quantité de protéines HA-SREBP1c suite à l'expression des lamines A WT et R388P

L'impact de la surexpression de lamines ectopiques sur HA-SREBP1c a également été étudiée par western blot. En comparaison aux cellules simple-transfectées, les cellules HeLa co-transfectées ont un niveau d'expression des protéines HA-SREBP1c > six fois plus élevé. (Figure 49 B)), phénomène amplifié (2,8 fois plus) avec l'expression de la lamine A mutante versus la lamine sauvage. (Figure 49 C)).

J'ai ensuite testé si les différences d'expression au niveau protéique résultaient d'une augmentation de la quantité d'ARNm. Étonnamment, le résultat a montré l'inverse, à savoir une diminution (1,3 à 1,5 fois) des ARNm codant HA-SREBP1c dans les cellules coexprimant les protéines FLAG-LA WT et FLAG-LA R388P, respectivement, par rapport aux cellules exprimant uniquement HA-SREBP1c (Figure 49D)). Ces informations indiquent une stabilité accrue de la protéine HA-SREBP1c lors de la surexpression de lamines A qui pourrait résulter de son interaction avec les lamines ectopiques.

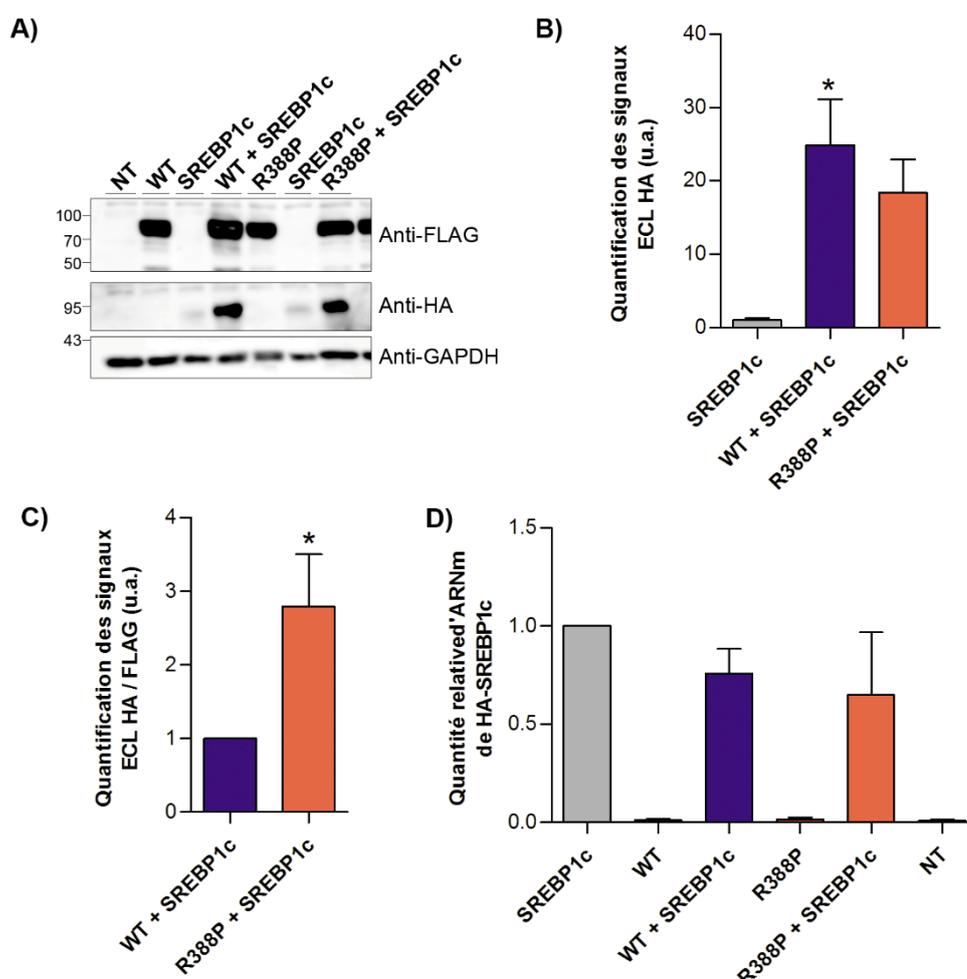


Figure 49 : Expression de HA-SREBP1c au niveau protéique et ARNm dans des cellules HeLa.

Des cellules HeLa ont été non transfectées (NT) ou simple/co-transfectées avec pcDNA-HA-SREBP1c (SREBP1c) ± pCMV-FLAG-LA-WT (WT) ou pCMV-FLAG-LA-R388P (R388P). **A)** Western blot des extraits protéiques totaux révélés avec des anticorps anti-FLAG, anti-HA et anti-GAPDH. *n* = 3. **B)** Quantification des signaux ECL de HA-SREBP1c par western blot. *n* = 3 (test de Kruskal-Wallis avec « pairwise comparisons of groups »). **C)** Quantification de HA-SREBP1c/FLAG-LA par western blot dans des extraits protéiques totaux. Pour chaque expérience, le rapport HA/FLAG pour les cellules co-transfectées avec pCMV-FLAG-LA-WT a été rapporté à 1. *n* = 3 (test de Kruskal-Wallis). **D)** Quantification des ARNm de HA-SREBP1c. *n* = 5.

C. Interaction des protéines HA-SREBP1c et FLAG-LA R388P dans le nucléoplasme

Etant donné le rôle connu des lamines A/C pour interagir et stabiliser certains partenaires (pRb, Suv39h1...), nous nous sommes donc demandé si l'augmentation de la protéine HA-SREBP1c en présence de lamine A ectopique (WT ou R388P) corrélait avec une interaction efficace entre ces deux partenaires. Pour répondre à cette question, nous avons réalisé des expériences de *Proximity Ligation Assay* (PLA) dont le principe est décrit dans l'Annexe (Barateau and Buendia 2016). Cette technique qui utilise en première étape la reconnaissance des protéines d'intérêt par des anticorps spécifiques, permet de localiser in situ et de quantifier les interactions protéine-protéine au sein de cellules. (Figure 50 A)). Grâce au plugin Image J développé pour nous par le Dr Fabien Gerbal (Université Paris Diderot, laboratoire Matière et Systèmes Complexes), nous avons i) mesuré le nombre de pixels par noyau qui présentaient un signal PLA positif et ii) déterminé la distance par rapport à la périphérie nucléaire pour chacun de ces pixels PLA positifs. Notre analyse a montré que le nombre de pixels PLA positifs par noyau est en moyenne de 2436 et de 3234 dans les contextes de lamine A ectopique WT et R388P, respectivement. Cependant, les valeurs médianes sont très similaires (1868 pixels pour le WT et 1865 pixels pour le R388P) (Figure 50 B)). Nous avons conclu que la quantité totale de signaux PLA par noyau correspondant aux interactions [HA-SREBP1c – FLAG-LA] est similaire dans les contextes de lamine A ectopique WT et R388P. De même, la répartition intranucléaire des signaux PLA est similaire dans les deux contextes cellulaires, avec la majorité (98%) des signaux dispersés dans le nucléoplasme et seulement 2% des signaux concentrés à la périphérie intranucléaire (Figure 50 C)).

En conclusion, ces expériences ont permis de montrer premièrement que, dans les cellules HeLa, l'interaction entre les lamines A ectopiques et HA-SREBP1c a lieu majoritairement au niveau nucléoplasmique, et deuxièmement, que la mutation R388P n'empêche pas la lamine A de former des complexes nucléoplasmiques avec SREBP1c. Ces résultats supportent l'hypothèse selon laquelle les lamines A WT et R388P stabilisent SREBP1 en le liant.

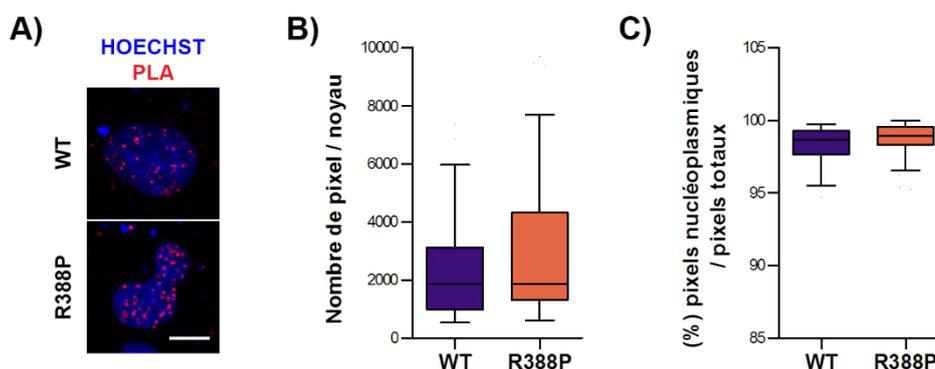


Figure 50 : Interaction des protéines HA-SREBP1c et FLAG-LA R388P dans le nucléoplasme.

Des cellules HeLa co-transfectées ont été analysées par proximity ligation assay (PLA). **A)** Exemple de signaux PLA (rouge) révélant les proximités entre HA-SREBP1c et FLAG-LA WT ou R388P tels qu'observés en microscopie confocale. L'ADN est marqué avec du Hoechst (bleu). Barre d'échelle 10 μ m. **B)** Quantification des pixels totaux correspondant aux signaux PLA par noyau. **C)** Quantification du pourcentage de signaux PLA positifs accumulés dans le nucléoplasme et donc exclus de la périphérie nucléaire.

VI. Impact des protéines FLAG-LA R388P sur la morphologie des noyaux et sur l'état de la chromatine

A. L'expression de FLAG-LA R388P génère des dysmorphies nucléaires

En plus des défauts de localisation de la lamine A R388P que nous avons décrit plus haut, la lamine A mutante induit >7 fois plus de noyaux dysmorphiques que la lamine A sauvage ($59 \pm 1\%$ avec FLAG-LA R388P vs $8 \pm 1\%$ avec FLAG-LA WT) (Figure 51). Ces dysmorphies semblent similaires à celles observées dans un autre modèle cellulaire et dans lequel nous avons étudié plus précisément les mécanismes sous-jacents (voir Chapitre 9IV. « Caractérisation des dysmorphies nucléaires dues aux lamines A R388P »).

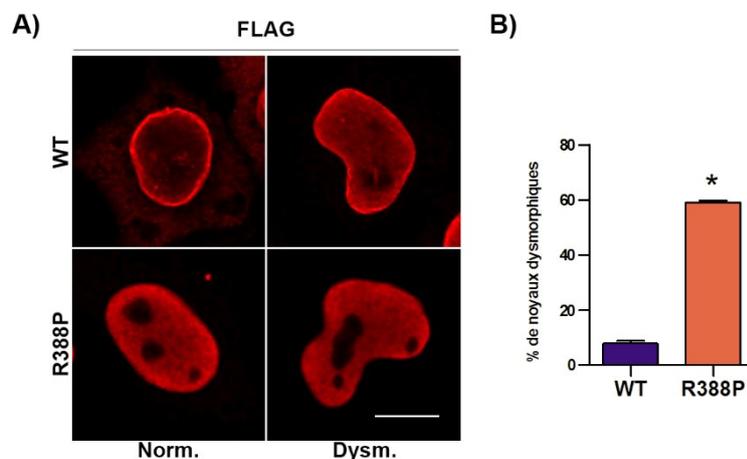


Figure 51 : Dysmorphies nucléaires dans les cellules HeLa exprimant les protéines FLAG-LA R388P.

Des cellules HeLa ont été transfectées par les plasmides pCMV-FLAG-preLA WT ou R388P. **A)** Les cellules ont été fixées et les protéines d'intérêt révélées par immunofluorescence avec l'anticorps anti-FLAG. Des exemples de noyaux dysmorphiques (Dysm.) ou à forme normale (Norm.) sont présentés pour les cellules exprimant les FLAG-LA WT et R388P. Barre d'échelle, 10 μm . **B)** Les pourcentages de noyaux dysmorphiques sont illustrés pour $n = 3$ expériences et > 100 noyaux / expérience (test de Kruskal-Wallis)

B. L'expression de FLAG-LA R388P peut induire des anomalies de répartition des chromosomes en mitose

La rareté des cellules mitotiques dans nos populations de cellules transfectées non synchronisées n'a pas permis de comparer véritablement la fréquence d'anomalies mitotiques éventuelles en présence de FLAG-LA WT par rapport à FLAG-LA R388P. Néanmoins, nous avons observé des cas d'anomalie dans l'alignement des chromosomes en métaphase spécifiquement dans les cellules surexprimant la protéine FLAG-LA R388P (Figure 52).

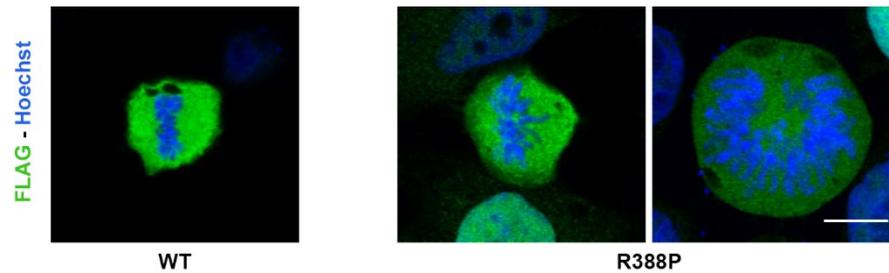


Figure 52 : L'expression de FLAG-LA R388P peut induire des anomalies de répartition des chromosomes en mitose.

Des cellules HeLa transfectées par les plasmides pCMV-FLAG-preLA WT ou R388P ont été fixées et les protéines d'intérêt révélées par immunofluorescence avec l'anticorps anti-FLAG. L'ADN a été marqué par HOECHST (bleu). Exemples d'anomalies de répartition des chromosomes en mitose pour des cellules exprimant la protéine FLAG-LA R388P. Barre d'échelle, 10 μ m.

C. Contrairement à la surexpression de lamine A sauvage, l'expression de FLAG-LA R388P ne module pas la localisation/expression globale de certaines marques épigénétiques et de protéines associées à la chromatine.

Nous avons analysé la localisation/expression in situ de l'histone de liaison H1, protéine qui joue un rôle dans la structuration (compaction) de la chromatine et en conséquence dans l'expression des gènes. L'analyse des cellules non transfectées par immunofluorescence révèle l'histone H1 de manière diffuse dans le nucléoplasme (Figure 53). Le même marquage est obtenu dans l'ensemble des cellules exprimant les FLAG-LA R388P (99,4%) et dans la majorité des cellules exprimant les FLAG-LA WT (85,4%). Cependant, principalement lors de la surexpression de FLAG-LA WT, on observe une sous-population de cellules (14,6%) avec un signal de fluorescence pour l'histone H1 qui est significativement plus faible (phénotype présent uniquement dans 0,6% des cellules exprimant les FLAG-LA R388P); celui-ci étant inférieur à 25% du signal de fluorescence médiane observé dans les cellules non transfectées.

Nous nous sommes alors demandé si cet effet de la surexpression des lamines A sauvages était dose dépendant. Pour transférer les cellules, nous avons donc utilisé un autre plasmide (pSVK3) car il permet la transcription des gènes d'intérêt sous le contrôle du promoteur SV40, promoteur qui a une force plus faible que le promoteur cmv présent dans nos vecteurs pCMVTag. Après immunofluorescence, on observe une corrélation entre l'expression réduite de FLAG-LA WT et la diminution du nombre de cellules à faible marquage pour H1 (0,5% des cellules). En conclusion, la réduction de la détection in situ de l'histone de liaison H1 par la surexpression de lamine A sauvage est dose dépendante.

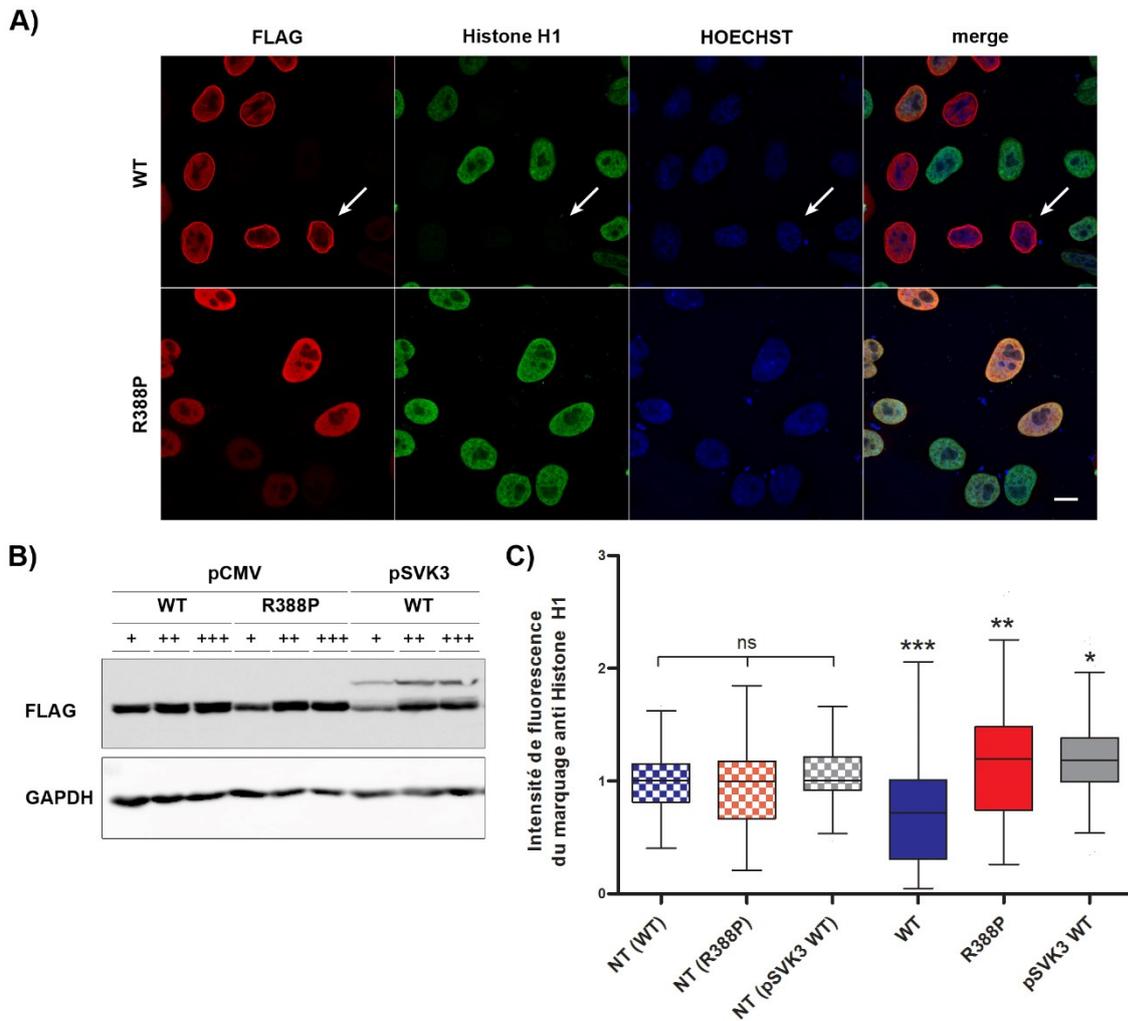


Figure 53 : Détection de l'histone H1 dans des cellules HeLa transfectées.

A) Acquisitions prises au microscope confocal (x40) de cellules transfectées avec pCMV-FLAG-LA-WT ou R388P. Immunofluorescences réalisées avec les anticorps anti-FLAG et anti-Histone H1. Barre d'échelle 10 μ m. **B)** Analyse par western blot de protéines de cellules HeLa transfectées par différentes doses de pCMV-FLAG-LA-WT ou R388P ou pSVK3-FLAG-LA-WT, et révélés par des anticorps anti-FLAG et anti-GAPDH. La dose utilisée habituellement dans mon projet est la dose « +++ ». **C)** Quantification avec le logiciel ImageJ de la fluorescence associée au marquage anti-Histone H1 dans des cellules HeLa transfectées avec pCMV-FLAG-LA-WT ou R388P ou pSVK3-FLAG-LA-WT. $n > 50$ noyaux. Test Statistique : Kruskal Wallis couplé avec le test de comparaison multiple de Dunn, la significativité est indiquée pour les cellules transfectées par rapport aux cellules non transfectées.

Nous avons ensuite réalisé des marquages en immunofluorescence pour détecter de marqueurs associés à l'hétérochromatine (HP1 α , H3K9me3) ou à l'euchromatine (H3K4me3, H3K9ac).

La surexpression de lamine A sauvage induit spécifiquement une diminution dans la détection de H3K4me3, H3K9me3 et HP1 α (concernant 16%, 9% et 6% des cellules respectivement). En comparaison, la diminution de la détection de H3K9ac n'est que très rarement observée (2% des cellules).

Là encore, les noyaux de cellules non transfectées ou de cellules surexprimant les FLAG-LA R388P ne présentent pas de diminution dans la détection de ces différents marqueurs.

En conclusion, contrairement à la lamine A sauvage, la lamine A mutée R388P ne perturbe pas la détection de l'histone de liaison H1, de la protéine associée à l'hétérochromatine HP1 ainsi que des quelques marques épigénétiques étudiées ici.

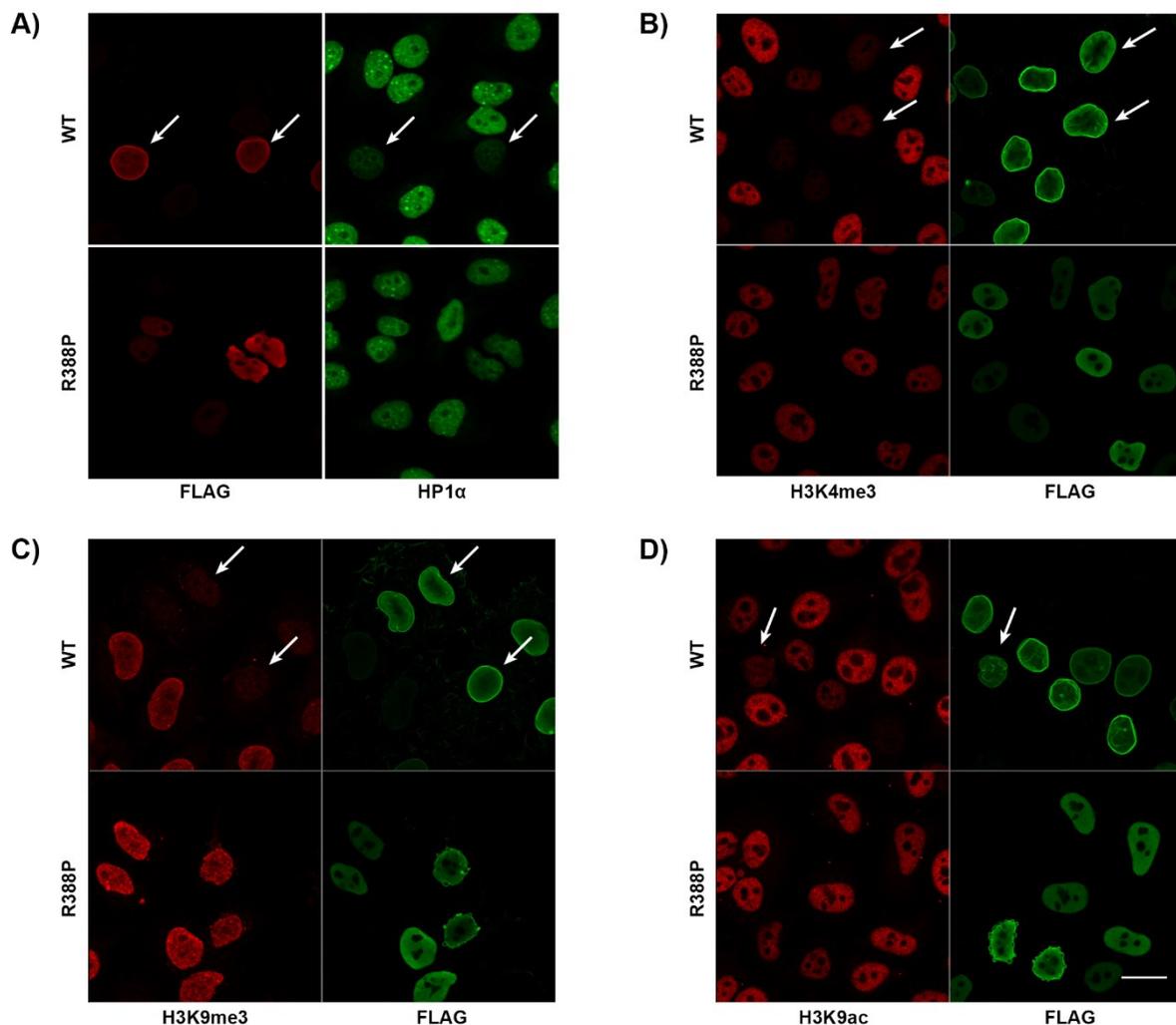


Figure 54 : Détection de différents marqueurs de la chromatine par immunofluorescence.

Des cellules HeLa ont été transfectées avec les pCMV-FLAG-LA WT ou R388P, fixées et les protéines d'intérêt révélées par immunomarquage avec des anticorps anti-FLAG, anti-HP1 α (A)), anti-H3K4me3 (B)), anti-H3K9me3 (C)), et anti-H3K9ac (D)). Les flèches blanches indiquent des exemples de noyaux avec une diminution de la détection d'un marqueur de la chromatine. Barre d'échelle 20 μ m.

VII. Impact de la mutation R388P sur la capacité des lamines A à lier et organiser le génome en 3D

En raison des propriétés particulières de la lamine A mutante R388P, nous avons émis l'hypothèse qu'elle pourrait induire une modification drastique de l'organisation globale du génome et de l'expression de gènes. C'est pourquoi nous avons initié un projet avec le Pr Philippe Collas (Oslo, Norvège), collaborateur de longue date et expert dans la mise au point des techniques ChIP et ChIP-Seq adaptées aux interactions [ADN-lamines] (Lund et al. 2013; Lund et al. 2014; Lund et al. 2015). J'ai préparé les cellules transfectées exprimant les lamines ectopiques. Ensuite les culots de cellules ont été transmis à P. Collas pour que son équipe réalise l'étude de ChIP-Seq. L'identification des régions d'ADN reconnues par ces deux types de lamine A a révélé des différences considérables. Au vu de ces résultats, le P. Collas nous a proposé d'intégrer ces données dans un projet à l'interface entre la biologie et la bioinformatique visant à modéliser le génome en trois dimensions, en tenant compte des contraintes exercées par les interactions [ADN-lamines] (Paulsen et al. article

soumis à Genome Research, voir Annexe 3 : Integrative 3D genome modeling reveals implications of lamin A mutations on genome architecture).

A. Préparation de matériel biologique pour réaliser les analyses de CHIP-Seq.

Nous avons transfecté des cellules HeLa avec les vecteurs pCMV-FLAG afin d'exprimer les lamines A ectopiques WT et mutées, R388P ou L647R. Les lamines A L647R sont farnésylées mais non maturées en raison de la perte du site reconnu par la protéase Zmpste24. Comme préalablement observé dans le laboratoire, les lamines L647R sont encore plus concentrées à la périphérie nucléaire que les lamines A sauvages et elles sont majoritairement insolubles, en suivant le protocole de fractionnement décrit plus haut (Fey et al. 1984) (Figure 55). 24 h après transfection, les culots de cellules ont été récupérés et congelés. Après vérification par western blot de l'expression des lamines d'intérêt, les culots de cellules ont été envoyés à l'équipe du Pr P. Collas ; ils correspondent à trois contextes de lamina différents : 1) lamines A très enrichies à l'enveloppe nucléaire (L647R), 2) lamines A enrichies à l'enveloppe nucléaire mais aussi dans le nucléoplasme (WT) et 3) lamines A enrichies uniquement dans le nucléoplasme (R388P).

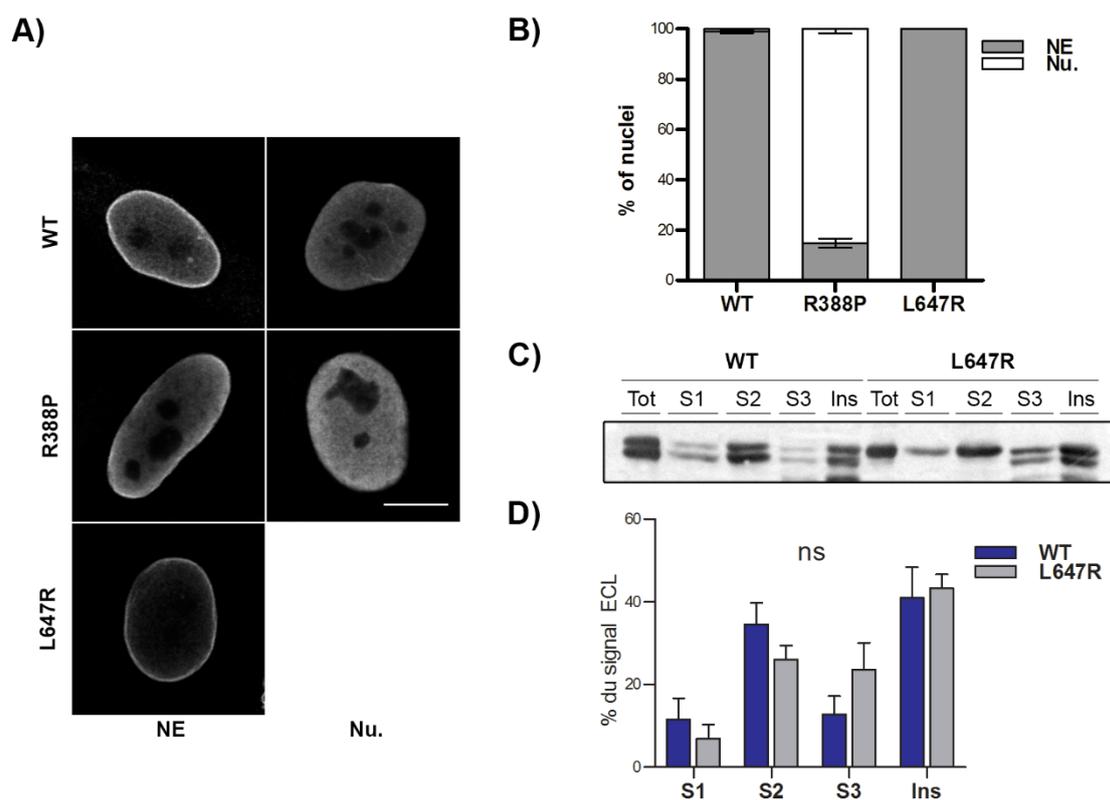


Figure 55 : Localisation et Solubilité de la protéine FLAG-LA L647R.

Des cellules HeLa ont été transfectées pour exprimer les protéines FLAG-LA WT, R388P ou L647R. **A)** Illustration des phénotypes obtenus par immunofluorescence avec un anticorps anti-FLAG. Les lamines A sont localisées normalement à l'enveloppe nucléaire et au sein du nucléoplasme (NE) soit uniquement dans le nucléoplasme (Nu.). Barre d'échelle 10 μ m. **B)** Quantification des phénotypes illustrés en A) n = 3 expériences, >100 noyaux par expérience. **C)** Les protéines ont été extraites séquentiellement pour obtenir les fractions S1, S2, S3 et Ins (selon le protocole de (Fey et al. 1984)). En parallèle des extraits totaux (Tot) ont également été réalisés. Les différents échantillons ont été révélés par western blot avec des anticorps anti-FLAG. Le pourcentage de signal ECL dans chaque fraction par rapport à la somme des signaux ECL est illustré en D). (Test de Kruskal-Wallis pour chaque fraction)

B. Analyse des LADs grâce aux données de CHIP-Seq

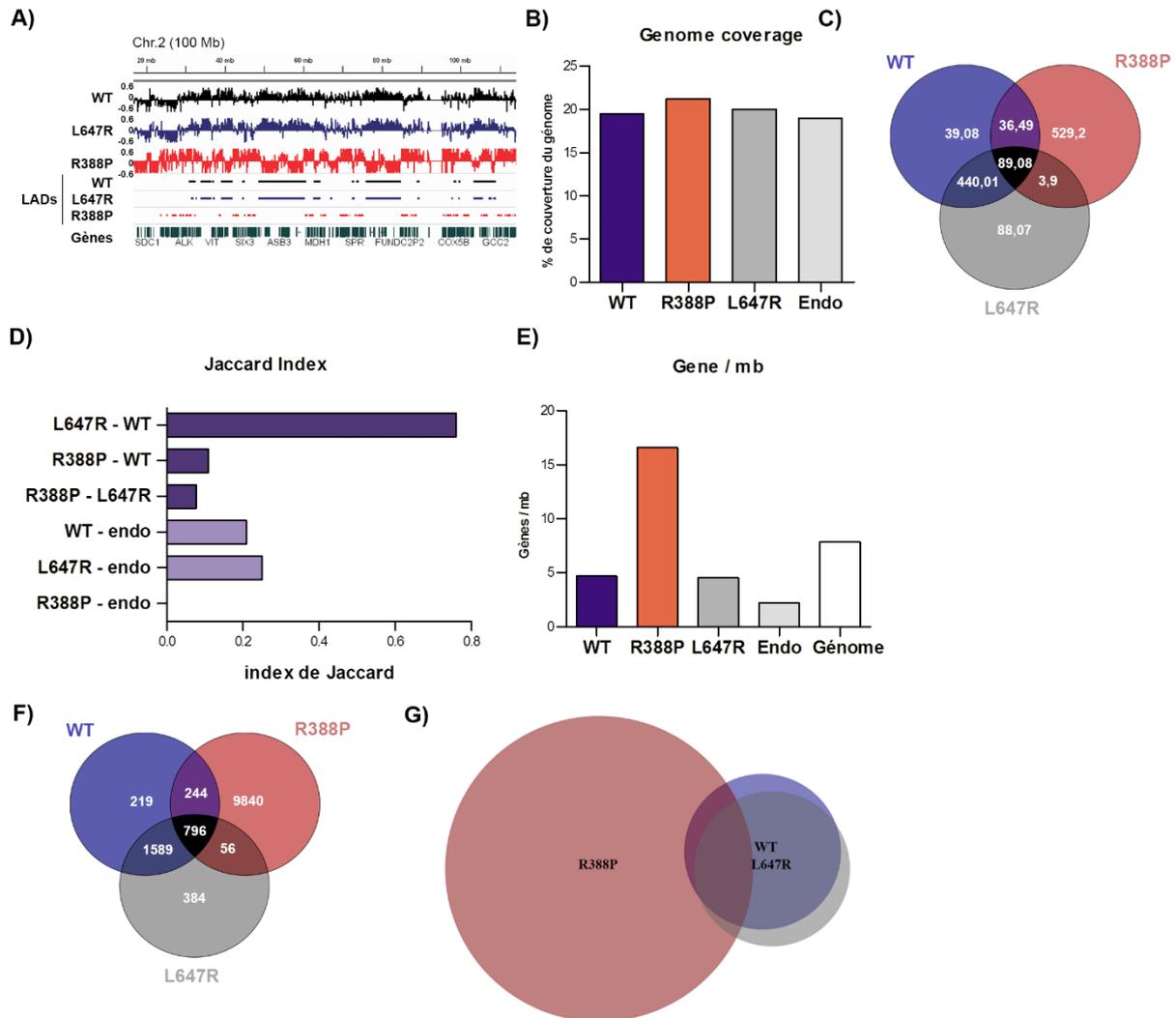


Figure 56 : Les LADs définies par les protéines FLAG-LA R388P sont anormalement riches en gènes.

Des analyses de CHIP-Seq ont été réalisées sur des cellules HeLa exprimant les FLAG-LA WT, R388P et L647R. **A)** Exemple de domaines du chromosome 2 associés ou non aux différentes lamines. **B)** Le graphique illustre les pourcentages du génome liés par les différentes lamines. **C)** Le diagramme de Venn présente le nombre de megabase liés par les différentes protéines FLAG-LA. **D)** Les index de Jaccard (chevauchement) sont illustrés. **E)** Le graphique présente le nombre de gènes par megabase d'ADN lié par chaque FLAG-LA. **F)** Le diagramme de Venn présente le nombre de gènes liés par les différentes FLAG-LA. **G)** Le diagramme de Venn présente les mêmes valeurs qu'en **F)**, mais la taille des cercles et les surfaces de recouvrement sont proportionnelles au nombre de gènes.

L'équipe du Pr P. Collas a identifié les domaines d'enrichissement en lamines A/C (ratios log(ChIP/Input)) en utilisant le *Enrichment Domain Detector* (EDD), un algorithme développé par leur laboratoire pour mettre en évidence les domaines d'enrichissement à partir de données de CHIP-Seq (Lund et al. 2014) (Figure 56 A)). Les résultats ont montré que les protéines FLAG-LA WT et les FLAG-LA L647R lient une quantité de génome semblable (19,5% et 20%), mais que les lamines A R388P s'associent avec 1,7% de génome en plus et en majorité avec des domaines génomiques distincts de ceux liés par les lamines A WT (Figure 56 B) et C)). Une étude de chevauchement des différents domaines ADN associés aux lamines (LADs) a été réalisée en utilisant l'index de Jaccard. Plus l'index de Jaccard est proche de 1, plus les séquences ADN se chevauchent. Cette analyse a révélé le fort chevauchement (index Jaccard = 0,76) entre les LADS générées par les lamines A WT et L647R. Au contraire, les LADs des lamines A R388P sont clairement différents, et ne se recouvrent que peu avec les LADs des lamines A WT ou L647R (index Jaccard = 0,11 et 0,078, respectivement) (Figure 56 D)).

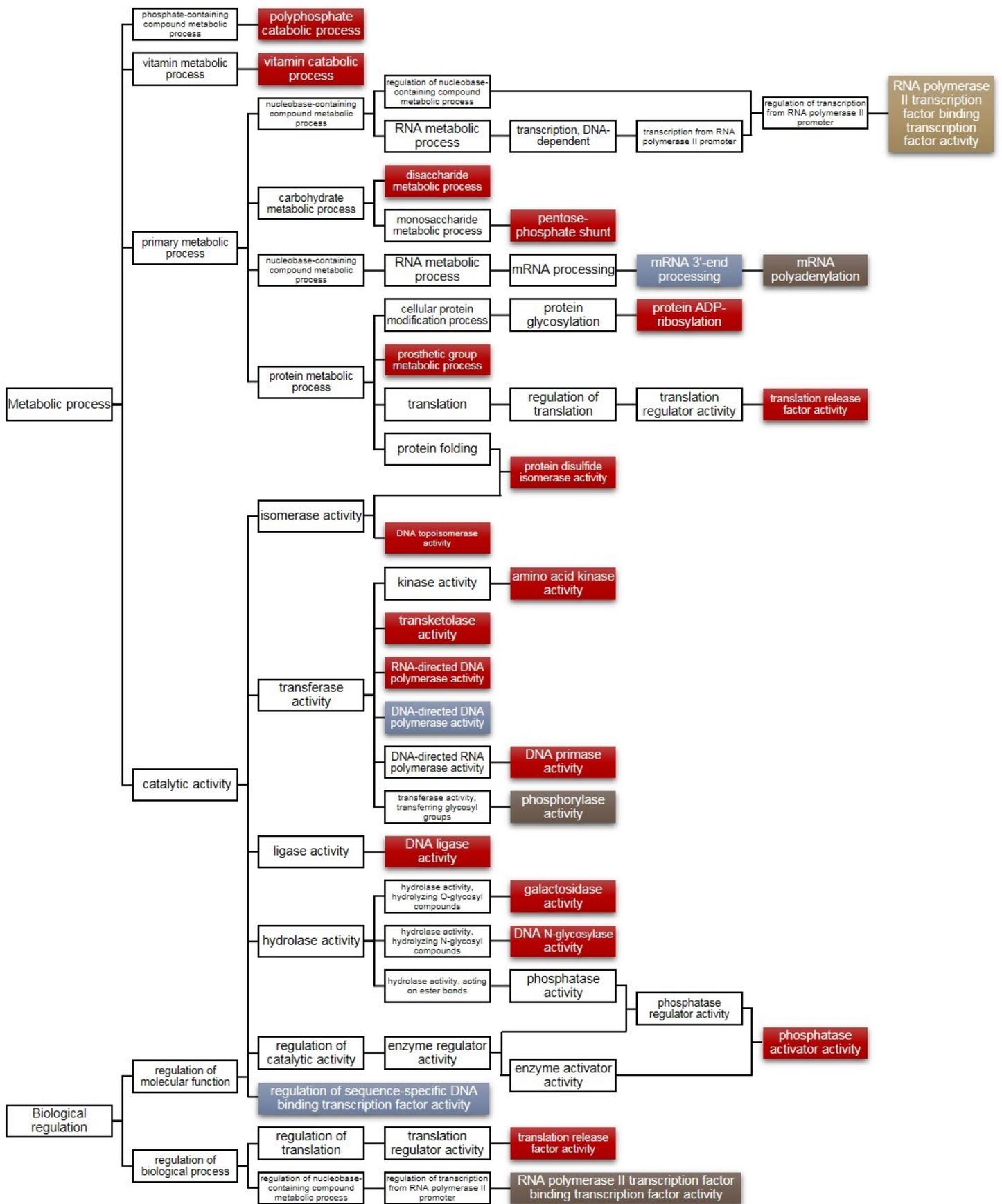
De plus, alors que les LADs des lamines A WT et L647R sont pauvres en gènes (<5 gènes / mb) en accord avec la littérature (Guelen et al. 2008), les LADs des lamines A R388P sont riches en gènes (16,6 gènes par mb) (Figure 56 E, F) et G)).

De manière générale, ces différentes informations suggèrent que la localisation intranucléaire des lamines A (enveloppe nucléaire vs nucléoplasmique) influence leur capacité à interagir avec différentes régions du génome et à organiser le génome en 3D.

Les données issues de l'analyse par ChIP-Seq nous ont également permis d'obtenir la liste des gènes liés aux différentes lamines, et donc de déterminer les fonctions moléculaires ou processus biologiques associés à ces gènes, via l'étude des *Panther Ontology Terms* ou de *Panther pathways* (<http://www.pantherdb.org/>).

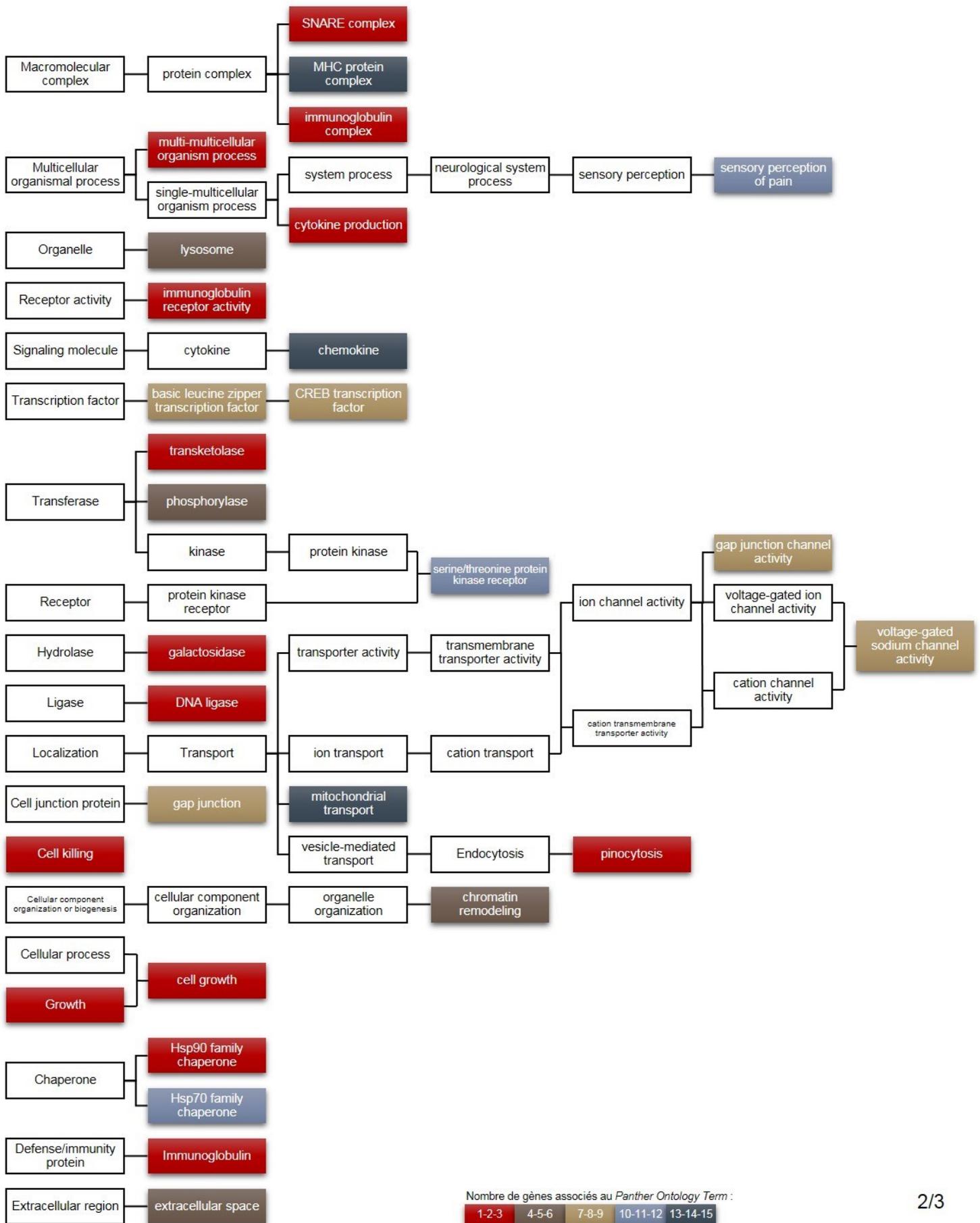
1. Analyse de « Gene ontology » relative aux gènes liés spécifiquement par les lamines A R388P

En comparaison aux LADs définies par les lamines A sauvages, les LADs associées aux FLAG-LA R388P sont plus riches en gènes et concernent plus de catégories de gènes ou « *Panther Ontology Terms* » (657 vs 591). 75 de ces termes ontologiques sont spécifiques aux FLAG-LA R388P. Les catégories sont très variées et incluent des gènes impliqués dans le remodelage de la chromatine, la liaison à la chromatine (facteurs de transcription (CREB), ...), l'activité activatrice de phosphatase, le transport mitochondrial, le processus catabolique des vitamines et la croissance cellulaire. Des graphiques représentant ces différents *Panther Ontology Terms* et leurs liens les uns avec les autres sont présentés dans la Figure 57 (sur 3 pages). J'ai également présenté dans ces graphiques le nombre de gènes appartenant à chaque *Panther Ontology Term* qui est lié spécifiquement par chaque type de lamine A (WT vs R388P). Ainsi nous pouvons noter que ceux comprenant le plus de gènes (≥ 10) concernent par ordre décroissant (1) les chimiokines et leur activité qui sont impliquées dans la régulation de l'activation des cellules du système immunitaire, (2) l'ADN polymérase ADN-dirigée (et son activité), (3) le complexe majeur d'histocompatibilité, (4) le transport mitochondrial, (5) la régulation de l'activité de facteurs de transcription se liant à des séquences spécifiques de l'ADN, (6) la modification des ARNm en 3', (7) les récepteurs sérine/thréonine kinases, (8) la perception sensorielle à la douleur (9) et la famille de chaperonne Hsp70.



Nombre de gènes associés au Panther Ontology Term :

1-2-3 4-5-6 7-8-9 10-11-12 13-14-15



Nombre de gènes associés au Panther Ontology Term :

1-2-3 4-5-6 7-8-9 10-11-12 13-14-15

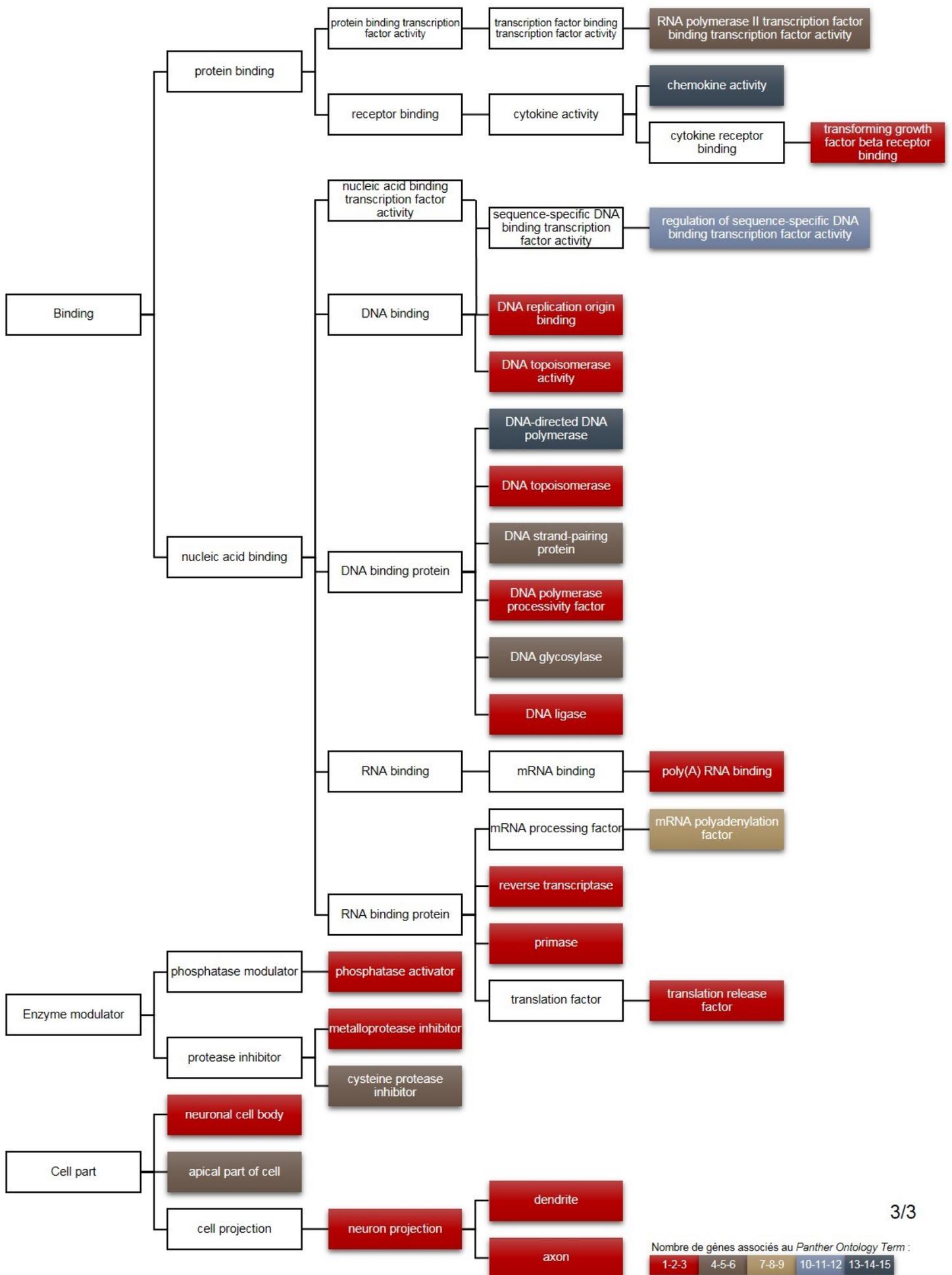


Figure 57 : Analyse des catégories de gènes ou « Panther Ontology Terms » spécifiques des LADs associés aux FLAG-LA R388P.

Tous les gènes associés aux LADs des FLAG-LA R388P ont été entrés dans le logiciel de Panther, pour déterminer les Ontology Terms dans lesquels ils étaient impliqués. Il en a été fait de même pour les FLAG-LA WT. J'ai ensuite déterminé les Panther Ontology Terms spécifiques des LADs associés aux FLAG-LA R388P et ai représenté leur organisation ainsi que le nombre de gènes contenus dans chaque catégorie en utilisant un code couleur : rouge pour 1 à 3 gènes, marron pour 4 à 6 gènes, beige pour 7 à 9 gènes, bleu clair pour 10 à 12 gènes et bleu foncé pour 13 à 15 gènes.

2. Analyse de « Gene ontology » relative aux gènes liés spécifiquement par les lamines A WT

Il est intéressant de savoir quels sont les Panther Ontology Terms et les Panther pathways spécifiques des LADs associés aux FLAG-LA R388P, puisqu'ils nous informent d'un potentiel gain de fonction de ces dernières par rapport aux WT. Mais il est tout aussi intéressant de déterminer les Panther Ontology Terms et les Panther pathways spécifiques des LADs associés aux FLAG-LA WT puisqu'ils nous informent à l'inverse, d'une potentielle perte de fonction des FLAG-LA R388P par rapport aux WT. J'ai donc réalisé la même étude que précédemment mais cette fois ci avec les LADs associés spécifiquement aux FLAG-LA WT.

Les Panther Ontology Terms spécifiques aux LADs associés aux FLAG-LA WT sont beaucoup moins nombreux que pour les FLAG-LA R388P, en effet on en dénombre que 7 qui sont impliqués dans (1) le processus métabolique secondaire, (2) le processus de cycle d'ovulation (3) la superfamille des interférons, (4) l'amylase et son activité, (5) l'aldolase et (6) l'activité de l'aldéhyde-lyase. Ces catégories ne contiennent à chaque fois qu'un seul gène sauf pour l'amylase et son activité qui en contiennent quatre (Figure 58).

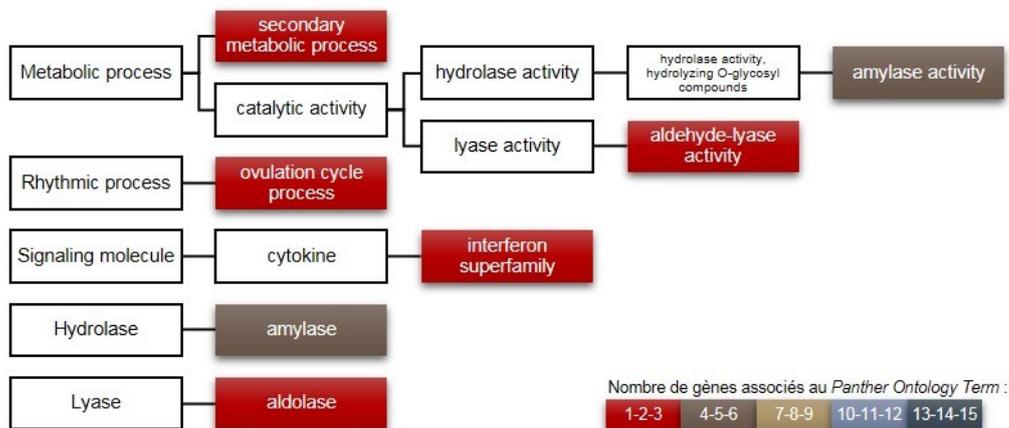


Figure 58 : Analyse des Panther Ontology Terms spécifiques des LADs associés aux FLAG-LA WT.

Tous les gènes associés aux LADs des FLAG-LA WT ont été entrés dans le logiciel de Panther, pour déterminer les Ontology Terms dans lesquels ils étaient impliqués. Il en a été fait de même pour les FLAG-LA R388P. J'ai ensuite déterminé les Panther Ontology Terms spécifiques des LADs associés aux FLAG-LA WT et ai représenté leur organisation ainsi que le nombre de gènes contenus dans chaque catégorie en utilisant un code couleur : rouge pour 1 à 3 gènes, marron pour 4 à 6 gènes, beige pour 7 à 9 gènes, bleu clair pour 10 à 12 gènes et bleu foncé pour 13 à 15 gènes.

Bien que cette analyse ait révélé des différences quant à la nature des gènes liés par les lamines A mutantes vs WT, elle ne donne pas d'information sur le niveau d'expression des gènes liés par les lamines. C'est pourquoi, nous avons initialement prévu de réaliser l'analyse globale de la transcription par RNA-Seq pour nos différentes populations de cellules ; mais en raison de contraintes financières, cette partie du projet n'a pas pu se faire. En conséquence, les répercussions

éventuelles du changement d'organisation de la chromatine sur l'expression des gènes dans le contexte laminopathie L-CMD due à la mutation *LMNA* p.R388P restent à déterminer.

Chapitre 9

**Impact de la lamine A mutée
R388P dans un modèle cellulaire
de myoblastes murins (C2C12)**

Chapitre 9 Impact de la lamine A mutée R388P dans un modèle cellulaire de myoblastes murins (C2C12)

Compte tenu de la pathologie de la patiente HER Lo, on peut considérer les cellules C2C12 qui sont des myoblastes comme un modèle cellulaire plus pertinent que les cellules épithéliales HeLa. Nous avons donc envisagé d'étudier les propriétés et impacts des lamines A R388P dans des myoblastes C2C12 en prolifération et au cours de la différenciation myogénique.

Pour les études de myoblastes en prolifération, nous avons utilisé un modèle de transfection transitoire avec les mêmes plasmides que ceux utilisés précédemment avec les cellules HeLa, c'est-à-dire les plasmides pCMV-FLAG-preLA WT et R388P. Les analyses ont été réalisées 24 h après transfection, sauf si précisé ultérieurement. Après optimisation des conditions de transfection, nous avons analysé l'expression des protéines ectopiques par western blot (Figure 59). Nous nous sommes alors rendus compte que, comme pour les cellules HeLa, l'anticorps anti-FLAG révélait deux bandes pour les lamines A WT et R388P, à des poids moléculaires correspondant à la FLAG-pré-lamine A (préLA) et à la FLAG-LA mature (LAm). L'accumulation de pré-lamine A a été confirmée en révélant les western blots avec l'anticorps anti-préLA. Ainsi, dans nos conditions de transfusions pour les myoblastes C2C12, un pool de pré-lamine A ne subit pas le processus de maturation et s'accumule. Nous nommerons ici lamines A (LA), le mélange des protéines ectopiques FLAG-preLA et FLAG-LAm.

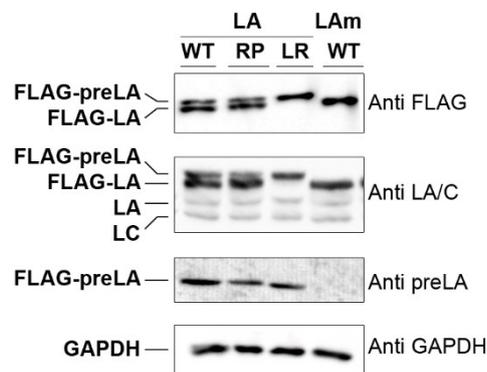


Figure 59: Expression de FLAG-preLA et de FLAG-LAm dans les myoblastes C2C12 transfectés.

Western blots de protéines extraites de myoblastes C2C12 transfectées avec le pCMV-FLAG-preLA WT, R388P ou L647R ou avec le pCMV-FLAG-LAm-WT révélés avec des anticorps anti-FLAG, anti-LA/C, anti-preLA et anti-GAPDH.

I. La mutation R388P empêche l'intégration de la lamine A au sein du réseau de lamina dans les myoblastes.

Nous avons étudié la localisation et la solubilité de la lamine A mutante dans les myoblastes.

A. Localisation nucléoplasmique des lamines A R388P

Les lamines A/C endogènes dans les myoblastes C2C12 sont localisées tout comme dans les fibroblastes et les cellules HeLa, c'est-à-dire à la périphérie nucléaire et au sein du nucléoplasme. 24 h après transfection avec les plasmides pCMV-FLAG-preLA-WT ou le pCMV-FLAG-preLA-R388P, les myoblastes C2C12 ont été soumis à une immunofluorescence avec des anticorps anti-FLAG afin de détecter les lamines ectopiques sauvages ou mutantes. $85 \pm 3\%$ des myoblastes C2C12 exprimant les FLAG-LA WT présentent un marquage normal à l'enveloppe et dans le nucléoplasme. Cependant, dans une minorité de cellules ($13 \pm 3\%$), les protéines FLAG-LA WT sont uniquement nucléoplasmiques. A l'inverse, c'est dans la majorité des myoblastes transfectés ($82 \pm 3\%$) que les lamines mutées (FLAG-LA R388P) s'accumulent uniquement dans le nucléoplasme. Par ailleurs, dans $8 \pm 1\%$ des cellules, les lamines A mutées forment des agrégats et c'est dans seulement $11 \pm 2\%$ des cellules qu'elles sont localisées normalement à la périphérie du noyau (Figure 60). Notons que les noyaux exprimant les FLAG-LA R388P présentent fréquemment des dysmorphies, mais cet aspect sera abordé plus en détail dans le paragraphe IV. « Caractérisation des dysmorphies nucléaires dues aux lamines A R388P ».

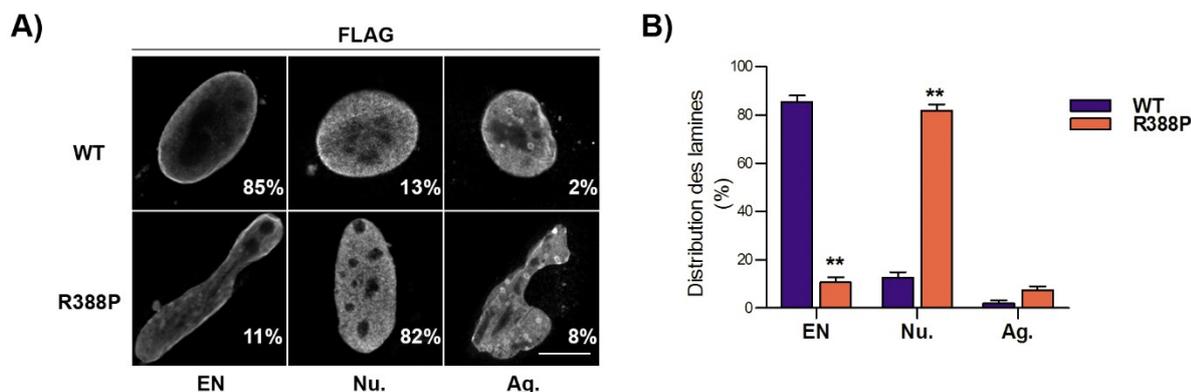


Figure 60 : Localisation nucléoplasmique des lamines A R388P dans les myoblastes C2C12.

Des cellules C2C12 ont été transfectées avec les plasmides pCMV-FLAG-preLA WT ou R388P. Les cellules ont ensuite été fixées et analysées par immunofluorescence avec un anticorps anti-FLAG. **A)** Exemples de noyaux présentant les trois phénotypes de localisation des lamines : à l'enveloppe nucléaire (EN), au sein du nucléoplasme uniquement (Nu.) ou sous forme agrégative (Ag). **B)** Quantification des phénotypes des cellules. $n = 5$, test de Mann Whitney pour chaque fraction.

B. Augmentation de la solubilité des lamines A R388P

La solubilité des FLAG-LA WT ou R388P a également été étudiée selon le protocole précédemment décrit (Fey et al. 1984) dans les myoblastes C2C12 transfectés respectivement avec les pCMV-FLAG-preLA-WT ou R388P afin de déterminer si dans ce contexte cellulaire aussi les lamines A R388P étaient plus solubles.

Alors que les protéines FLAG-LA WT sont majoritairement insolubles ($48 \pm 14\%$), la fraction insoluble des FLAG-LA R388P ne représente que $3 \pm 1\%$ des protéines. La fraction majoritaire pour les FLAG-LA R388P est la fraction S1, soluble, qui représente $68 \pm 5\%$ des protéines, alors que les FLAG-LA WT n'ont que $12 \pm 4\%$ de leurs protéines présentes dans cette fraction. Avec des pourcentages plus proches on observe également une différence dans les fractions liées à la chromatine (S3), qui représente $10 \pm 4\%$ des protéines FLAG-LA WT et $3 \pm 1\%$ des protéines FLAG-LA R388P. Seule la

fraction du cytosquelette (S2) ne présente pas de différence significative entre la FLAG-LA WT et R388P (Figure 61).

Dans les myoblastes C2C12, les protéines FLAG-LA R388P sont donc plus solubles que les protéines FLAG-LA WT.

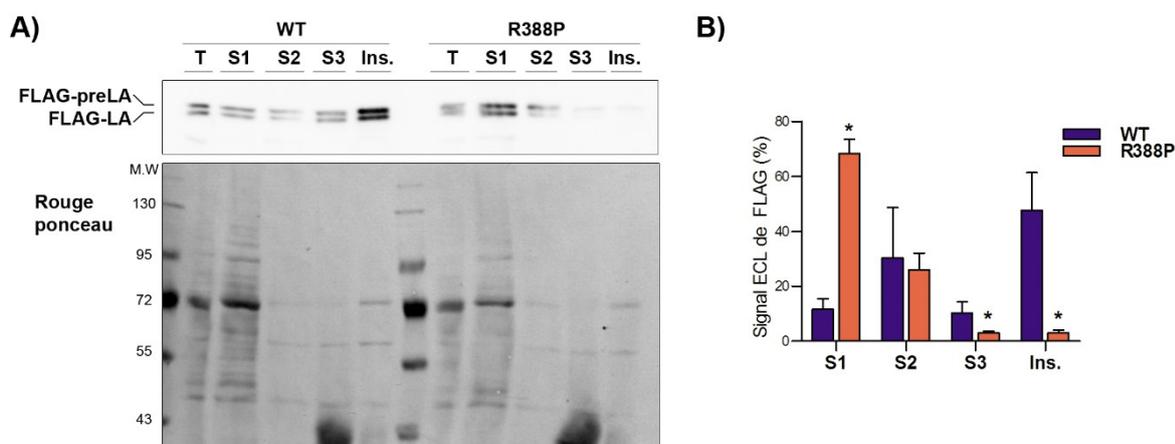


Figure 61 : Etude de la solubilité de la lamine A R388P par extraction biochimique de la matrice nucléaire.

Des myoblastes C2C12 ont été transfectés pour exprimer les FLAG-LA WT et R388P. Les protéines ont été extraites séquentiellement (Fey et al. 1984) afin de récupérer les fractions (S1) solubles, (S2), du cytosquelette, (S3) associées à l'ADN et (Ins) insolubles. **A)** Les différentes fractions ont été analysées par western blot et révélées avec des anticorps anti-FLAG. La détection des protéines par coloration au rouge ponceau des membranes est également montré. **B)** La répartition des lamines A ectopiques au sein des différentes fractions a été quantifiée à partir de western blots. $n = 3$, test de Kruskal-Wallis pour chaque fraction.

C. La phosphorylation des sérines 22-390-392 des lamines A R388P n'est responsable ni de leur localisation nucléoplasmique ni de la génération des dysmorphies nucléaires

L'assemblage et désassemblage des polymères de lamines A/C et leur localisation est dépendant de leurs modifications post-traductionnelles (voir Chapitre 1 Les lamines). Il a été montré qu'en empêchant la phosphorylation des sérines S22 et/ou S390 et S392 en les mutant en alanine, les lamines A étaient moins localisées dans le nucléoplasme et plus au niveau de l'enveloppe nucléaire (Kochin et al. 2014). Nous nous sommes alors demandé si la localisation nucléoplasmique des lamines A R388P était due à une hyperphosphorylation des résidus S390 et S392 qui sont très proches de l'acide aminé muté. Pour répondre à cette question, nous avons généré des plasmides codant la lamine A R388P avec les sérines d'intérêt mutées (Figure 39). 24 h après transfection des plasmides, nous avons observé que même lorsque les trois résidus S22, S390 et S392 sont mutés (Figure 62 A)), les protéines FLAG-LA R388P restent nucléoplasmiques (Figure 62 B)). Ainsi, ces résultats indiquent que, indépendamment de la phosphorylation des sérines 22, 390 et 392, la mutation R388P a un effet dominant qui empêche la localisation à l'enveloppe nucléaire des lamines A.

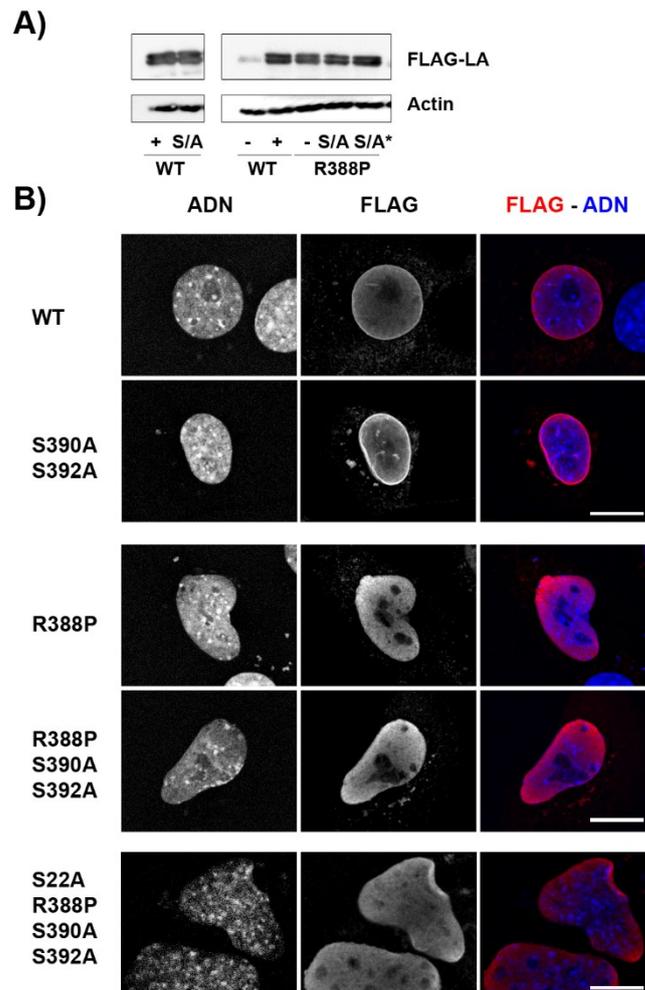


Figure 62 : La phosphorylation des sérines 22-390-392 des lamines A R388P n'est pas responsable de leur localisation nucléoplasmique.

Des myoblastes C2C12 ont été transfectés pour exprimer les protéines FLAG-LA WT, -S390A-S392A (S/A), -R388P, -R388P-S390A-S392A (S/A) et -S22A-R388P-S390A-S392A (S/A*). **A)** Des extraits cellulaires totaux ont été analysés par western blot avec dans anticorps anti-FLAG et anti-Actine. **B)** Immunofluorescence des cellules avec des anticorps anti-FLAG. L'ADN a été marqué au Hoechst. Barre d'échelle 20 μ m.

II. Impact de la lamine A mutée R388P sur des partenaires des lamines A/C

Les lamines A R388P ayant des propriétés de localisation et de solubilisation différentes des lamines WT, nous nous sommes demandé si elles gardaient leur capacité à interagir avec quelques partenaires (lamines A/C, lamine B1, LAP2 α) et si elles perturbaient la localisation subnucléaire ainsi que les propriétés de solubilité de ces partenaires.

A. Les lamines A/C endogènes restent majoritairement ancrées à l'enveloppe nucléaire lorsque les lamines A R388P sont surexprimées

Etant donné que les FLAG-LA R388P sont surexprimées dans des myoblastes C2C12, les lamines A/C WT et les lamines A R388P sont toutes deux exprimées dans les cellules. Nous avons

donc voulu déterminer si les lamines A R388P avaient un impact sur la localisation et la solubilité des lamines A/C endogènes. Pour cela, nous avons réalisé des co-immunofluorescences avec des anticorps anti-FLAG et anti-Lamine A/C sur des myoblastes transfectés pour exprimer les protéines FLAG-LA WT ou R388P (Figure 63 A)). Notons que l'anticorps anti-Lamine A/C reconnaît les lamines A et C endogènes ainsi que les lamines A R388P ectopiques. Dans les cellules exprimant les protéines FLAG-LA WT, les lamines A/C sont localisées principalement à la périphérie des noyaux et dans une moindre mesure dans le nucléoplasme, les protéines ectopiques et endogènes colocalisent (Figure 63 A)). Dans la majorité des cellules exprimant les protéines FLAG-LA R388P, on observe un marquage lamines A/C plus enrichi à l'enveloppe qu'avec le marquage FLAG, indiquant une localisation normale des lamines A/C endogènes. Cependant, la perte d'ancrage des lamines A/C endogènes à l'enveloppe nucléaire pourrait avoir lieu dans une minorité des cellules exprimant les lamines mutées, comme suggéré par l'éventuelle absence de marquage lamine A/C à l'enveloppe nucléaire (Figure 63 A)).

Afin d'étudier la solubilité des lamines A/C endogènes, nous avons utilisé les extraits protéiques obtenus selon le protocole précédemment décrit (Fey et al. 1984) dans le chapitre 4 I. B. « Augmentation de la solubilité des lamines A R388P ». Les protéines ont été analysées par western blot et révélées avec un anticorps anti-lamine A/C pour détecter les lamines A et les lamines C endogènes ainsi que les lamines ectopiques (FLAG-LA WT ou R388P) (Figure 63 B)). Les lamines A endogènes dans les cellules exprimant les protéines FLAG-LA WT sont majoritairement insolubles avec $45 \pm 18\%$ du signal ECL dans cette fraction. La deuxième fraction la plus abondante est celle du cytosquelette avec $32 \pm 21\%$ du signal ECL. Dans les cellules exprimant les protéines FLAG-LA R388P, la fraction majoritaire pour les lamines A endogènes est celle du cytosquelette avec $42 \pm 15\%$ du signal ECL suivie de la fraction soluble avec $29 \pm 12\%$ du signal ECL alors que la fraction insoluble ne représente que $18 \pm 8\%$ du signal ECL. Pour les lamines C, les résultats sont semblables avec une majorité des protéines dans les fractions insolubles ($41 \pm 21\%$) et celle du cytosquelette ($34 \pm 16\%$) pour les cellules exprimant les protéines FLAG-LA WT et une majorité des protéines dans les fractions du cytosquelette ($39 \pm 11\%$) et solubles ($30 \pm 12\%$) pour les cellules exprimant les protéines FLAG-LA R388P. En conclusion, on observe une tendance vers une plus grande solubilité des lamines A/C endogènes dans les cellules surexprimant les protéines FLAG-LA R388P vs WT, même si cela n'a pas été validé statistiquement au vu du nombre limité d'expériences réalisées ($n = 3$).

Au final, les résultats suggèrent que les lamines A R388P n'empêcheraient pas l'assemblage des lamines A/C endogènes WT en polymères mais qu'elles pourraient fragiliser leur ancrage à l'enveloppe nucléaire.

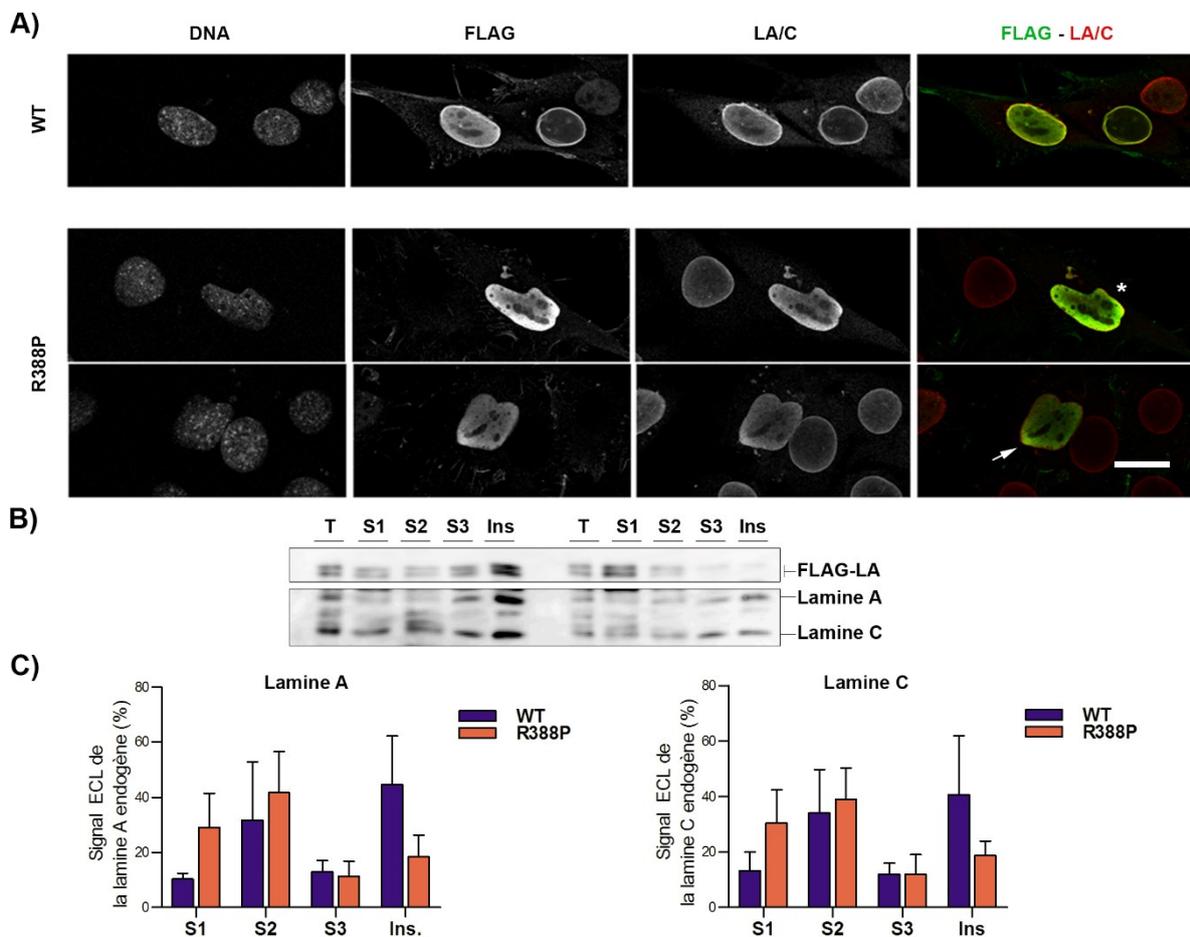


Figure 63 : Impact des lamines A R388P sur les lamines A/C endogènes dans les myoblastes.

Des myoblastes C2C12 ont été transfectés pour exprimer les protéines FLAG-LA WT et R388P. **A)** Immunofluorescence des cellules avec des anticorps anti-LA/C. L'astérix indique un noyau pour lequel on ne distingue pas de marquage des lamines A/C à la périphérie des noyaux au-delà du marquage FLAG. La flèche indique un noyau pour lequel on distingue un liseré de lamines A/C au-delà du marquage FLAG à la périphérie du noyau. Barre d'échelle 20 μm . **B)** et **C)** Les protéines ont été extraites séquentiellement (Fey et al. 1984) afin de récupérer les fractions (S1) solubles, (S2), du cytosquelette, (S3) associées à l'ADN et (Ins) insolubles. Les différentes fractions ont été analysées par western blot et révélées avec des anticorps anti-LA/C. **C)** La répartition du signal ECL obtenu en **B)** pour la lamine A et la lamine C dans les différentes fractions est exprimée en pourcentage par rapport à la somme des signaux. $n = 3$ expériences indépendantes. Test statistique de Kruskal-Wallis réalisé pour comparer 2 à 2 les données WT vs R388P dans chaque fraction.

B. La lamine A R388P peut désorganiser le réseau de lamine B1

En plus de l'impact des lamines A R388P sur les lamines de type A endogènes, nous nous sommes également demandé si elles pouvaient avoir un impact au niveau des lamines de type B. Aussi, nous avons étudié par immunofluorescence la localisation de la lamine B1 dans des myoblastes surexprimant les FLAG-LA WT et R388P. Dans les cellules exprimant les FLAG-LA WT, la lamine B1 présente un marquage accentué au niveau de l'enveloppe nucléaire et colocalise avec les lamines A ectopiques. Dans les cellules exprimant les FLAG-LA R388P, la lamine B1 peut être localisée soit normalement comme dans les cellules exprimant les lamines A ectopiques, soit être déplétée localement. Les lamines A R88P induisent donc une désorganisation locale de réseau de lamine B1 dans certaines cellules.

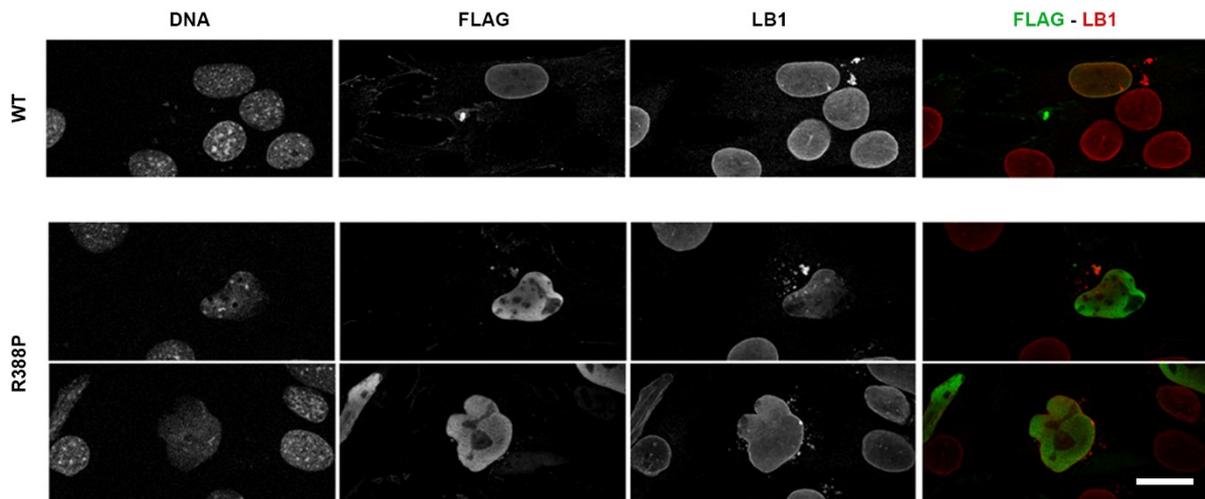


Figure 64 : Localisation discontinue de la lamine B1 dans les myoblastes C2C12 exprimant les FLAG-LA R388P.
Des myoblastes C2C12 ont été transfectés avec les plasmides pCMV-FLAG-preLA WT ou R388P. Les cellules ont été fixées et les protéines d'intérêt révélées avec des anticorps anti-FLAG et anti-LB1. L'ADN a été marqué au HOECHST. Barre d'échelle, 20 μ m.

C. Le mutant R388P de la lamine A modifie l'ancrage nucléaire de deux partenaires, l'émerine et LAP2 α .

Nous nous sommes plus particulièrement intéressées à deux partenaires qui se lient aux lamines dans la région C-terminale qui contient l'acide aminé R388. Ces protéines sont l'émerine, qui est localisée à l'enveloppe nucléaire et LAP2 α , qui est nucléoplasmique.

1. Localisation de l'émerine et de LAP2 α et interactions avec les lamines R388P

Afin d'étudier les interactions entre les lamines A R388P et ses partenaires, nous avons réalisé des expériences de PLA (voir Annexe et (Barateau and Buendia 2016)). Pour cela nous avons transfecté les myoblastes C2C12 avec le vecteur pEGFP-LA-WT ou R388P pour l'étude de LAP2 α et avec le vecteur pCMV-FLAG-LA-WT ou R388P pour l'étude de l'émerine. 24 h après transfection, les cellules ont été fixées et utilisées pour immunofluorescence ou pour le PLA afin de détecter les interactions [GFP-LA – LAP2 α] ou [FLAG-LA – Emerine]. En un premier temps, nous avons déterminé si l'expression des lamines A R388P avaient un impact sur l'expression (niveau protéique) de ses partenaires, afin d'en tenir compte pour interpréter les résultats de PLA. Les extraits protéiques analysés par westerns blots n'ont pas révélé de modification de l'expression de l'émerine et de LAP2 α lors de la surexpression de lamines A ectopiques WT ou R888P (Figure 65).

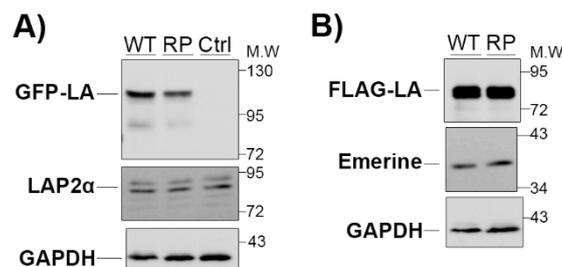


Figure 65 : Expression de LAP2 α et de l'émerine dans les myoblastes C2C12.

A) Analyses de protéines extraites de myoblastes C2C12 transfectées avec le pEGFP-preLA WT ou R388P par western blots et révélation avec des anticorps anti-GFP, anti-LAP2 α et anti-GAPDH. **B)** Analyse de protéines extraites de myoblastes C2C12 transfectées avec le pCMV-FLAG-preLA WT ou R388P par western blots et révélation avec des anticorps anti-FLAG, anti-émerine et anti-GAPDH.

Les immunofluorescences montrent que LAP2 α est localisé de la même manière dans les cellules exprimant les protéines GFP-LA WT et GFP-LA-R388P, c'est-à-dire dans le nucléoplasme. Etant donné que les protéines GFP-LA R388P ne sont pas localisées à la périphérie nucléaire, elles colocalisent avec LAP2 α (Figure 66 A)). Cependant, LAP2 α ne s'accumule pas au niveau des agrégats de GFP-LA-R388P qui sont observés dans une sous-population des cellules transfectées (Figure 66 A) image du bas). Les expériences de PLA ont mis en évidence des interactions entre les GFP-LA WT ou R388P avec LAP2 α au sein du nucléoplasme (Figure 66 B)). Nous avons alors utilisé le même plugin d'ImageJ que précédemment (Chapitre 8V. C. Interaction des protéines HA-SREBP1c et FLAG-LA R388P), développé par Fabien Gerbal pour quantifier les signaux PLA et leur distribution au sein du noyau. Les noyaux exprimant les protéines GFP-LA WT et R388P ont globalement la même quantité de signaux PLA par noyaux, et donc la même quantité de complexes [GFP-LA – LAP2 α] (Figure 66 C)). Par contre, les cellules exprimant les protéines GFP-LA WT ont un plus grand pourcentage de signal périphérique ($15 \pm 1\%$) que les cellules exprimant les protéines GFP-LA R388P ($8 \pm 0,5\%$) (Figure 66 C)). Ces différences de pourcentages s'expliquent du fait de la localisation exclusivement nucléoplasmique pour les protéines LAP2 α et GFP-LA R388P. Nous concluons que la mutation R388P de la lamine A n'altère pas son interaction avec LAP2 α .

L'émerine, protéine transmembranaire de la membrane nucléaire interne, est détectée par immunofluorescence majoritairement au niveau de l'enveloppe nucléaire dans les cellules exprimant les protéines FLAG-LA WT ou R388P (Figure 66 D)). Elle est également détectée dans une moindre mesure dans le réticulum endoplasmique. On note que lorsque les protéines FLAG-LA R388P forment des agrégats, l'émerine est localisée au niveau de ces agrégats et non plus à l'enveloppe nucléaire (Figure 66 D) image du bas). La quantification des signaux totaux de PLA par noyau montre une diminution significative de 48% entre les cellules exprimant les protéines FLAG-LA WT et celles exprimant les protéines FLAG-LA R388P (Figure 66 F)). Cependant, le pourcentage de signal PLA à la périphérie des noyaux est similaire dans les deux contextes cellulaires (WT/R388P) (Figure 66 F)). Globalement, ces données s'expliquent par la différence de localisation de ces deux partenaires, à savoir le nucléoplasme ou l'enveloppe nucléaire pour la protéine FLAG-LA R388P et l'émerine, respectivement. Par contre, lorsque les protéines sont localisées à proximité, elles sont capables d'interagir ; c'est le cas dans les agrégats localisés à la périphérie nucléaire où l'on détecte des complexes [emerine - LA-R388P] (Figure 66 E, image du bas).

En conclusion, la mutation R388P de la lamine A ne semble pas altérer le domaine d'interaction pour l'émerine et LAP2 α .

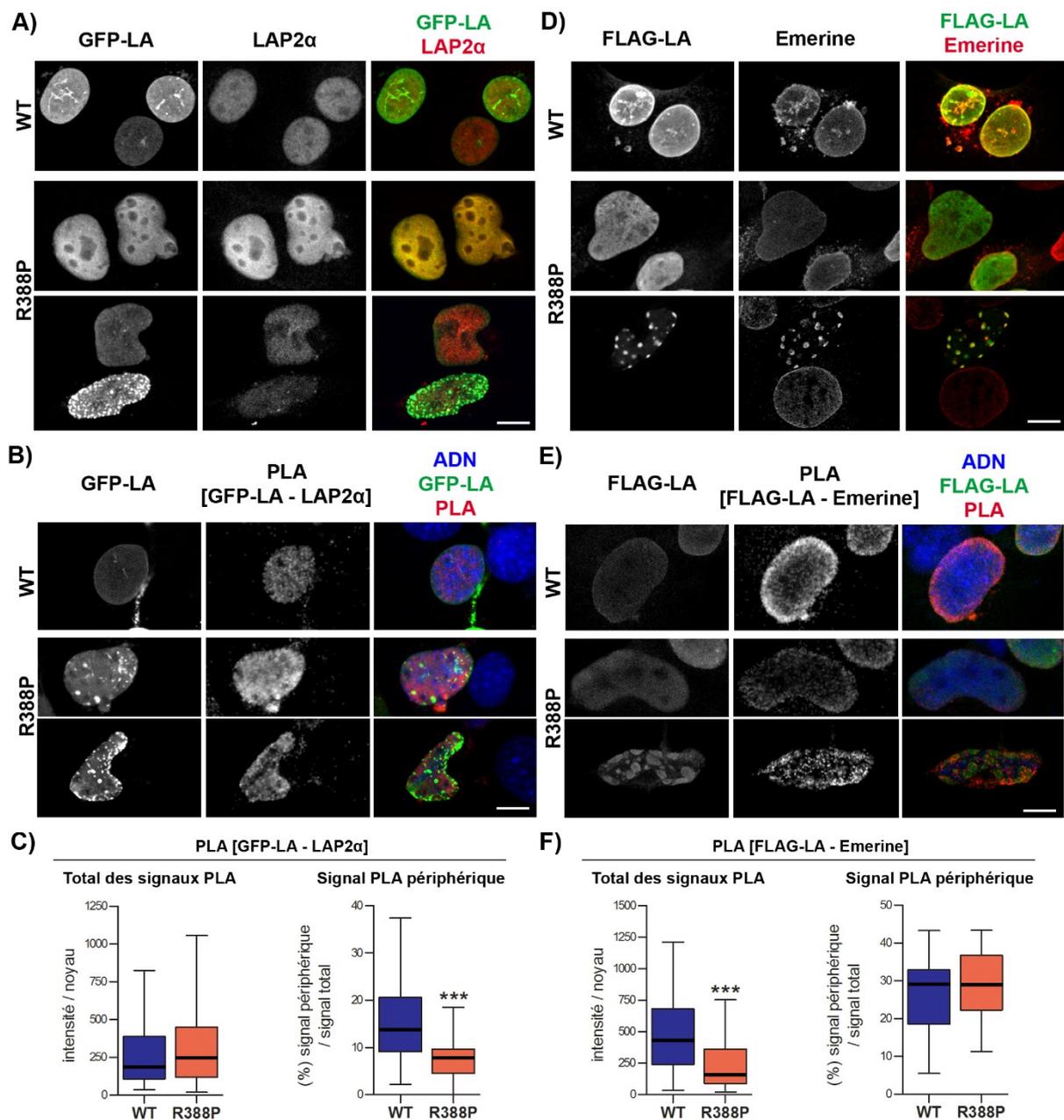


Figure 66 : Interaction de l'émerine et de LAP2α avec les lamines A R388P dans les C2C12.

Des C2C12 ont été transfectées pour exprimer les protéines FLAG- ou GFP-LA WT ou R388P et analysées par immunofluorescence avec des anticorps anti-GFP et anti-LAP2α (A) ou anti-FLAG et anti-Emerine (D) ou pour des expériences de PLA (B) C) E) F).

2. L'émerine et LAP2α sont plus solubles en présence des lamines A R388P

Après avoir montré que l'émerine et LAP2α interagissent *in situ* avec les lamines A R388P, nous nous sommes demandé si les lamines A mutées qui sont anormalement solubles entraîneraient également un défaut d'ancrage à la matrice nucléaire de leurs partenaires. Nous avons soumis les cellules exprimant les protéines FLAG-LA WT ou R388P à une extraction avec des tampons hypotoniques contenant du Triton X-100 (pour perméabiliser les cellules) et des concentrations croissantes de NaCl (50, 150 et 250 mM). Les échantillons (surnageants et culots) ont été analysés par western blot pour détecter les protéines FLAG-LA, les lamines A/C endogènes ainsi que l'émerine et LAP2α.

Comme attendu, les lamines A/C endogènes et les protéines FLAG-LA WT sont résistantes aux extractions quelles que soient les concentrations en sel utilisées. A l'inverse, les protéines FLAG-LA R388P sont solubilisées avec l'ajout de NaCl (50-250 mM). Ce résultat confirme donc la différence de solubilité entre les protéines FLAG-LA WT et R388P. De plus, on observe que le pool de LAP2α et d'émerine solubilisé est plus important en présence de la protéine FLAG-LA R388P qu'en présence de la protéine FLAG-LA WT (Figure 67).

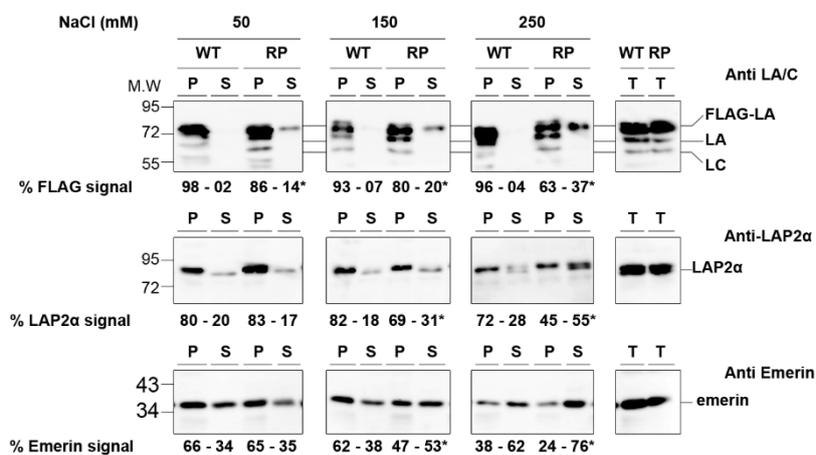


Figure 67 : Augmentation de la solubilité de l'émerine et de LAP2α en présence des lamines A R388P.

Des C2C12 ont été transfectées pour exprimer les protéines FLAG-LA WT ou R388P et extraites avec des tampons contenant différentes concentrations en NaCl (50, 150 ou 250 mM) (S : surnageant, P : fraction insoluble, T : extrait total). Les westerns blots ont été révélés avec des anticorps anti-LA/C, anti-LAP2α et anti-émerine. Pour chaque puits est indiqué le pourcentage du signal ECL du puits par rapport à la somme des deux fractions de la condition correspondante. Les * indiquent les différences de solubilité à noter.

En conclusion, les expériences de colocalisation, de PLA et d'extraction biochimique ont permis de mettre en évidence que la mutation R388P n'empêche pas les lamines A de lier LAP2α et l'émerine, et que, du fait des interactions maintenues, cela entraînerait une augmentation de la solubilité de ces dernières.

III. La mutation R388P de la lamine A et son impact sur l'état de la chromatine

Etant donné que les lamines sont impliquées dans l'organisation de la chromatine, au vu de la localisation nucléoplasmique des protéines FLAG-LA R388P et de leur solubilité augmentée dans les myoblastes C2C12, nous avons émis l'hypothèse que l'expression des FLAG-LA WT ou R388P pourraient avoir un impact différent sur l'état de la chromatine.

Pour tester cette hypothèse, nous avons tout d'abord observé l'aspect de la chromatine par marquage au Hoechst dans des cellules transfectées et réalisé des immunofluorescences 24 h après transfection afin de détecter des marqueurs associés à l'euchromatine.

Nous avons ainsi observé des défauts dans le marquage de la chromatine dans les cellules exprimant les protéines FLAG-LA R388P. En effet, dans certaines cellules nous avons noté une diminution de la quantité de foci d'hétérochromatine et des déplétions de chromatine plus ou moins importantes au niveau des zones où les lamines A R388P sont fortement accumulées (Figure 68).

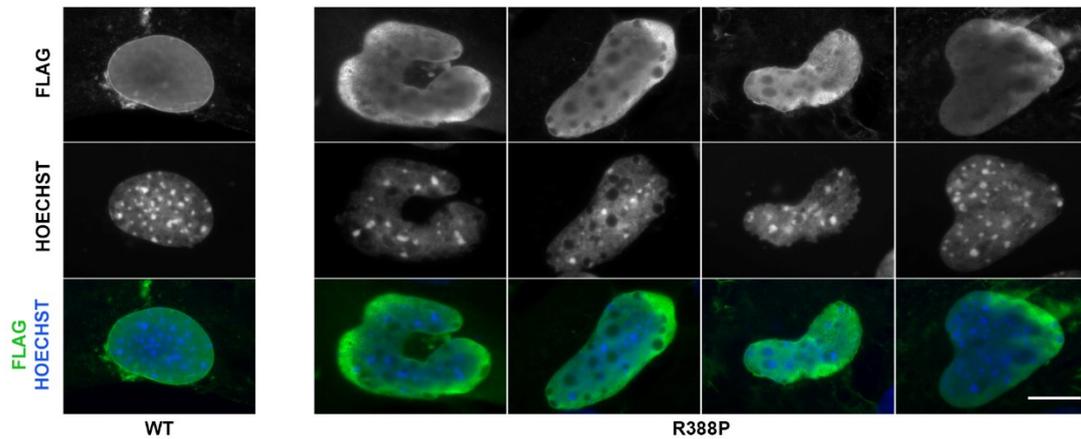


Figure 68 : La mutation R388P de la lamine A et son impact sur l'état de la chromatine de myoblastes C2C12 (a)
 Des myoblastes C2C12 ont été transfectés pour exprimer les FLAG-LA WT et R388P puis fixés, l'ADN marqué au HOECHST
 barre d'échelle, 10 μ m.

Les immunofluorescences ont permis la détection de H3K9ac et H3K27ac de manière diffuse dans le nucléoplasme des myoblastes contrôles (Figure 69). Cependant une sous-population de noyaux exprimant les protéines FLAG-LA WT présentent une très forte diminution, voire une absence du marquage de ces histones acétylées ($6 \pm 2\%$ et $3 \pm 1\%$ des noyaux pour H3K9ac et H3K27ac, respectivement) (Figure 69 A-C)). En revanche, la diminution du signal pour H3 acétylée n'a été observée que dans $0,1 \pm 0,0\%$ des cellules exprimant les protéines FLAG-LA R388P. Plus encore, nous avons observé une augmentation d'intensité du signal pour H3 acétylée spécifiquement dans les cellules exprimant les protéines FLAG-LA R388P (Figure 69 B)). Pour déterminer si ce changement d'acétylation des histones s'accompagnait d'une modification globale de la transcription, nous avons considéré l'ARN polymérase II phosphorylée (ph RNA PolII) comme marqueur. De manière inattendue, les immunofluorescences réalisées avec l'anticorps anti ph RNA polII n'ont donné que peu de signal et dans une minorité des myoblastes de souris contrôles ou transfectées ($7 \pm 2\%$, $21 \pm 4\%$ et $39 \pm 7\%$ des cellules non transfectées ou exprimant les lamines A WT ou R388P, respectivement) (Figure 69). Cependant, après décompaction de la chromatine induite par incubation des cellules avec de la trichostatine A, un inhibiteur d'histone désacétylase (HDAC) des classes I et II (Dokmanovic et al. 2007), du signal nucléaire ph RNA PolII a été détecté dans la majorité des cellules C2C12 contrôles ou transfectées, avec encore une différence entre les cellules exprimant les FLAG-LA WT et R388P (Figure 69). En effet, le pourcentage des noyaux positifs pour ph RNA PolII s'élevait alors à $61 \pm 2\%$ et à $95 \pm 2\%$ dans les myoblastes exprimant les lamines A WT et R388P, respectivement (Figure 69).

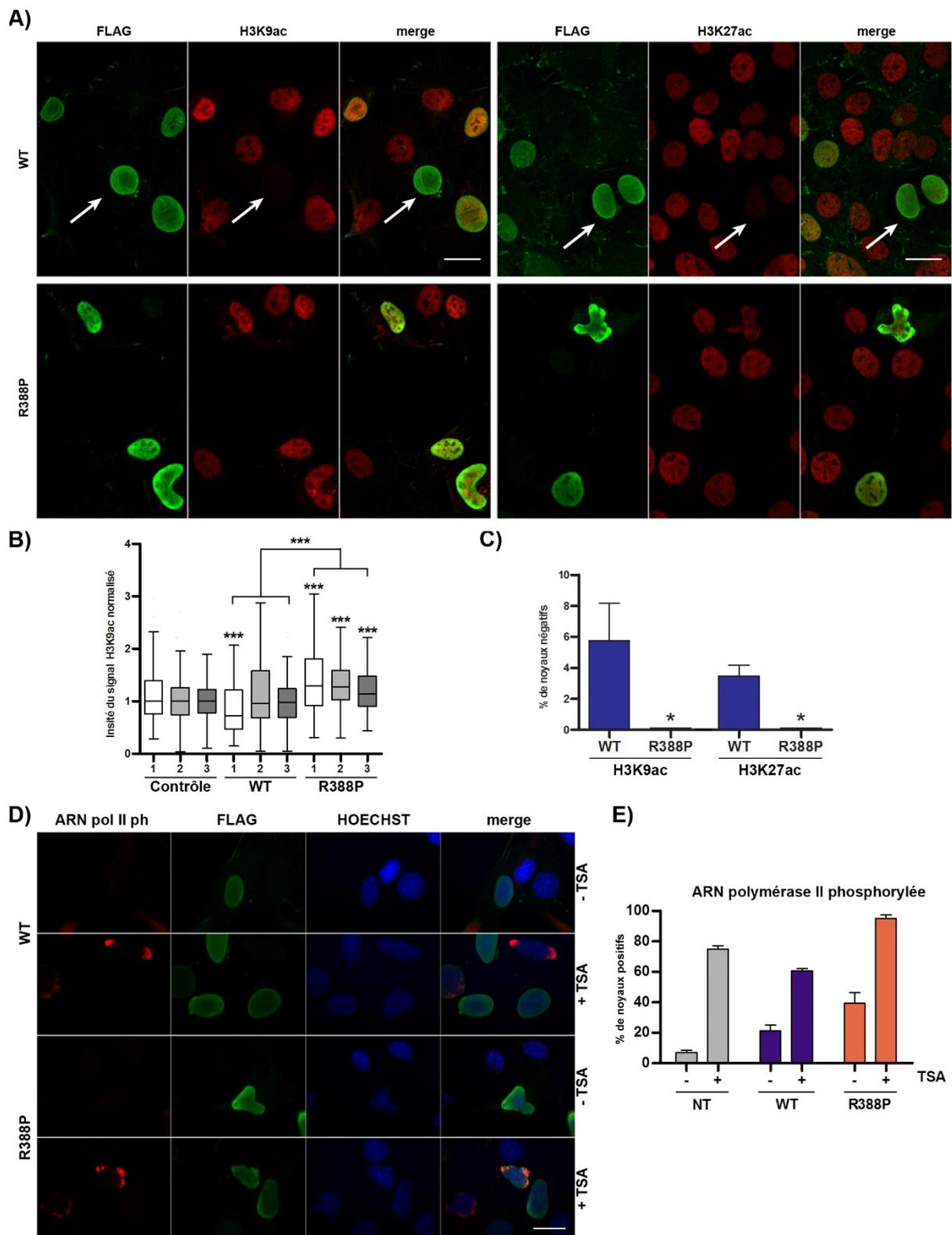


Figure 69 : La mutation R388P de la lamine A et son impact sur l'état de la chromatine de myoblastes C2C12 (b)
 Des myoblastes C2C12 ont été transfectés pour exprimer les FLAG-LA WT et R388P puis fixés et les protéines d'intérêt révélées par immunofluorescence avec des anticorps anti-FLAG, anti-H3K9ac, anti-H3K27ac (**A**) et anti-ARN polymérase II phosphorylée (**D**). **A**) La flèche blanche indique l'absence de marquage des histones H3 acétylées. Barre d'échelle, 20 μ m. **B**) Intensité normalisée des signaux d'H3K9ac des cellules en **A**). Sont représentés les résultats de trois expériences indépendantes (1, 2 et 3). Les significativités au-dessus des boîtes de dispersions sont calculées par rapport aux cellules contrôles de l'expérience. Test statistique de Kruskal-Wallis avec « pairwise comparisons of groups ». **C**) Pourcentage de noyaux présentant une absence de marquage des histones H3K9ac et H3K27ac. $n = 3$, test statistique de Kruskal-Wallis. **E**) Pourcentage de noyaux positifs au marquage de l'ARN polymérase II phosphorylée avec ou sans traitement à la Trichostatine A (TSA). $n = 2$ sans TSA et $n = 3$ avec TSA.

En conclusion, nous avons montré que les cellules exprimant les lamines A R388P présentaient une modification globale de la condensation de la chromatine avec une augmentation des marqueurs de la chromatine active (histone H3 acétylée, ph RNA Pol II).

IV. Caractérisation des dysmorphies nucléaires dues aux lamines A R388P

A. Les Lamines A R388P causent des dysmorphies nucléaires

Dès les premiers essais de surexpression des lamines mutantes dans les myoblastes, nous avons noté la présence fréquente de noyaux très dysmorphiques, avec des formes très variées (Figure 70 A)). Nous avons alors cherché à caractériser plus précisément ces dysmorphies nucléaires, après immunofluorescence des cellules avec les anticorps anti-FLAG. Pour cela il nous a tout d'abord fallu déterminer le moyen par lequel nous allions quantifier ces défauts. En accord avec la littérature, nous avons estimé l'étendue de la dysmorphie des noyaux de deux façons. La première méthode a consisté à déterminer la circularité des noyaux selon la formule : $circularité = \frac{4\pi \times surface}{périmètre^2}$ (la valeur 1 représentant un cercle parfait). Ainsi, la circularité moyenne des noyaux exprimant les protéines FLAG-LA R388P s'est avérée nettement inférieure à celle des noyaux exprimant les protéines FLAG-LA WT ($0,69 \pm 0,02$ vs $0,82 \pm 0,01$) (Figure 70 B)), soulignant une plus grande sévérité de la dysmorphie nucléaire lors de l'expression de la lamine A mutante. Par ailleurs, en considérant que les noyaux ayant une circularité $<0,74$ étaient dysmorphiques, j'ai évalué le pourcentage de noyaux dysmorphiques dans les différentes populations. Ainsi, j'ai estimé à 13% et 60% la quantité de noyaux dysmorphiques dans les myoblastes exprimant les protéines FLAG-LA WT et R388P, respectivement.

La deuxième méthode a consisté à distinguer un noyau ovoïde d'un noyau dysmorphique directement par observation visuelle des immunofluorescences. De cette façon, j'ai obtenu des résultats semblables, i.e. avec $13 \pm 2\%$ et $54 \pm 5\%$ de noyaux dysmorphiques pour les cellules exprimant les protéines FLAG-LA WT et R388P, respectivement (Figure 70 C, graphique de droite). Avec cette méthode, la plus grande sévérité de dysmorphie des noyaux exprimant la lamine A mutante est également confirmée (circularité moyenne de $0,71 \pm 0,01$ et $0,60 \pm 0,01$ pour les cellules exprimant respectivement les FLAG-LA WT et R388P (Figure 70 E)). De plus, parmi les cellules exprimant les lamines mutantes, les noyaux dysmorphiques sont plus grands que les noyaux ovoïdes ($235 \pm 7 \mu m^2$ vs $193 \pm 7 \mu m^2$ (Figure 70 F)).

Les deux méthodes donnent des résultats similaires, mais l'identification par circularité peut être source de faux négatifs et faux positifs, aussi nous avons décidé de garder la méthode dite « visuelle » pour la suite de nos expériences.

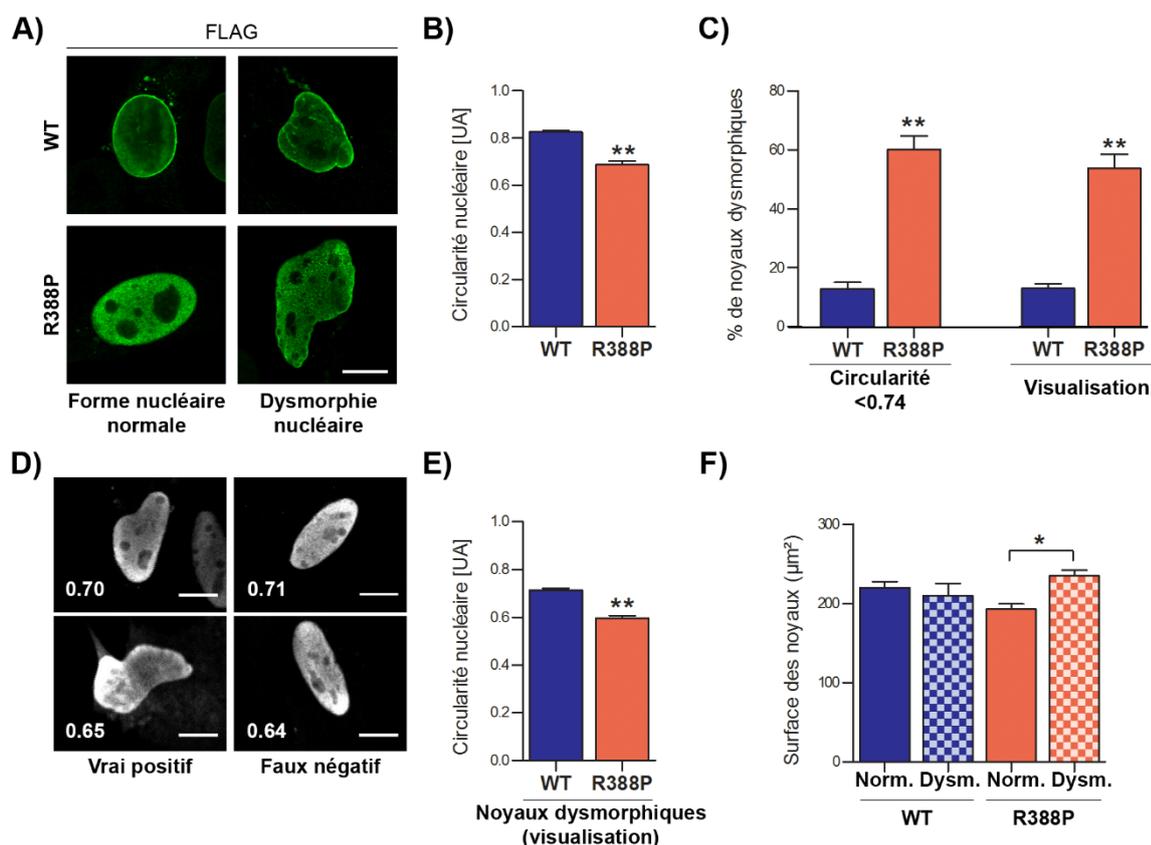


Figure 70 : Les lamines A R388P causent des dysmorphies nucléaires dans les myoblastes C2C12.

A) Exemples de noyaux exprimant les lamines A WT ou R388P présentant une forme nucléaire normale ou anormale (dysmorphique) marqués en immunofluorescence par des anticorps anti-FLAG. Barre d'échelle 10 µm. **B)** Graphique illustrant la circularité des noyaux exprimant les protéines FLAG-LA WT ou R388P. Test statistique de Mann Whitney. **C)** Graphique illustrant le pourcentage de noyaux dysmorphiques selon la définition utilisée, soit la circularité, soit la description visuelle. Test statistique de Mann Whitney. **D)** Exemples de noyaux marqués par des anticorps anti-FLAG et leur valeur de circularité afin de montrer les problèmes de faux positifs liés à cette détermination de la dysmorphie. **E)** Graphique illustrant la valeur de circularité des noyaux déterminés comme dysmorphiques à l'œil. Test statistique de Mann Whitney. **F)** Surface nucléaire des noyaux normaux (Norm.) ou dysmorphiques (Dym.) exprimant les FLAG-LA WT ou R388P. Test statistique de Kruskal-Wallis avec « pairwise comparisons of groups ».

B. Les dysmorphies nucléaires induites par la lamine A R388P se forment lors de la reformation du noyau à la fin de la mitose et persistent en interphase.

Nous nous sommes demandé si les dysmorphies nucléaires étaient présentes à des moments particuliers du cycle cellulaire. Nous avons donc décidé de marquer des cellules exprimant les FLAG-LA WT et R388P avec des anticorps anti- γ -tubuline et anti- α -tubuline. La γ -tubuline est importante pour la nucléation des microtubules et permet de marquer les centres organisateurs des microtubules. Ainsi, nous avons vu que les cellules aux noyaux dysmorphiques avaient deux ou quatre centrosomes (Figure 71 A)), correspondant respectivement aux phases G1 et S-G2 du cycle cellulaire. Notons que dans ces cellules, les centrosomes étaient souvent localisés à proximité des distorsions locales des noyaux (Figure 71 A)). Le marquage de l' α -tubuline utilisé pour marquer le réseau de microtubules permet notamment de repérer les cellules filles issues de cytokinèse à la fin de la mitose. A ce stade du cycle cellulaire, nous avons observé des noyaux dysmorphiques spécifiquement lors de l'expression des protéines FLAG-LA R388P (Figure 71 B)). Ces différents marquages suggèrent donc que les dysmorphies nucléaires causées par l'expression des lamines A

R388P se mettent en place directement à la fin de la mitose lors de la reformation du noyau et persistent en interphase. Afin de confirmer ces résultats, il serait intéressant de faire de la vidéo microscopie sur des cellules transfectées pour exprimer les protéines GFP-LA R388P.

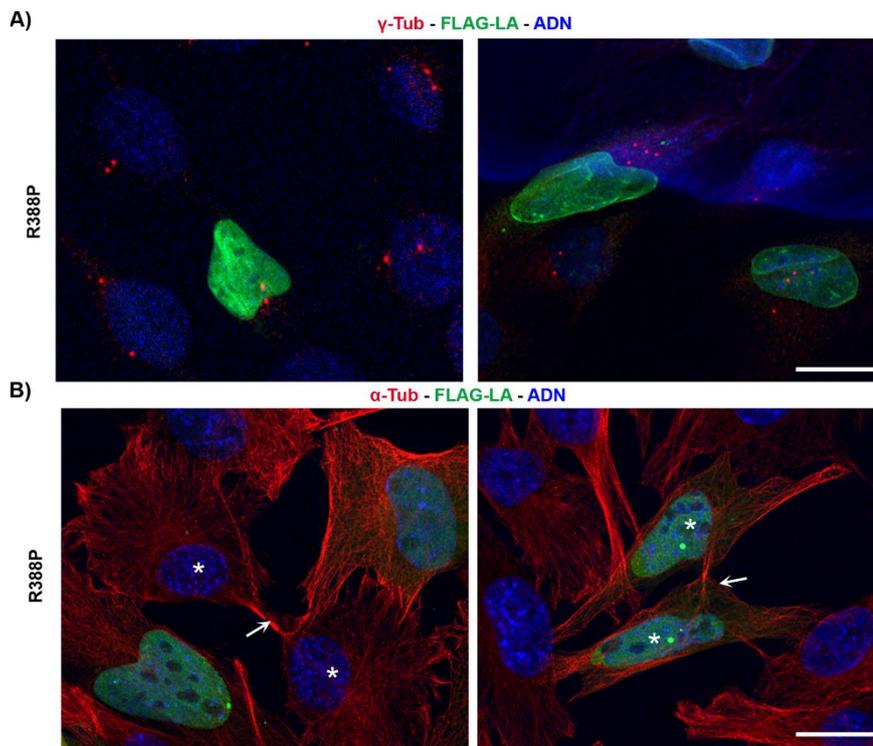


Figure 71 : Les dysmorphies nucléaires induites par la lamine A R388P se forment lors de la reformation du noyau à la fin de la mitose et persistent en interphase.

Des C2C12 ont été transfectées pour exprimer les protéines FLAG-LA R388P et immunomarquées avec des anticorps anti-FLAG, anti- γ -tubuline (A) ou anti- α -tubuline (B). L'ADN a été marqué au HOECHST. Les flèches blanches indiquent le point de contact ultime entre deux cellules filles marquées par les astéris blancs. Barre d'échelle 20 μ m

C. Les dysmorphies nucléaires induites par les lamines A R388P ne sont pas dépendantes de l'accumulation de pré-lamine A.

Comme je l'ai présenté en introduction de ce chapitre, dans nos conditions de transfection, les myoblastes C2C12 transfectés par les pCMV-FLAG-preLA-WT et R388P expriment à la fois les pré-lamines A et les lamines A mature WT et R388P. En référence, au contexte progéria où il est connu que c'est l'accumulation de pré-lamine A mutante (progérine) qui est toxique, nous nous sommes demandé si c'était également l'accumulation de pré-lamine A R388P qui était responsable des dysmorphies nucléaires observées.

Dans un premier temps, nous avons donc testé l'impact des lamines A matures R388P sur les dysmorphies nucléaires. Nous avons alors exprimé les FLAG-Lam WT et R388P et les FLAG-preLA R388P dans des myoblastes C2C12 (Figure 72 A)). Les lamines A matures R388P sont également localisées uniquement dans le nucléoplasme à l'inverse des lamines A matures WT qui sont localisées à la périphérie nucléaire et au sein du nucléoplasme (Figure 72 B)). Les protéines FLAG-Lam WT induisent des noyaux dysmorphiques dans seulement $9 \pm 1\%$ des cellules. En comparaison, les protéines FLAG-Lam R388P induisent des dysmorphies nucléaires dans $25 \pm 3\%$ des cellules, c'est à dire avec la même fréquence que le font les protéines FLAG-LA R388P ($28 \pm 4\%$) (Figure 72 C)).

Bien que les lamines A matures R388P induisent des dysmorphies nucléaires, nous avons ensuite testé si l'accumulation forcée exclusive de pré-lamine A R388P aurait un effet encore plus toxique. Nous avons alors bloqué le processus de maturation des pré-lamines A R388P à deux étapes distinctes : (1) en empêchant la farnésylation des FLAG-preLA R388P et (2) en empêchant l'étape de clivage de la pré-lamine A R388P farnésylée.

Afin d'empêcher la farnésylation des FLAG-preLA et donc la maturation en lamine A mature, nous avons utilisé de la mévinoline, un inhibiteur de l'HMG-CoA réductase, qui inhibe la synthèse du pyrophosphate farnésyl, le substrat des farnésyl transférases. Nous avons testé deux doses pour la mévinoline, 10 et 30 μ M, pendant 18 h. Avec 10 μ M, on observe déjà une accumulation de FLAG-preLA et une absence de FLAG-LAm, que ça soit pour la lamine A WT ou mutante (Figure 72 D)). Notons que la mévinoline en tant que tel n'augmente pas le pourcentage de noyaux dysmorphiques dans les cellules exprimant les protéines FLAG-LA WT ($10 \pm 3\%$ vs $8 \pm 2\%$) (Figure 72 F)). L'accumulation de pré-lamine A R388P avec un traitement à 10 μ M de mévinoline n'augmente pas non plus de manière significative le pourcentage de dysmorphies nucléaires par rapport aux lamines A R388P ($32 \pm 3\%$ vs $40 \pm 7\%$). Néanmoins, en augmentant la dose de mévinoline à 30 μ M, on observe une diminution du pourcentage de dysmorphies nucléaires ($16 \pm 3\%$). Ce résultat suggère que l'inhibition de la farnésylation de d'autres protéines que les pré-lamines A pourrait contribuer à l'amélioration de la forme des noyaux des cellules exprimant les lamines A R388P.

Afin d'empêcher l'étape de clivage de la pré-lamine A R388P en lamine A mature, nous avons généré le plasmide codant le double mutant R388P et L647R (Figure 72 G)). La mutation L647R permet un ré-adressage de la pré-lamine A R388P à l'enveloppe nucléaire (Figure 72 H)), cependant elle ne permet pas de réduire la fréquence des dysmorphies nucléaires comparé aux protéines FLAG-LA R388P ($41 \pm 6\%$ vs $34 \pm 2\%$) (Figure 72 I)). L'accumulation à l'enveloppe nucléaire d'une pré-lamine A R388P farnésylée induit donc également des dysmorphies nucléaires.

En conclusion, ces différentes expériences nous montrent que les lamines A R388P, quel que soit leur niveau de maturation (lamine A mature et pré-lamine A non farnésylée nucléoplasmiques, ou pré-lamine A farnésylée adressée à l'enveloppe nucléaire) induisent toutes des dysmorphies nucléaires sévères dans les myoblastes.

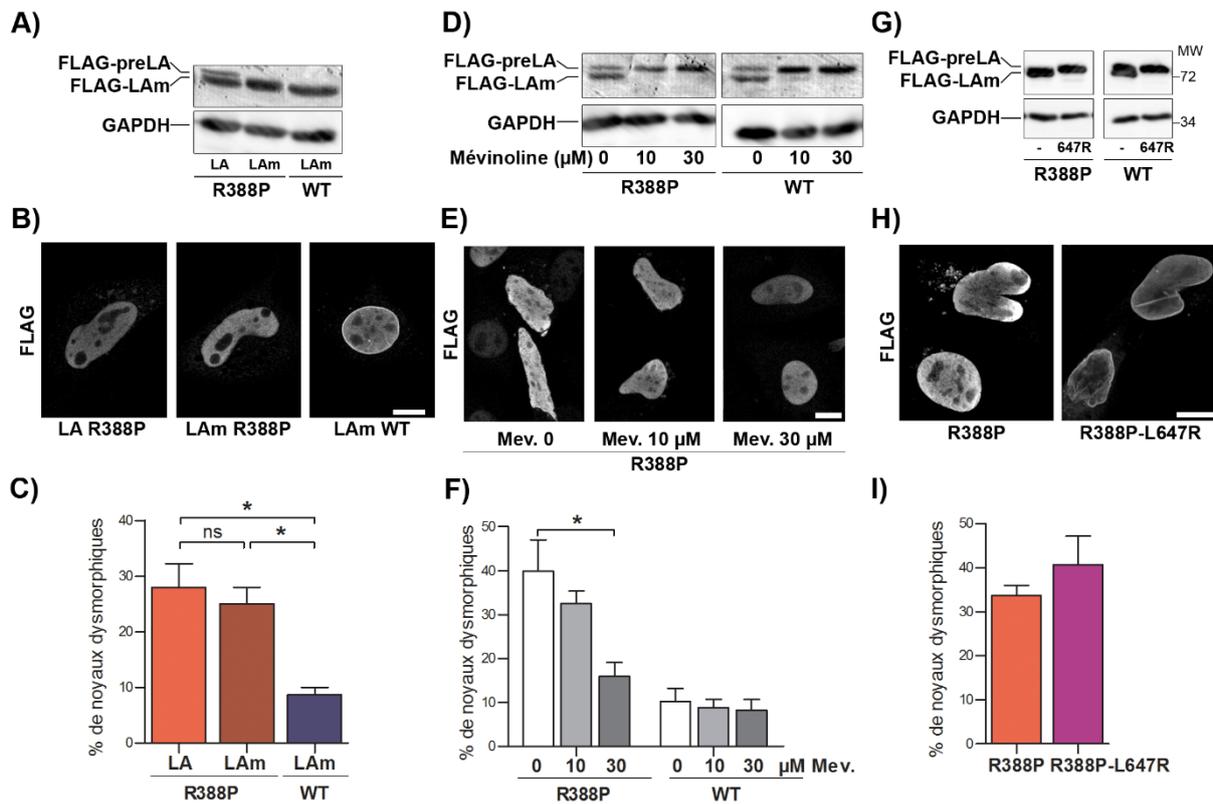


Figure 72 : Les dysmorphies nucléaires induites par les lamines A R388P ne sont pas dépendantes de l'accumulation de pré-lamine A.

A) Des extraits cellulaires totaux de C2C12 surexprimant les protéines FLAG-LA R388P, FLAG-LAm WT ou R388P ont été analysés par western blot avec des anticorps anti-FLAG et anti-GAPDH. **B)** Des cellules C2C12 comme décrites en A), ont été fixées et marquées par immunofluorescence avec des anticorps anti-FLAG et observées au microscope confocal. **C)** Pourcentage de noyaux dysmorphiques dans les cellules décrites en A). $n = 4$, test statistique de Kruskal-Wallis avec « pairwise comparisons of groups ». **D)** Des extraits cellulaires totaux de C2C12 surexprimant les FLAG-LA WT ou R388P et traitées avec 0, 10 ou 30 μM de mévinoline (dans du DMSO) pendant 18 h ont été analysées par western blot avec des anticorps anti-FLAG et anti-GAPDH. **E)** Des cellules C2C12 exprimant les FLAG-LA R388P traitées comme décrit en D) ont été fixées, et marquées avec des anticorps anti-FLAG en immunofluorescence et observées au microscope confocal. **F)** Pourcentage de noyaux dysmorphiques dans les cellules décrites en D). $n = 3$, test statistique de Kruskal-Wallis avec « pairwise comparisons of groups ». **G)** Des extraits cellulaires totaux de C2C12 surexprimant les FLAG-LA WT, FLAG-LA R388P, FLAG-preLA L647R ou FLAG-preLA R388P-L647R ont été analysées par western blot avec des anticorps anti-FLAG et anti-GAPDH. **H)** Des cellules C2C12 exprimant les FLAG-LA R388P traitées comme décrit en G) ont été fixées, et marquées avec des anticorps anti-FLAG en immunofluorescence et observées au microscope confocal. **I)** Pourcentage de noyaux dysmorphiques dans les cellules décrites en G). $n = 3$. Barre d'échelles en B), E) et H) 10 μm .

D. La destruction des filaments du cytosquelette ne permet pas de rétablir une forme normale des noyaux des myoblastes.

Nous pouvons imaginer que les lamines A R388P ne s'assemblant pas correctement en polymères, ne confèrent plus aux noyaux le soutien mécanique dont ils ont besoin. La question alors, était de savoir d'où venaient les forces exercées sur l'enveloppe nucléaire responsables de la déformation des noyaux. Nous avons alors testé le rôle du cytosquelette, lequel est composé dans les myoblastes de filaments d'actine, du réseau de microtubules et du réseau de filaments intermédiaires constitués de desmine et de vimentine. A notre connaissance, il n'existe pas de drogue capable de dépolymériser le réseau de desmine. Cependant, nous avons tiré profit du fait que par immunofluorescence, seule une sous-population des myoblastes C2C12 (40% à 80% selon les expériences) présente un réseau important de desmine. Or nous avons observé des noyaux dysmorphiques même dans les cellules sans réseau de desmine détectable (Figure 73 A)). De plus, la

fréquence de cellules exprimant de la desmine n'est pas plus importante dans la sous population de myoblastes à noyaux dysmorphiques (Figure 73 B)). En conclusion, les filaments de desmine ne semblent pas influencer l'étendue des dysmorphies nucléaires induites par les lamines A R388P dans les myoblastes en prolifération.

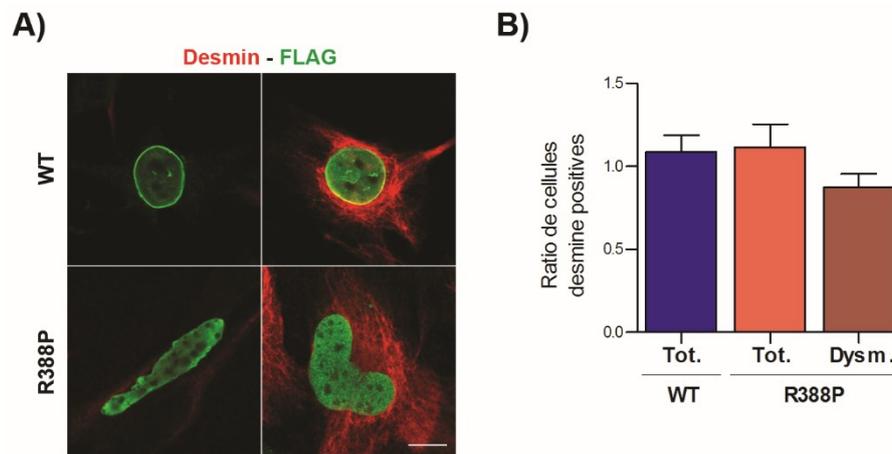


Figure 73 : Le réseau de desmine ne semble pas responsable des dysmorphies nucléaires.

Des myoblastes C2C12 ont été transfectés pour exprimer les protéines FLAG-LA WT et R388P et immunomarcués avec des anticorps anti-FLAG et anti-Desmine. **A)** Exemples de cellules exprimant ou n'exprimant pas la desmine. Barre d'échelle 10 μ m. **B)** Graphique représentant le ratio de cellules positives pour la desmine, dans les populations de cellules totales (Tot.) ou dans les sous-populations avec noyaux dysmorphiques (Dysm.).

Les immunofluorescences révélant l'actine n'ont pas mis en évidence de structures particulières au niveau des dysmorphies nucléaires dues à l'expression des lamines A R388P. Nous avons quand même quantifié les pourcentages de dysmorphies nucléaires lorsque les myoblastes C2C12 ont été traités avec la cytochalasine D, une drogue permettant la dépolymérisation des filaments d'actine. Deux doses (1 et 2 μ M) et deux timings (20 min et 3 h) ont été testés. Au bout de 20 min de traitement les filaments d'actine sont partiellement dépolymérisés, et le sont complètement au bout de 3 h (Figure 74 A) et C)). Cependant après trois heures de traitement à 2 μ M les cellules changent drastiquement de conformation. En effet, la diminution des fibres de stress et d'adhésion focale s'accompagne aussi d'une réduction drastique de la taille et d'un arrondissement des noyaux, ce qui rend impossible la comparaison de morphologie des noyaux avec ceux des cellules non traitées (Figure 74 C)). Quoi qu'il en soit, la fréquence des dysmorphies nucléaires dues à l'expression des lamines A R388P reste élevée après traitement à la cytochalasine D pendant trois heures à 1 μ M (29 \pm 7% vs 30 \pm 8%) (Figure 74 D)). En conclusion, la dépolymérisation des filaments d'actine n'est donc pas suffisante pour améliorer la forme des noyaux de cellules exprimant les FLAG-LA R388P.

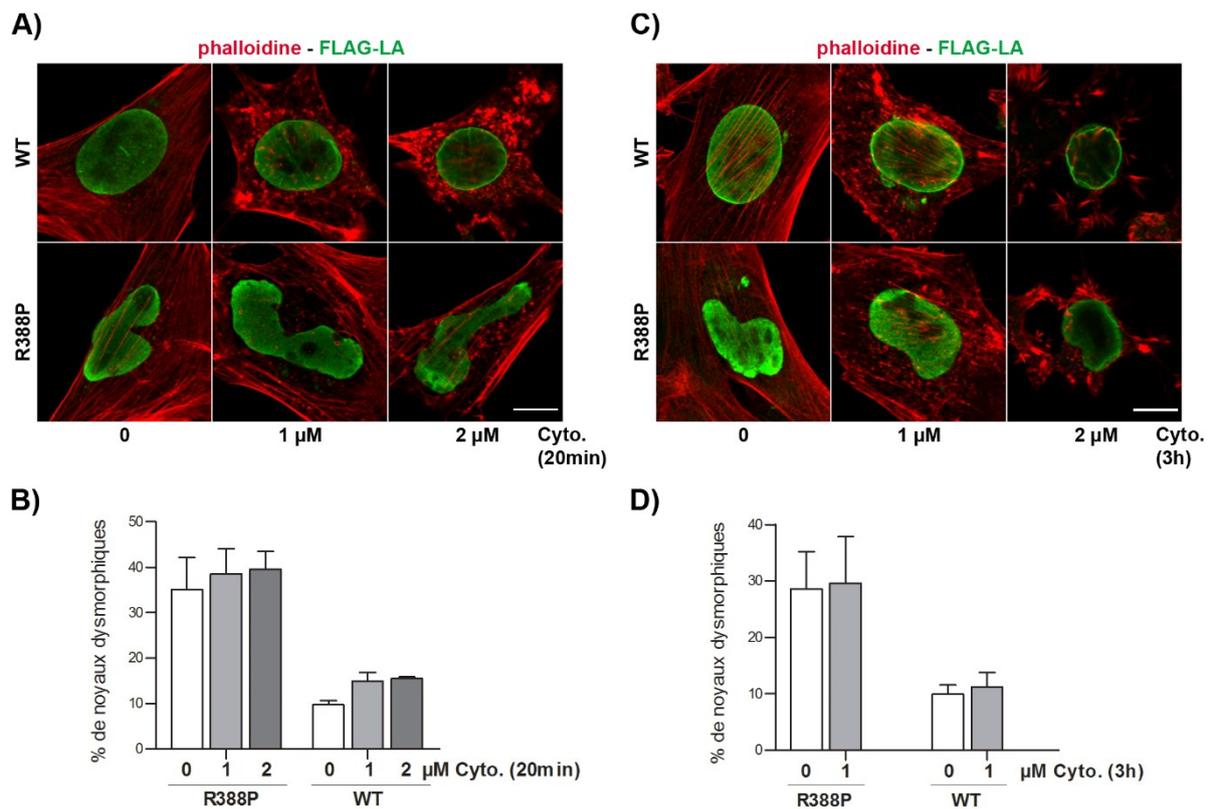


Figure 74 : La destruction des filaments d'actine ne permet pas de rétablir la forme normale des noyaux.

Des myoblastes C2C12 ont été transfectés pour exprimer les protéines FLAG-LA WT et R388P, traitées avec 0, 1 ou 2 μM de cytochalasine D pendant 20 min (A) et B) ou 3 h (C) et D) et immunomarquées avec des anticorps anti-FLAG et de la phalloïdine (A) et C). Barre d'échelle 10 μm . Les pourcentages de noyaux dysmorphiques dans les différentes conditions sont indiqués en B) et D).

Nous avons traité des myoblastes C2C12 exprimant les FLAG-LA WT et R388P avec du nocodazole, une drogue qui permet la dépolymérisation des microtubules. Plusieurs concentrations (5 et 10 μM) et deux timings différents (1 h et 3 h) ont été testés. Dans toutes ces conditions, les microtubules ont été efficacement dépolymérisés (Figure 75 A) et C)), cependant cela n'a pas permis de réduire la fréquence des noyaux dysmorphiques dans les cellules exprimant les lamines A R388P (Figure 75 B) et D)). A l'inverse, 10 μM de nocodazole pendant 3 h a réduit de 1,8 fois la fréquence des noyaux dysmorphiques dans les cellules exprimant les lamines A WT (Figure 75 D)). En conclusion, la dépolymérisation des microtubules n'est donc pas suffisante pour améliorer la forme des noyaux de cellules exprimant spécifiquement les FLAG-LA R388P.

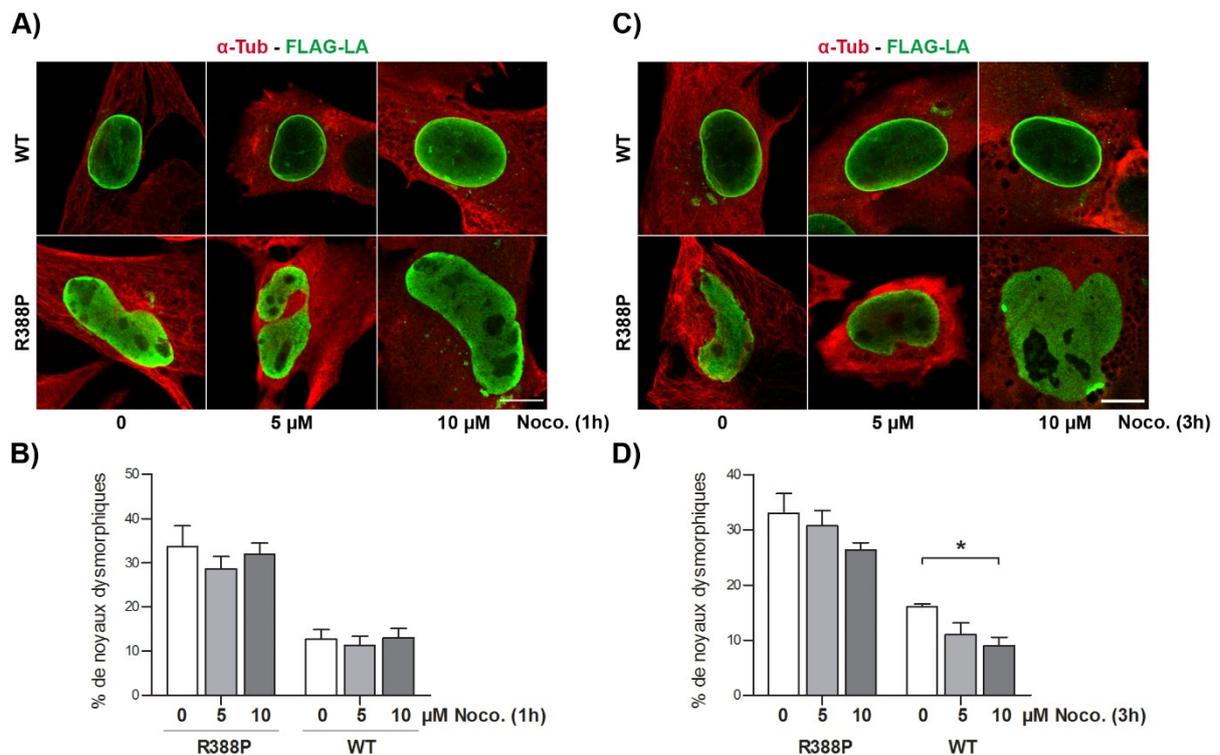


Figure 75 : La destruction des microtubules ne permet pas de rétablir la forme normale des noyaux.

Des myoblastes C2C12 ont été transfectés pour exprimer les protéines FLAG-LA WT et R388P, traités avec 0, 5 ou 10 μ M de nocodazole pendant 1 h (A) et B) ou 3 h (C) et D)) et immunomarquées avec des anticorps anti-FLAG et anti- α -tubuline (A) et C)). Barre d'échelle 10 μ m. Les pourcentages de noyaux dysmorphiques dans les différentes conditions sont indiqués en B) et D).

En conclusion, dans les cellules exprimant les lamines A R388P, la desmine, ne provoque pas les dysmorphies nucléaires. De plus la dépolymérisation des filaments d'actine ou des microtubules ne permet pas d'améliorer la forme des noyaux dysmorphiques. Cependant cela ne veut pas dire que les filaments d'actine ou les microtubules ne sont pas impliqués dans la mise en place de ces dysmorphies nucléaires. Aussi nous avons stabilisé les structures de microtubules avec du taxol, nous avons alors mis en évidence une possible aggravation des dysmorphies nucléaires dans les cellules exprimant les lamines A R388P (43% vs 52% de noyaux dysmorphiques pour n = 1) (Figure 76). Ainsi la destruction des microtubules ne permet pas de rétablir la forme des noyaux, mais ils pourraient tout de même être impliqués dans leur mise en place ou participer à leur maintien en parallèle de d'autres mécanismes.

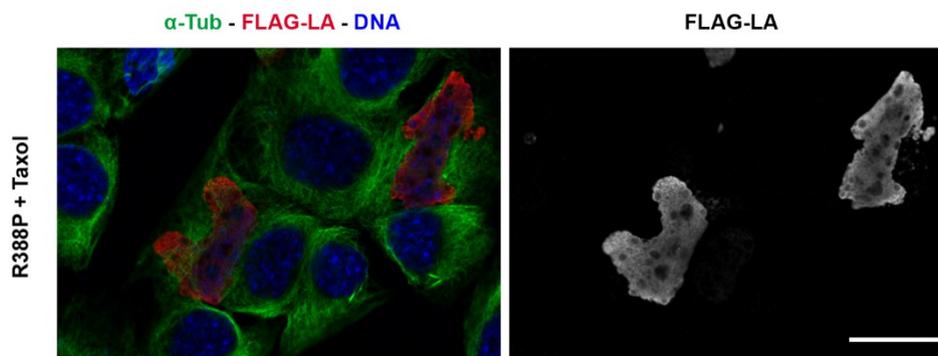


Figure 76: La stabilisation des microtubules aggrave les dysmorphies nucléaires dues aux lamines A R388P

Des myoblastes C2C12 ont été transfectés pour exprimer les protéines FLAG-LA WT et R388P, traités avec 1 μ M de taxol pendant 2 h, fixés et les protéines d'intérêt révélées par immunofluorescence avec des anticorps anti-FLAG et anti- α -tubuline. L'ADN est marqué au HOECHST. Barre d'échelle, 20 μ m.

E. La modification de la structure de la chromatine induite par des drogues ne permet pas de rétablir une forme normale des noyaux de myoblastes.

Etant donné que ce ne sont pas les forces exercées par le cytosquelette sur l'enveloppe nucléaire qui semblent être seules à l'origine des dysmorphies nucléaires, nous nous sommes demandé si ce n'étaient pas des forces intranucléaires qui en seraient la cause. En effet, comme nous l'avons vu, les cellules exprimant les protéines FLAG-LA R388P présentent une augmentation de l'acétylation de H3. C'est pourquoi, nous avons émis l'hypothèse que la chromatine, parce que plus décondensée et moins compacte occuperait plus de volume et pourrait exercer une pression de l'intérieur du noyau vers l'enveloppe nucléaire, conduisant à des déformations nucléaires. Afin de tester cette hypothèse nous avons testé deux types de molécules jouant sur l'acétylation de la chromatine : (1) l'acide anacardique (AA), un inhibiteur d'histone acétyl transférase (HAT) (Cui et al. 2008), et (2) la trichostatine A (TSA), un inhibiteur d'histone désacétylase (HDAC) de classe I et II (Dokmanovic et al. 2007).

L'efficacité des drogues a été attestée sur des extraits protéiques totaux de cellules par western blot et révélation avec des anticorps soit anti-H3K9ac pour l'acide anacardique soit anti-H3K27ac pour la trichostatine A (Figure 77 B)). Comme attendu, l'acide anacardique permet une diminution ($71 \pm 3\%$) du signal d'H3K9ac et la trichostatine A une augmentation ($286 \pm 57\%$) du signal d'H3K27ac que ce soit pour les cellules exprimant les lamines A WT ou R388P (Figure 77 C)). Notons que ces drogues ont également un effet sur l'expression des lamines ectopiques, en effet l'acide anacardique diminue l'expression des protéines FLAG-LA de $35 \pm 12\%$ alors que la trichostatine A augmente l'expression des protéines FLAG-LA de $211 \pm 25\%$. L'observation des cellules après immunofluorescence a révélé que l'acide anacardique ne diminue pas le pourcentage des dysmorphies nucléaires ($28 \pm 3\%$ vs $35 \pm 8\%$) (Figure 77 A) et D)). Quant à la trichostatine A, elle augmente le pourcentage de noyaux dysmorphiques significativement dans les cellules exprimant les lamines A R388P ($20 \pm 8\%$ vs $60 \pm 4\%$) (Figure 77 A) et D)).

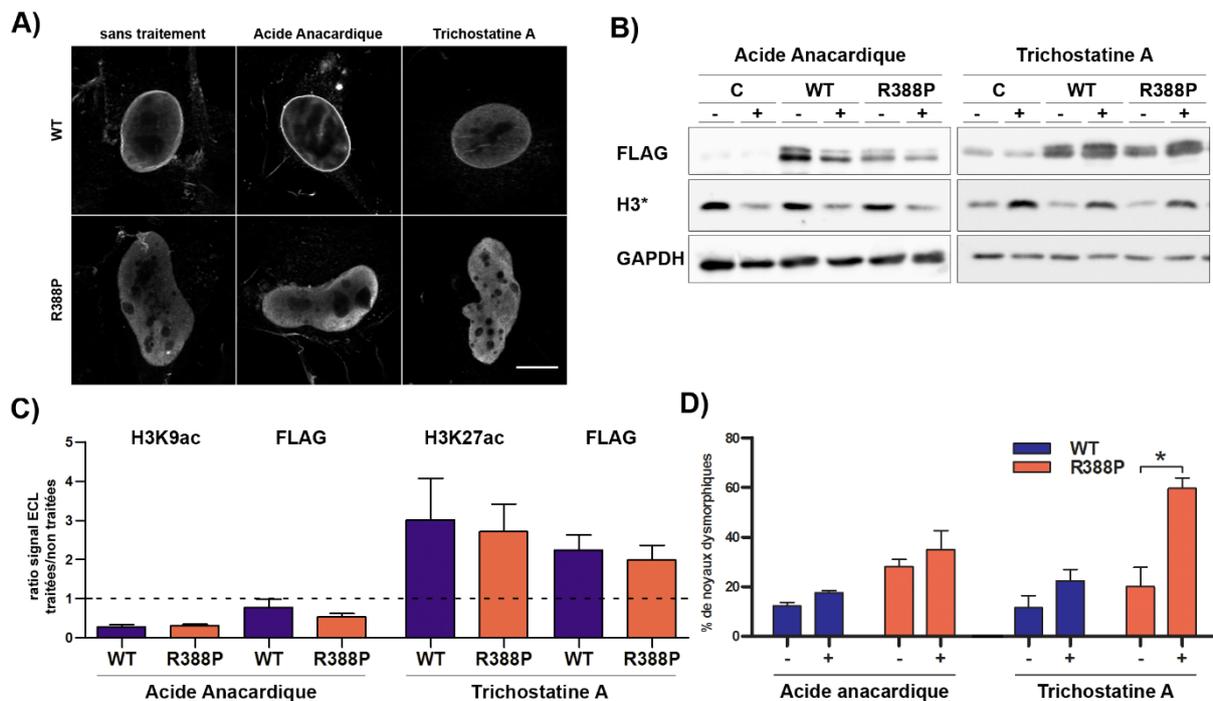


Figure 77 : La modification de l'état d'acétylation des histones induite par des drogues ne permet pas de rétablir une forme normale des noyaux de myoblastes exprimant les lamines A R388P.

Des myoblastes C2C12 ont été transfectés pour exprimer les protéines FLAG-LA WT et R388P, traitées avec 0 ou 100 μM d'acide anacardique (AA) ou 0 ou 0,1 μM de trichostatine A (TSA). **A)** Les cellules ont été fixées et les protéines d'intérêt révélées par immunofluorescence avec les anticorps anti-FLAG. Barre d'échelle 10 μm . **B)** Des extraits protéiques totaux ont été analysés par western blot et révélés avec des anticorps anti-FLAG, anti-H3K9ac, anti-H3K27ac et anti-GAPDH ou anti-actine. Les rapports des signaux ECL des protéines d'intérêt des cellules traitées par rapport aux cellules non traitées sont représentés dans les graphiques en **C)**. Les pourcentages de noyaux dysmorphiques dans les différentes conditions sont indiqués en **D)**. Test statistique de Kruskal-Wallis avec « pairwise comparisons of groups ».

L'ajout d'acide anacardique seul ne permettant pas d'améliorer les dysmorphies nucléaires et la stabilisation des microtubules ayant montré une aggravation des dysmorphies, j'ai décidé de traiter des cellules transfectées avec une combinaison d'acide anacardique et de nocodazole.

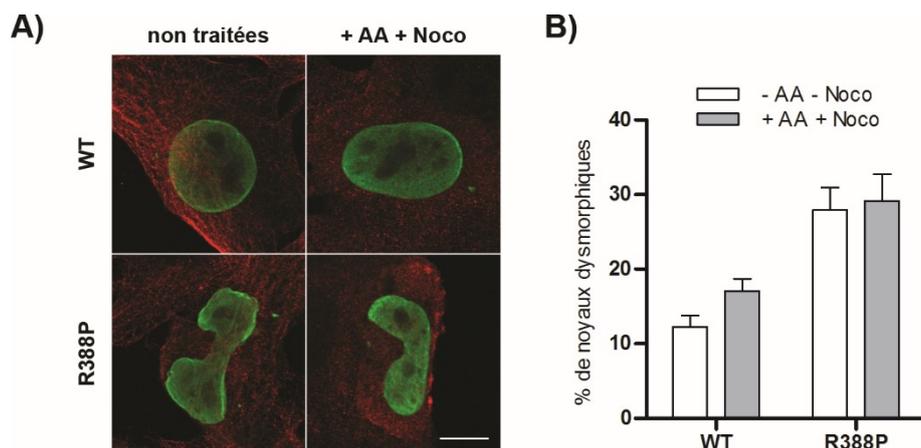


Figure 78 : Le traitement combiné de Nocodazole et d'Acide Anacardique ne permet pas de rétablir une forme normale des noyaux de myoblastes exprimant les lamines A R388P

Des myoblastes C2C12 ont été transfectés pour exprimer les FLAG-LA WT et R388P, traitées avec 0 ou 100 μM d'acide anacardique (AA) et 0 ou 10 μM de nocodazole pendant 3 h. Les cellules ont été fixées et les protéines d'intérêt révélées par immunofluorescence avec des anticorps anti-FLAG (vert) et anti- α -tubuline (rouge) (**A)**). Barre d'échelle, 10 μm . **B)** Quantification des pourcentages de dysmorphies nucléaires dans les cellules. Test statistique de Kruskal-Wallis avec « pairwise comparisons of groups ».

En conclusion, nous n'avons pas pu réduire la fréquence des dysmorphies nucléaires générées par les lamines A R388P dans les myoblastes, en jouant sur l'intégrité du cytosquelette et/ou la compaction de la chromatine.

V. La lamine A mutée R388P et la différenciation myogénique

A. Etude de la différenciation myogénique des clones de myoblastes C2C12 exprimant de manière stable les lamines A R388P

1. Etablissement des clones C2C12 stables et étude de leur prolifération

L'idéal pour étudier la différenciation myogénique est d'avoir une population de cellules homogène. Or, dans nos conditions de transfection transitoire, seules 30% des C2C12 expriment les lamines A ectopiques. C'est pourquoi, nous avons décidé d'établir des lignées de clones stables (voir Matériels et méthodes).

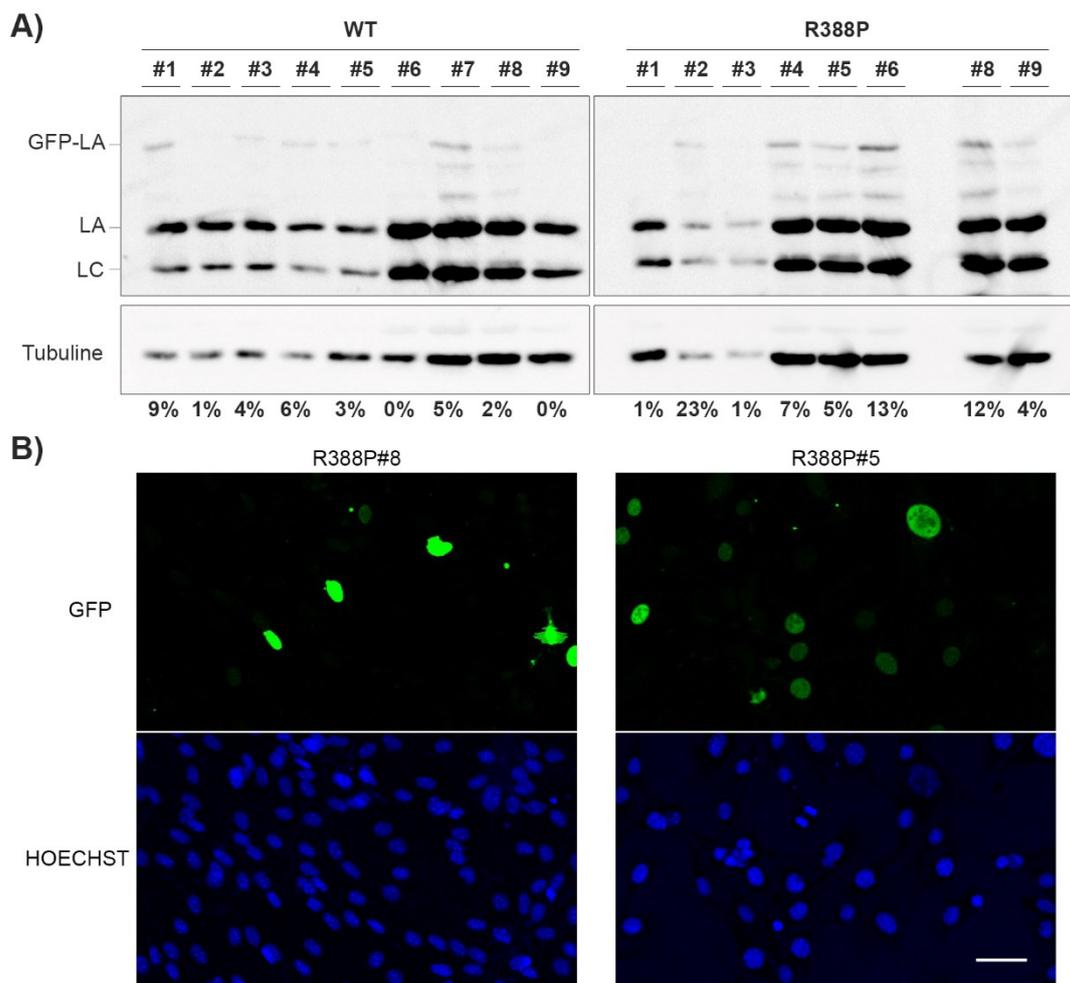


Figure 79 : Sélection des clones stables

A) Des extraits cellulaires totaux de clones stables ont été analysés par western blot et révélés avec des anticorps anti-LA/C et anti- α -tubuline. La quantification des signaux ECL pour les protéines est indiquée pour chaque clone par le rapport GFP-LA/LA endogène (%). **B)** Exemple d'expression de GFP-LA pour deux clones observés au microscope. Barre d'échelle, 50 μ m.

Au final, parmi les clones sélectionnés (9 exprimant les GFP-LA WT et 8 exprimant les GFP-LA R388P), l'expression de lamine A ectopique par rapport à la lamine A endogène (estimée par western blot) s'est avérée faible, variant de 1 à 23% (Figure 79). Tenant compte également des signaux GFP intracellulaires (observés au microscope), j'ai choisi de garder les clones suivants : GFP vide : 3, 4 et 5 ; GFP-LA WT : 1, 5 et 7 ; GFP-LA R388P : 2, 5 et 6.

Avant de commencer les expériences de différenciation, j'ai d'abord contrôlé si les différents clones avaient les mêmes capacités de prolifération. Aussi, les clones ont été ensemencés au même nombre au J0 puis à J1, J2, J3 et J4 les cellules ont été comptées. A partir des courbes de croissance des cellules j'ai déterminé le temps de doublement de chacun des clones à partir de J1 (Figure 80 A)). Lorsque l'on fait la moyenne des temps de doublement des cellules pour les différents groupes (WT, R388P ou GFP-vidé) on ne note pas de différence (17,5 h, 17 h et 17 h respectivement) (Figure 80 B)).

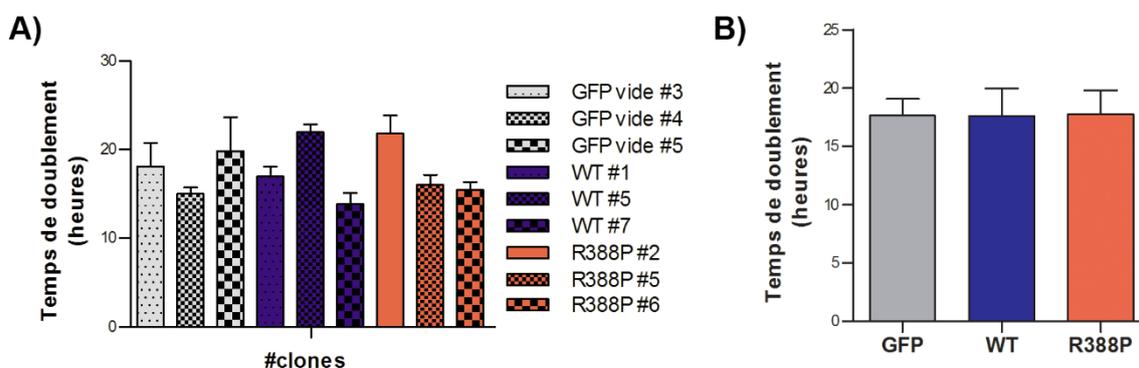


Figure 80 : Les clones stables exprimant les protéines GFP-LA WT ou R388P ont le même temps de doublement de population que les clones contrôles.

A) Temps moyen de doublement de chaque population indiqué en heures. **B)** Moyenne du temps de doublement des populations exprimant les protéines GFP, GFP-LAWT et GFP-LAR388P.

2. Expériences de différenciation avec les clones stables

Nos clones n'ont pas différencié dans les conditions habituelles utilisées pour les C2C12 natives, à savoir le transfert des cellules confluentes dans un milieu dépourvu de FBS mais contenant 2% de sérum de cheval. Cette incapacité est sans doute liée au fait que le processus de clonage a nécessité de nombreux passages des cellules (voir Matériels et méthodes), un fait connu pour réduire les capacités de différenciation in vitro des C2C12. J'ai donc optimisé le protocole de différenciation de deux manières, tout d'abord les clones ont été ensemencés dans des puits recouverts de Matrigel, puis du B-27 a été ajouté au milieu de culture. Le Matrigel est une matrice de reconstitution de la membrane basale extraite de cellules de sarcome de souris Engelbreth-Holm-Swarm, une tumeur riche en matrice extra cellulaire (60% laminine, 30% collagène IV, 8% entactine, ...). Le B-27 est un supplément qui a d'abord été développé pour la culture à long terme de neurones corticaux ou d'hippocampe de rats. Il a ensuite été largement utilisé pour la différenciation des neurones mais est aussi utilisé pour une grande variété de types cellulaires. Grâce à ces deux éléments les clones ont pu différencier en myotubes.

Deux expériences de différenciation ont été réalisées sur les clones stables, les expériences n1 et n2 (Figure 81). Lors de la première expérience, on observe que de manière générale, les clones forment des myotubes au 9^{ème} jour de différenciation. Plus précisément, les clones WT#5 et #7 et R388P#5 forment des longs myotubes à J9, les clones WT#1 n'en forment pas encore mais sont toujours confluents et vivants, alors que les clones R388P#2 commencent à dégénérer et les #6 sont morts. Pour la deuxième expérience, la cinétique de différenciation était plus rapide, avec détection des myotubes dès le 6^{ème} jour de différenciation. En effet, les clones WT#5 et #7 et R388P#5 forment de longs myotubes, comparables à ceux observés en n1 à J9. Les clones R388P#2 et #6 forment quelques rares myotubes de petite ou moyenne taille. Enfin, les clones WT#1 sont alignés mais ne forment pas de myotubes.

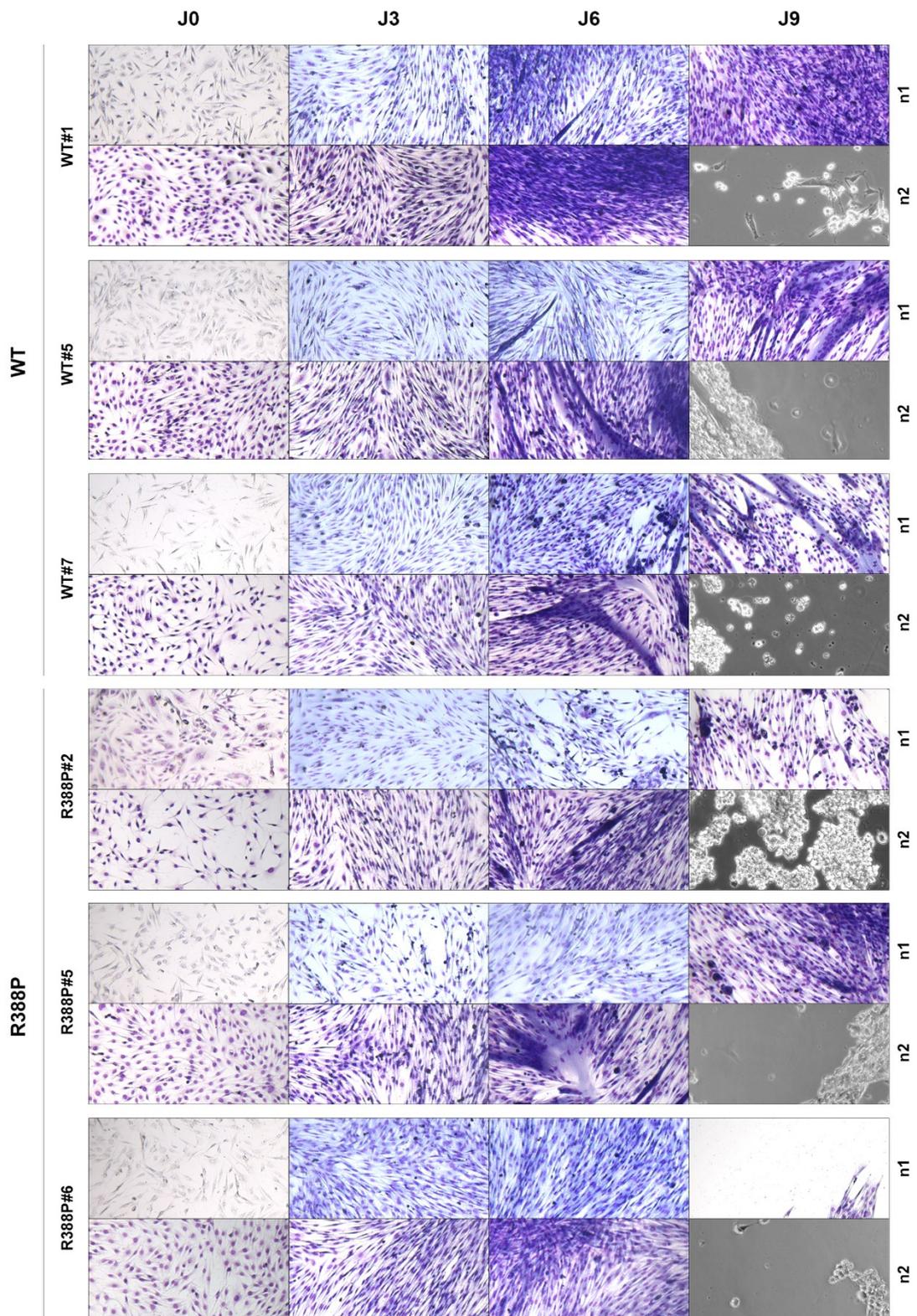


Figure 81 : Observation de la cinétique de formation de myotubes après fixation des clones C2C12 et coloration au Giemsa.

Les clones WT#1, WT#5, WT#7, R388P#2, R388P#5, R388P#6 ont été ensemencés sur matrigel puis mis en milieu de différenciation. Les cellules fixées ont été marquées au GIEMSA pour les jours J0, J3, J6 pour les deux expériences, et au jour J9 uniquement pour la première expérience. Des illustrations des deux expériences faites sont montrées (n1 et n2).

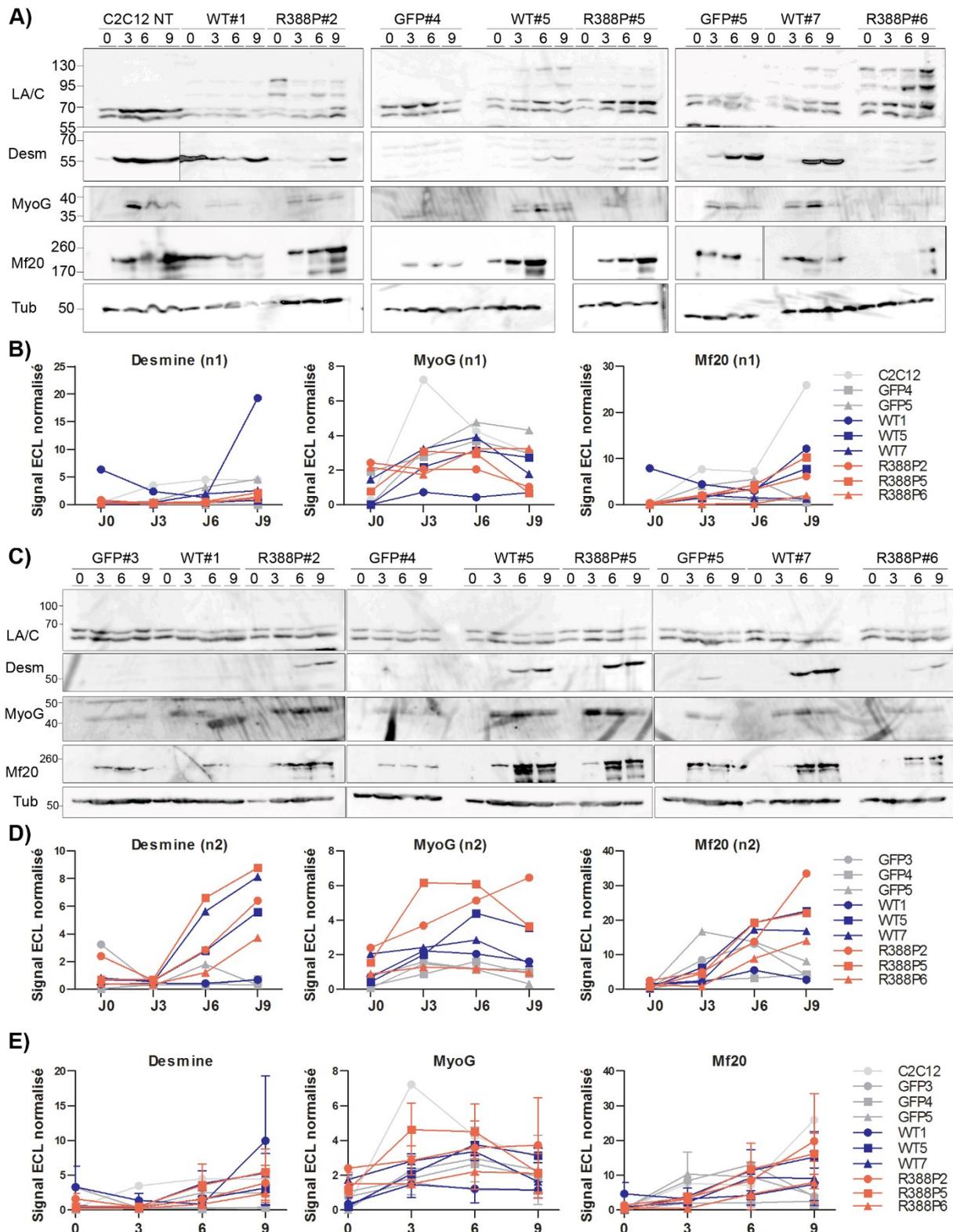


Figure 82 : Expression de protéines des clones GFP(vide), WT et R388P en différenciation.

Des cellules C2C12 non transfectées (NT) et les clones GFP#3, GFP#4, GFP#5, WT#1, WT#5, WT#7, R388P#2, R388P#5, R388P#6 ont été ensemencés sur matrigel puis mis en milieu de différenciation. Des extraits protéiques totaux ont été réalisés et déposés sur SDS-page pour deux expériences (n1 **A**) et n2 **C**). Les westerns blots ont été révélés avec des anticorps anti-LA/C, anti-MyoG, anti-Desmine (Des), Mf20 (anti-MHC), anti- α -tubuline (Tub). Les différents signaux ECL ont été quantifiés et normalisés par rapport à la tubuline (**B**, **D**)). Les moyennes des quantifications des signaux ECL de n1 et n2 pour les différents clones sont illustrées dans les graphiques en **E**) en fonction des jours de différenciation.

En parallèle des acquisitions nous avons également réalisé des extraits protéiques totaux pour quantifier trois protéines marqueurs de la différenciation myogénique : (1) La desmine, protéine de la famille des filaments intermédiaires, (2) la myogénine (ou MyoG), facteur de transcription muscle-spécifique impliqué dans la coordination de la différenciation myogénique, (3) la chaîne lourde des myosines (MyHC) (reconnues par l'anticorps Mf20) (Figure 82).

Dans l'expérience 2, il s'est avéré que l'expression des protéines GFP-LA était quasi nulle, en dépit du maintien de la sélection des clones avec la drogue G418 (Figure 82). C'est peut-être justement la perte d'expression des lamines ectopiques mutées qui a permis aux trois clones R388P de différencier et à deux d'entre eux d'avoir une différenciation comparable aux WT#5 et WT#7.

	Exp1					Exp2				
	GFP-LA	GIEMSA	Desmine	MyoG	Mf20	GFP-LA	GIEMSA	Desmine	MyoG	Mf20
WT#1	faible	Pas de myotubes	Augmente de J6 à J9	nulle	Augmente de J3 à J9	Quasi nulle	Pas de myotubes	nulle	Pic à J3	Pic à J6
WT#5	Augmente de J0 à J9	Myotubes à J9	Augmente de J6 à J9	pic à J6	Augmente de J3 à J9	Quasi nulle	Myotubes à J6	Augmente de J3 à J9	Pic à J6	Augmente de J0 à J9
WT#7	Pic à J6	Myotubes à J9	Augmente de J6 à J9	pic à J6	Augmente de J3 à J6	Quasi nulle	Myotubes à J6	Augmente de J3 à J9	Pic à J6	Augmente de J0 à J6
R388P#2	Diminue entre J0 et J3	Pas de myotubes début dégradation	Augmente à J9	nulle	Augmente de J3 à J9	Quasi nulle	Rares myotubes à J6	Augmente de J3 à J9	Augmente de J0 à J9	Augmente de J0 à J9
R388P#5	faible	Myotubes à J9	Augmente de J6 à J9	pic à J6	Augmente de J3 à J9	Quasi nulle	Myotubes à J6	Augmente de J3 à J9	Pic à J3	Augmente de J0 à J9
R388P#6	Augmente de J0 à J9	Mort des cellules à J9	Augmente à J9	pic à J6	Augmente à J9	Quasi nulle	Rares myotubes à J6	Augmente de J3 à J9	nulle	Augmente de J3 à J9

Tableau 3 : Synthèse des résultats obtenus après observation des cellules au microscope et analyse des protéines par western blots, pour les clones C2C12 placés en milieu de différenciation.

En conclusion, lorsque l'on corrèle la capacité des clones selon les différents critères utilisés (formation de myotubes, expression de desmine, myogénine et MHC) avec le niveau d'expression des lamines A ectopiques, cela suggère que l'inhibition de la différenciation induite par GFP-LA R388P est dose dépendante. Cependant, pour valider notre conclusion, il aurait fallu pouvoir répéter ces expériences. Mais au vu de la trop grande variabilité de l'expression des lamines A ectopiques dans les clones au fil du temps et des expériences (Figure 83), nous avons décidé d'arrêter d'étudier la différenciation myogénique avec ces clones.

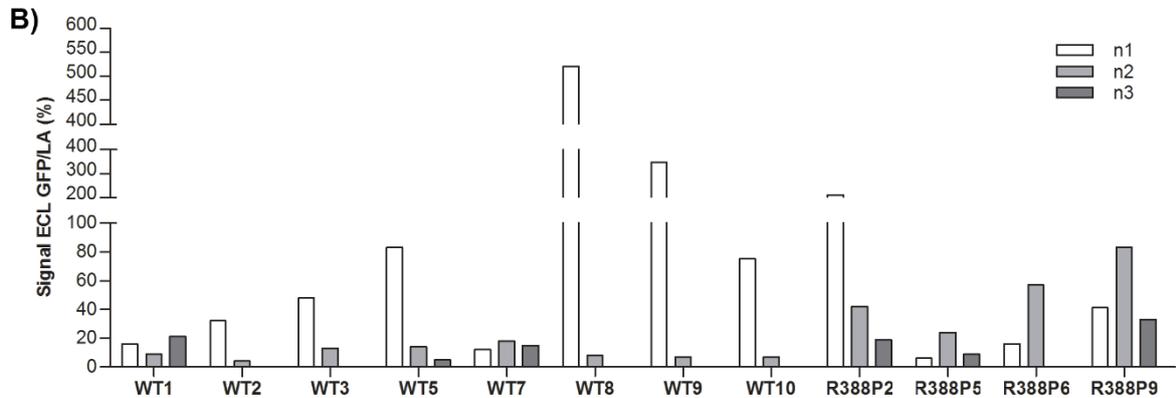
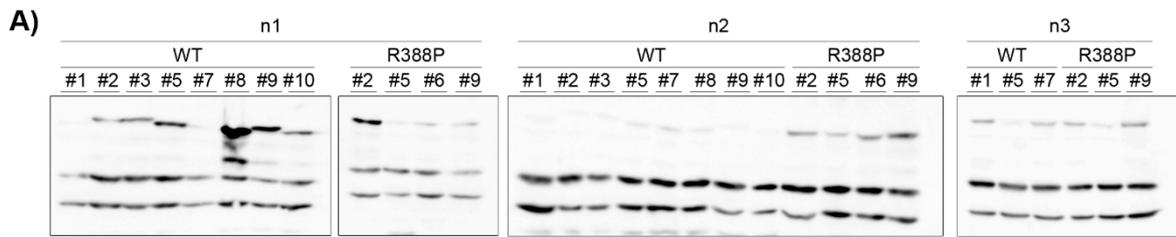


Figure 83 : Expressions variables des lamines ectopiques dans les clones stables.

Des extraits cellulaires totaux de clones à trois passages différents ont été analysés par western blot et révélés avec des anticorps anti-LA/C en **A)** **B)** Quantification des signaux ECL GFP-LA/LA endogène (%).

En alternative, pour éviter un processus de clonage long, nous avons pensé à transduire les C2C12 avec des lentivirus pour faire exprimer les lamines A ectopiques de manière efficace (90% de cellules transduites (Jackson et al. 2013)). Mais pour des raisons pratiques (laboratoire non équipé pour manipuler les lentivirus), nous avons dû laisser de côté cet aspect de mon projet de recherche.

Chapitre 10

**Impact de la lamine A mutée
R388P dans le modèle animal de
souris**

Chapitre 10 Impact de la lamine A mutée R388P dans le modèle animal de souris

Le fait qu'on ait observé les mêmes propriétés des lamines A R388P dans les cellules HeLa et les myoblastes C2C12 nous a confortées dans l'idée qu'un modèle *in vivo* murin pourrait être intéressant pour étudier l'impact de l'expression des lamines A R388P dans un organe comme le muscle. Grâce au financement de notre projet par l'AFM, nous avons eu la possibilité de faire produire des AAV par la plate-forme de Production de Vecteurs Viraux de l'Institut de Recherche Thérapeutique – IRT1, INSERM U 1089, à l'Université de Nantes, gratuitement. Nous avons alors décidé de produire des AAV à partir de nos vecteurs pCMV-FLAG-preLA-WT ou R388P et de les transduire dans des muscles de souris. Onnik Agbulut, à l'époque maître de conférences dans notre laboratoire, avait déjà utilisé des AAV afin de créer un modèle murin de myopathie myofibrillaire due à des mutations de la desmine, autre protéine de la famille des filaments intermédiaires. Avec son équipe, ils avaient alors montré que l'injection d'AAV dans le tibia antérieur de souris pour exprimer les desmines mutantes permettait de reproduire les agrégats protéiques, la diminution de la fonction contractile et les changements morphologiques observés chez les patients atteints de myopathie myofibrillaire (Joanne et al. 2013). Avec l'utilisation d'AAV de sérotype 2/2, ils avaient obtenus de bons résultats de transduction de leurs muscles, aussi, nous avons décidé nous aussi de choisir ce type d'AAV. Il est important de noter que le choix du tibia antérieur comme muscle à injecter a été fait pour des raisons pratiques. En effet, de par sa localisation et son volume, ce muscle est relativement facile à injecter. Pour ce projet, Sabrina Battonnet-Pichon maître de conférences de notre laboratoire, a accepté de collaborer avec nous ; elle a notamment pris en charge au temps zéro, la réalisation des injections à l'aide d'une seringue dans les muscles de souris et un mois plus tard, le sacrifice des souris et la récupération des muscles d'intérêt. La qualité de congélation des muscles a été améliorée grâce aux conseils d'Athanassia Sotiropoulos. Nathalie Vadrot, assistante ingénieur dans notre groupe, a ensuite effectué au cryomicrotome les coupes des muscles en sections transversales ou longitudinales et a contribué à l'immunomarquage des coupes de muscles.

I. Défaut de localisation subnucléaire de la protéine FLAG-LA R388P dans les fibres musculaires

Etant donné la localisation nucléoplasmique des protéines FLAG-LA R388P dans les cellules HeLa et dans les myoblastes C2C12, nous avons également voulu savoir si dans ce modèle *in vivo* les lamines R388P seraient encore nucléoplasmiques. La détection des lamines ectopiques a été réalisée par immunohistochimie après différentes conditions de fixation des muscles. Il s'est avéré que la congélation directement après dissection du muscle dans l'isopentane n'était pas adaptée à l'étude

des noyaux puisque ces derniers ne présentaient pas toujours un marquage périphérique des FLAG-LA WT intense en complément d'un marquage plus diffus dans le nucléoplasme (Figure 84). Nous avons alors testé un autre protocole, qui rajoutait une étape de préfixation des muscles en paraformaldéhyde (PFA) après leur dissection, suivie de leur immersion dans des solutions à concentration croissante de sucrose et enfin de leur congélation dans l'isopentane. Ce protocole qui a permis une meilleure préservation de l'intégrité des noyaux, a révélé la localisation nucléoplasmique des protéines FLAG-LA R388P dans les fibres musculaires transduites (Figure 84).

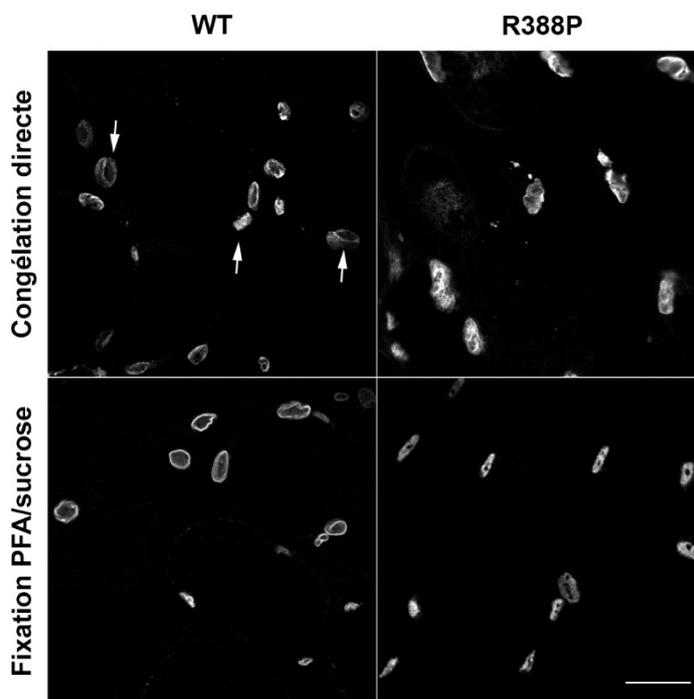


Figure 84 : Localisation nucléoplasmique des protéines FLAG-LA R388P dans le tibia antérieur de souris.

Des coupes de tibials antérieurs de souris transduites avec des AAV codant les lamines A WT ou R388P ont été analysés par immunofluorescence avec un anticorps anti-FLAG. Les muscles avaient été soit congelés directement après dissection, soit fixés en PFA et bain de sucrose successifs avant congélation. Les flèches blanches indiquent les noyaux ne présentant pas un marquage normal des FLAG-LA WT. Barre d'échelle 20 μ m.

II. Caractéristiques générales des muscles transduits

Pour étudier l'impact des protéines FLAG-LA R388P dans le muscle entier, nous avons d'abord vérifié que la transduction des AAV avait été suffisamment efficace. Ainsi, j'ai estimé le pourcentage de transduction des muscles après immunomarquage avec des anticorps anti-FLAG de coupes musculaires coupées en transversale. En moyenne, $67 \pm 8\%$ et $66 \pm 6\%$ des fibres musculaires sont transduites dans les muscles exprimant les lamines A WT et R388P, respectivement (Figure 85 B)). Notons que ce sont des régions par « bloc » qui sont transduites et non pas des fibres isolées, c'est-à-dire que dans une seule région du muscle toutes les fibres sont transduites (Figure 85 A)).

En un premier temps, l'impact des lamines ectopiques sur les souris a été évalué en mesurant le poids de l'animal et le poids du muscle transduit. Nous n'avons pas observé de différence significative entre les souris ayant reçu des injections d'AAV WT ou R388P concernant i) le poids de l'animal ($20 \pm 0,5$ g vs $21 \pm 0,5$ g), ii) le poids absolu des muscles prélevés (tibia antérieur) (31 ± 1 mg

vs 33 ± 1 mg), et iii) le poids relatif des muscles (rapporté au poids total de la souris) ($0,152 \pm 0,003\%$ vs $0,156 \pm 0,004\%$),

En un deuxième temps, nous avons comparé l'impact des lamines ectopiques WT vs mutantes sur la taille des fibres musculaires. Cela a nécessité de repérer le contour de chaque fibre musculaire à l'aide de l'immunomarquage des coupes musculaires transversales avec un anticorps dirigé contre le perlecan, protéoglycane de la matrice extracellulaire. Nous n'avons pas observé de différence significative entre les souris ayant reçu des injections d'AAV WT ou R388P concernant i) la taille moyenne d'une fibre (Min Feret de $34 \pm 1 \mu\text{m}$ vs $33 \pm 1 \mu\text{m}$), ii) le nombre de fibres par muscle (1490 ± 180 vs 1405 ± 146) et iii) la taille des muscles (estimée par la somme de la valeur de leurs diamètres (min Feret) $4,9 \pm 0,7$ cm pour les WT et $4,7 \pm 0,4$ cm pour les R388P) (Figure 85 C) à H)).

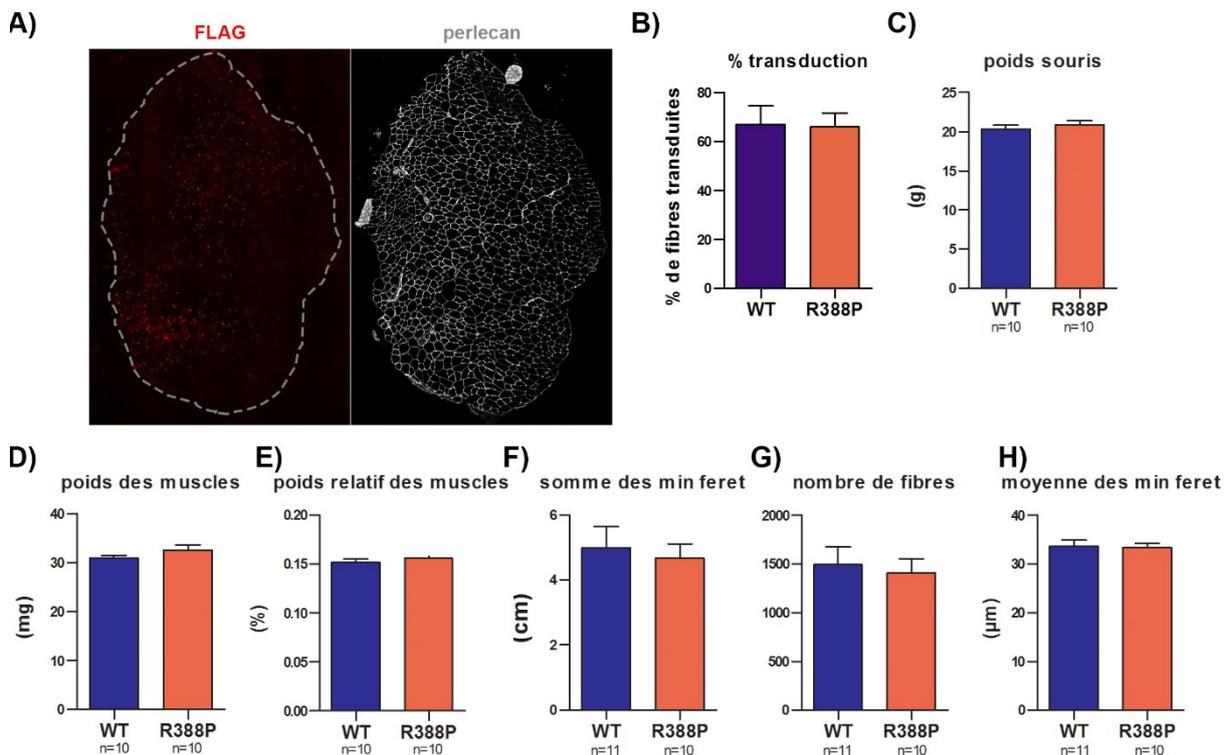


Figure 85 : Caractéristiques générales des muscles transduits 5 semaines après injection des AAV.

A) Exemple d'immunomarquage d'un muscle transduit réalisé avec un anticorps anti-FLAG. Barre d'échelle, $500 \mu\text{m}$. **B)** Pourcentage de transduction de tibials antérieurs estimés sur coupes transversales. **C)** Poids des souris. **D)** Poids des tibial antérieurs. **E)** Poids relatif des tibial antérieur par rapport au poids total de la souris. **F)** Somme des diamètres (min Feret) des fibres estimés sur des coupes transversales de muscles. **G)** Nombre de fibres estimé sur les coupes transversales de muscles. **H)** Moyenne des diamètres (min feret) des fibres estimé sur les coupes transversales de muscles. Test statistique de Mann-Whitney.

III. Inflammation et régénération des muscles exprimant les lamines A WT et R388P suite à l'injection des AAV

A. Régénération des fibres musculaires et inflammation des muscles

Dans un premier temps nous avons déterminé l'état général des muscles exprimant les FLAG-LA WT et R388P en colorant des coupes de muscles avec de l'hématoxyline/éosine. Ce colorant couramment utilisé en histologie colore les noyaux en bleu (hématoxyline), et le cytoplasme en rose (éosine) (Figure 86). Nous avons alors remarqué que les muscles transduits présentaient une inflammation, caractérisée par une infiltration de cellules avec une augmentation de l'espace entre les fibres musculaires, et un pourcentage de noyaux centraux étonnamment élevé. Cependant, le pourcentage de surface présentant une inflammation était similaire pour les muscles exprimant les protéines FLAG-LA WT et R388P ($5,4 \pm 1,5\%$ vs $5,1 \pm 1\%$) (Figure 86 C)). Il n'y a pas non plus de différence concernant le pourcentage de myofibres présentant des noyaux centraux ($5,8 \pm 2,5\%$ et $7,8 \pm 1,7\%$ pour les muscles exprimant les FLAG-LA WT et R388P respectivement) (Figure 86 D)). Comme nous l'avons vu en introduction, lors de la régénération musculaire des nouveaux noyaux sont incorporés aux fibres existantes et sont tout d'abord localisés au centre de la fibre avant d'être déplacés à la périphérie. Ainsi, la quantification des noyaux centraux est un indicateur de la régénération musculaire. Etant donné que nous n'avons pas de souris contrôles injectées avec des AAV codant uniquement l'étiquette FLAG, nous ne pouvons conclure sur l'origine de cette inflammation et de cette régénération, elles pourraient être dues à l'injection seule des AAV ou à l'expression des lamines ectopiques.

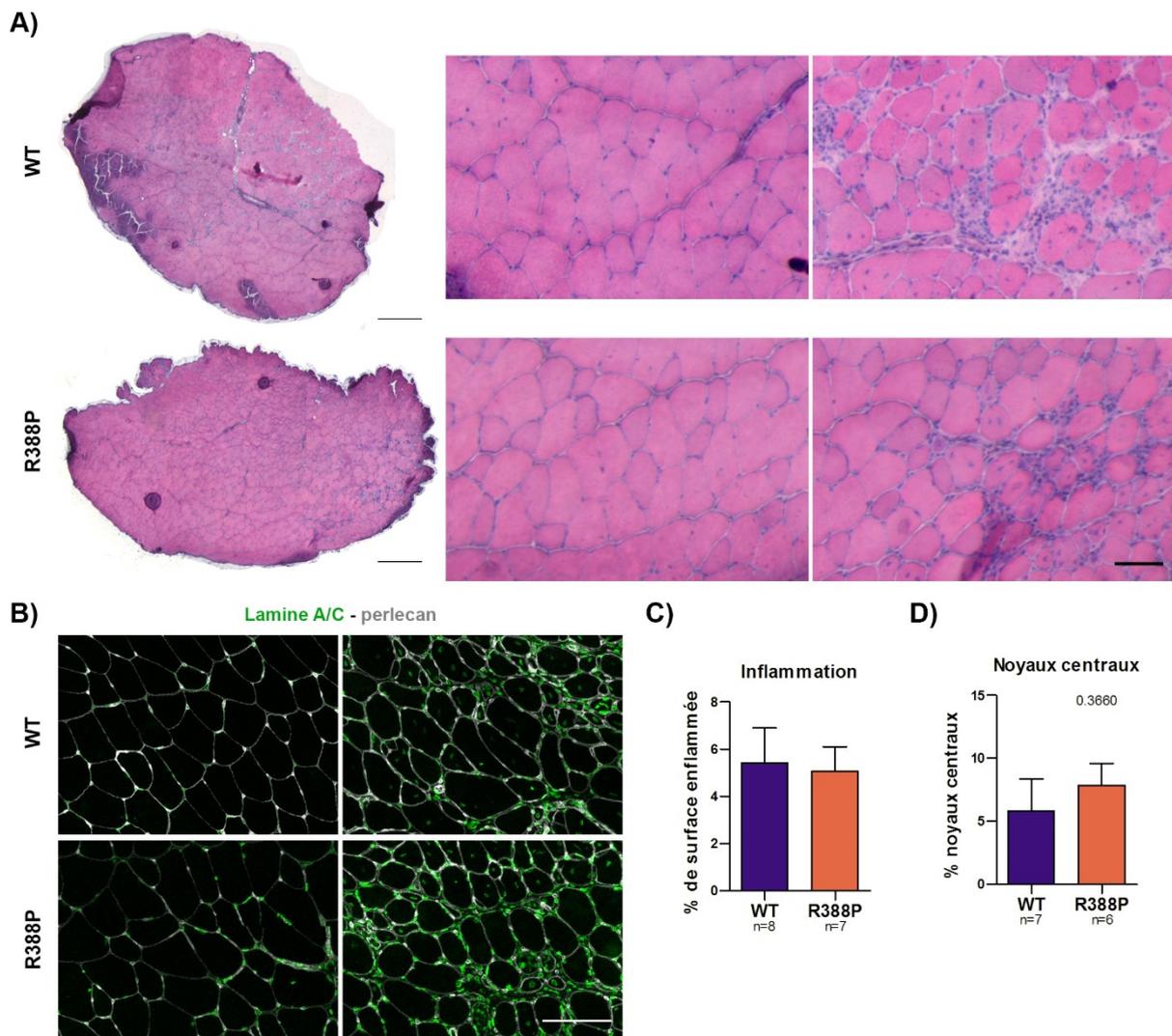


Figure 86 : Les muscles tibials antérieurs exprimant les protéines FLAG-LA R388P ne présentent pas de régénération anormale par rapport aux muscles exprimant les protéines FLAG-LA WT

Des muscles transduits avec les AAV codant les protéines FLAG-LA WT ou R388P ont été congelés. Des coupes de 6 μm d'épaisseur ont été faites de manière transversale et analysées après coloration à l'hématoxyline/éosine (A) ou par immunofluorescence avec des anticorps anti-LA/C et anti-perlecan (B). Barre d'échelle, 500 μm à gauche et 100 μm à droite. C) Pourcentage moyen de la surface des muscles présentant de l'inflammation. D) Pourcentage moyen de myofibres présentant des noyaux centraux.

B. Les muscles exprimant les lamines A R388P ne présentent pas de fibrose ou d'inclusion lipidique anormale par rapport aux muscles exprimant les lamines A WT

Nous avons voulu déterminer si l'inflammation des régions musculaires observée lors de l'expression de lamines A ectopiques s'accompagnait d'autres altérations telles que la fibrose ou la formation d'inclusions lipidiques.

La fibrose est caractérisée par une augmentation des protéines de la matrice extracellulaire, et donc de collagène. Aussi une méthode utilisée pour mettre en évidence de la fibrose en histochimie est l'utilisation de « Sirius Red » qui colore ces fibres de collagène de type 1 et 3. Les groupements acides sulfoniques du colorant se lient aux groupements basiques des différents types de fibres de collagène. Que ce soit dans les muscles exprimant les lamines A WT ou R388P, les zones présentant

de l'inflammation repérées par le marquage hématoxyline/éosine ne présentent pas d'intensité importante pour le marquage des fibres de collagène par le Sirius red (Figure 87).

La coloration au Oil red O permet de marquer les lipides en rouge. Nous avons adapté le protocole de Koopman et al. afin de combiner ce marquage à un marquage d'hématoxyline (Koopman et al. 2001) (voir Matériels et méthodes). Ce protocole nous a permis de mettre en évidence de très rares zones présentant des lipides dans les muscles au niveau des zones en régénération, cependant nous n'avons observé aucune différence entre les muscles exprimant les protéines FLAG-LA WT et R388P (Figure 87).

En conclusion, que ce soit dans les zones d'inflammation ou dans les autres régions des muscles (tibial antérieur) transduits exprimant les protéines FLAG-LA WT ou R388P, il n'y a ni fibrose anormale ni accumulation de lipides.

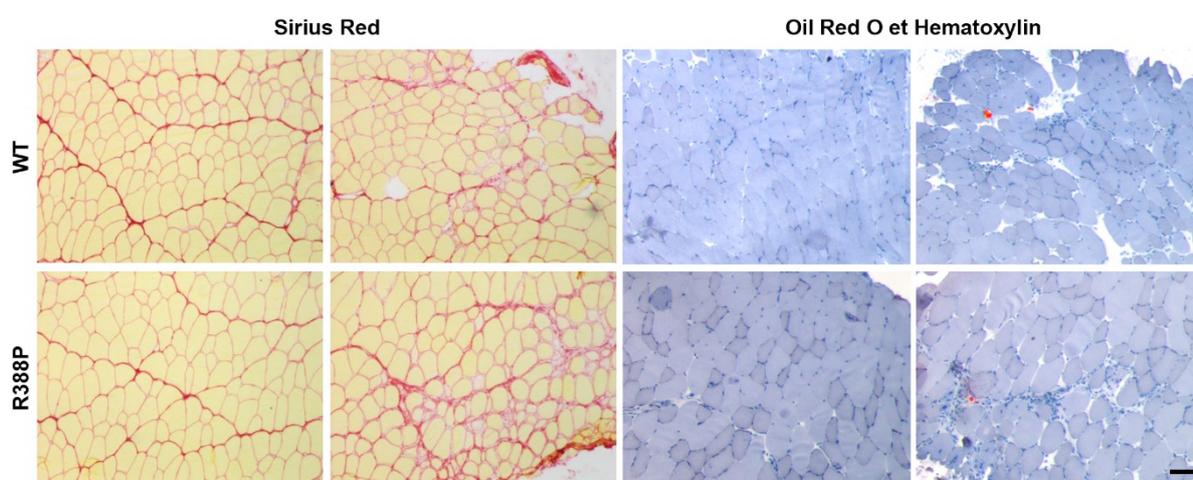


Figure 87 : Les muscles exprimant les lamines A R388P ne présentent pas de fibrose anormale par rapport aux muscles exprimant les lamines A WT

Des muscles transduits avec les AAV codant les lamines A WT ou R388P ont été congelés. Des coupes de 6 μ m d'épaisseur ont été faites de manière transversale et analysées après coloration au sirius red et au Oil Red O couplé à l'Hématoxyline. Barre d'échelle, 100 μ m.

Nous ne savons pas si les signes d'inflammation et de régénération des muscles transduits sont dus à une réaction immunitaire dirigée contre la capsid virale des AAV injectés ou à la surexpression des lamines A. Afin de répondre à cette question il faudrait étudier des muscles injectés avec des AAVs ne codant aucune protéine. Cet effet sur le muscle est à la fois un avantage et un inconvénient. En effet l'inconvénient, est que nous n'étudions pas des muscles dans leur condition physiologique habituelle, mais l'avantage qu'on pourrait en tirer serait justement l'étude de la régénération et de l'inflammation dans ces muscles.

IV. Analyse transcriptomique visant à déterminer des voies de signalisation éventuellement dérégulées par l'expression de lamine A R388P

La première partie de notre étude sur le modèle animal n'a pas révélé de phénotypes particuliers tels qu'une atrophie, une fibrose ou l'accumulation d'inclusions lipidiques dans les muscles transduits pour exprimer les protéines FLAG-LA R388P. Par la suite, tenant compte des résultats obtenus dans les cellules HeLa et les myoblastes C2C12 exprimant la lamine A mutée, nous nous sommes demandé si l'expression du génome pouvait être modifiée dans les muscles de souris transduits. Notre but était d'identifier des voies de signalisation éventuellement modifiées par l'expression des lamines A R388P. C'est pourquoi, j'ai réalisé des qPCR sur des ARNm extraits des muscles de souris transduits par nos AAV.

A. Choix des gènes à étudier

Afin de déterminer quels gènes analyser par qPCR, nous avons décidé d'utiliser les données de ChIP-Seq que nous avons réalisées dans les cellules HeLa exprimant les lamines A WT ou R388P. En effet, même s'il ne s'agit pas du même contexte (espèce différente (humain vs souris), type de cellule différent (épithéliale vs musculaire)), nous avons estimé que ces données pouvaient tout de même nous guider pour choisir des gènes qui seraient liés et donc régulés de manière distincte par les lamines A sauvages et mutées. Plus précisément, nous avons déterminé une liste de gènes en fonction i) des résultats que nous avons déjà obtenus dans les cellules HeLa, ii) du rôle des gènes tel que décrit dans la littérature et iii) de la pertinence de ces gènes dans le contexte musculaire (Tableau 4).

Gène	Protéine	lié par les FLAG-LA :	Fonction
FLAG-LA	FLAG-LA		Quantification de la lamine A ectopique
Csnk2a2	Caséine kinase 2 α 2	R388P	Gène de référence
18S	18S		Gène de référence
Myf5	myogenic factor 5	WT	Gène clef du muscle
Myog	Myogénine	R388P	Gène clef du muscle
Mef2D	myocyte enhancer factor 2D	R388P	Gène clef du muscle
Myh2	Myosine Heavy Chain IIA		Gène clef du muscle
Myh4	Myosine Heavy Chain IIB		Gène clef du muscle
Sreb1	SREBP1	R388P	Régulation de l'adipogenèse et de la myogenèse
Hdac1	Histone deacetylase 1	R388P	Organisation de la chromatine
Hdac9	Histone deacetylase 9	WT	Organisation de la chromatine et différenciation musculaire
Dtna	α -dystrobrevine	WT	Matrice extracellulaire et intégrité nucléaire
Ntn4	Netrine 4	R388P	Signalisation Notch
Hey1	hairly/enhancer-of-split related with YRPW motif 1	WT	Signalisation Notch et myogenèse
Heyl	hairly/enhancer-of-split related with YRPW motif-like	R388P	Signalisation Notch
Vim	Vimentin		Filament intermédiaire
Srf	Serum Response Factor		Gène clef du muscle
Col1a1	Collagène de type I	R388P	Matrice extracellulaire

Col6a1	Collagène de type VI	R388P	Matrice extracellulaire
Col6a2	Collagène de type VI	R388P	Matrice extracellulaire
Lmna	Lamine A/C	R388P	

Tableau 4 : Gènes analysés par qPCR dans les muscles de souris.

Liste des gènes analysés avec le nom de la protéine codée et la fonction associée nous intéressant. Il est indiqué si ces gènes font partis de ceux liés aux FLAG-LA WT ou R388P dans l'analyse de CHIP-seq dans les cellules HeLa.

Nous avons ainsi sélectionné des gènes clefs du muscle liés spécifiquement aux lamines A WT ou R388P, tels que *Myf5*, *Mef2d* et *Myog*. Notons de plus que le gène *Myog* est une cible spécifique du muscle de SREBP1 (Lecomte et al. 2010). Mais nous avons également choisi les gènes *Srf*, *Myh2* (code MyHC IIA) et *Myh4* (code MyHC IIB), qui ne sont pas liés par les lamines dans nos expériences de CHIP-Seq sur cellules HeLa, mais qui jouent un rôle important dans le muscle.

Du fait de son rôle à la fois dans le tissu adipeux et le tissu musculaire et de la pathologie mixte de la patiente, nous avons également décidé d'étudier la transcription du gène *Sreb1* codant SREBP1, qui est lié spécifiquement aux lamines mutées (FLAG-LA R388P) d'après les expériences de CHIP-Seq réalisées dans les cellules HeLa.

Nous nous sommes également intéressés à deux gènes codant des désacétylases d'histone, *Hdac1* et *Hdac9*. *Hdac9* semble particulièrement intéressante puisqu'elle est une cible muscle-spécifique de SREBP1 (Lecomte et al. 2010) et qu'elle est régulée par MEF2 au cours de la différenciation musculaire (Haberland et al. 2007).

Trois gènes en lien avec la voie de signalisation Notch ont été sélectionnés, les gènes *Hey1*, *HeyL* et *Ntn4*. *Hey1*, qui se lie spécifiquement aux lamines sauvages (dans les cellules HeLa), est un facteur de transcription recruté dans les régions des promoteurs de la myogénine et de *Mef2c*. De plus, son expression dans les C2C12 corrèle avec une diminution du recrutement de *MyoD* au niveau de ces promoteurs. Ainsi *Hey1* semble inhiber la myogenèse en s'associant avec les cibles myogéniques (Buas et al. 2010). *HeyL*, qui se lie spécifiquement aux lamines A R388P (dans les cellules HeLa), est également une cible de la signalisation Notch. L'utilisation de shARN dirigé contre *HeyL* inhibe la différenciation de myoblastes C2C12 (l'index de fusion passant de 48 à 17%) (Rajan et al. 2012). Le dernier gène de cette catégorie est *Ntn4*, qui se lie spécifiquement aux lamines A R388P (dans les cellules HeLa). La nétrine 4, codée par *Ntn4*, est un composant de la membrane basale et son transcrit est réduit de 8,7 fois dans les myoblastes néonataux de souris *LAP2 α ^{-/-}* (Gotic et al. 2010).

Le gène *Dtna*, codant l' α -dystrobrevine, un composant du complexe protéique associé à la dystrophine, a également été sélectionné car lui aussi est une cible muscle-spécifique de SREBP1 (Lecomte et al. 2010), et que son extinction (knock down) dans des myoblastes C2C12 a altéré la localisation des lamines A/C, B1 et B2 et a causé des défauts de morphologie nucléaire (Aguilar et al. 2015). De plus les lamines A WT, mais pas les lamines A R388P, se lient au gène *Dtna* d'après les expériences de CHIP-Seq (dans les cellules HeLa). Nous avons également sélectionné d'autres gènes codant des protéines de la matrice extracellulaire, il s'agit des collagènes I et VI (*Col1a1*, *Col6a1*, *Col6a2* et *Col6a3*) qui sont tous liés spécifiquement aux lamines A R388P (dans les cellules HeLa). Or, des mutations dans les gènes codant les collagènes VI sont responsables de dystrophie musculaire.

Le gène *Lmna*, codant les lamines A/C, est lui aussi lié spécifiquement aux protéines FLAG-LA R388P dans les cellules HeLa. Il nous est donc apparu naturellement intéressant de l'inclure dans la liste de gènes à étudier.

En complément de tous ces gènes, il a fallu choisir un gène de référence, nous avons choisi le 18S et avons décidé de tester le gène *Csnk2a2* bien qu'il soit lié par les lamines A R88P dans les expériences de CHIP-Seq (dans les cellules HeLa).

De plus, nous avons essayé de créer des amorces spécifiques des lamines A ectopiques afin de déterminer le niveau d'expression des ARNm des AAV dans le muscle.

B. Analyse transcriptomique

Après avoir testé les couples d'amorces pour leur efficacité, nous avons réalisé des qPCR sur des extraits d'ARNm de 5 à 12 muscles WT et 5 à 11 muscles R388P. Notons que les différents couples d'amorces utilisés pour amplifier les ARNm de FLAG-LA n'étaient pas spécifiques dans le contexte des muscles de souris. Ainsi, nous n'avons pas pu comparer l'expression des ARNm de FLAG-LA spécifiquement pour les muscles exprimant les lamines A WT et R388P. Les amorces dirigées contre les lamines A/C, nous ont cependant permis de déterminer qu'il n'y avait pas de différence d'expression globale des ARNm des lamines A/C endogènes et ectopiques confondues, entre les muscles exprimant les protéines FLAG-LA WT et R388P.

Les ARNm des gènes *Col1a1*, *Col6a1*, *Col6a2*, *Myog*, *Hdac1*, *Myh4*, *Myf5*, *Mef2d*, *Hey1*, et *Srf* semblent exprimés à des niveaux similaires entre les muscles exprimant les lamines A WT et R388P (Figure 88 C)). Certains gènes ont une différence d'expression de leur ARNm non significative mais qui pourrait représenter une tendance. En effet, on observe une diminution de l'expression des ARNm entre les muscles exprimant les lamines A WT et R388P de 53% ($0,85 \pm 0,14$ vs $0,40 \pm 0,08$) pour *Hdac9*, 57% ($1,7 \pm 0,54$ vs $0,75 \pm 0,35$) pour *Hey1*, 38% ($1,06 \pm 0,15$ vs $0,65 \pm 0,18$) pour *Myh2*, 20% ($1,10 \pm 0,13$ vs $0,88 \pm 0,18$) pour *Csnk2a2* et de 39% ($1,50 \pm 0,30$ vs $0,91 \pm 0,12$) pour *Ntn4* (Figure 88 B)). Enfin, pour deux des gènes étudiés nous observons une diminution significative de l'expression de leurs ARNm entre les muscles exprimant les lamines A WT et R388P. Il s'agit du gène *Dtna* pour lequel on observe une diminution de 50% ($1,21 \pm 0,20$ vs $0,60 \pm 0,80$) et du gène *Sreb1* pour lequel on observe une diminution de 35% ($1,15 \pm 0,17$ vs $0,74 \pm 0,17$) (Figure 88 A)).

Ainsi, on observe spécifiquement dans les muscles des souris exprimant les lamines A mutées (FLAG-LA R388P) une diminution de l'expression des ARNm de *Dtna* et *Sreb1* et une tendance à une diminution de l'expression des ARNm de *Myh2* codant les MHC IIA. Etant donné que *Dtna* et *Myh2* sont des gènes cibles des facteurs de transcription BHLHB2/3 (Lecomte et al. 2010), lesquels sont des gènes régulés par SREBP1, nous nous sommes demandé si la sous expression de *Dtna* et *Myh2* était régulé par *Sreb1* indirectement, i.e. via BHLHB2/3. Cependant, nous n'avons pas vu de différence dans l'expression des ARNm de *BHLHB2* dans les muscles transduits et exprimant la lamine A mutée vs lamine WT (Figure 88 D). Considérant le fait que *Dtna* et *Myh2* sont aussi des cibles directes de SREBP1, on peut imaginer que la sous-expression de *Sreb1* soit directement responsable de la diminution de l'expression de *Dtna* et *Myh2*.

En conclusion, notre analyse a révélé l'impact de la lamine A mutée R388P sur l'expression du génome, et notamment sur l'expression de quelques gènes connus pour avoir un rôle pertinent dans le contexte musculaire.

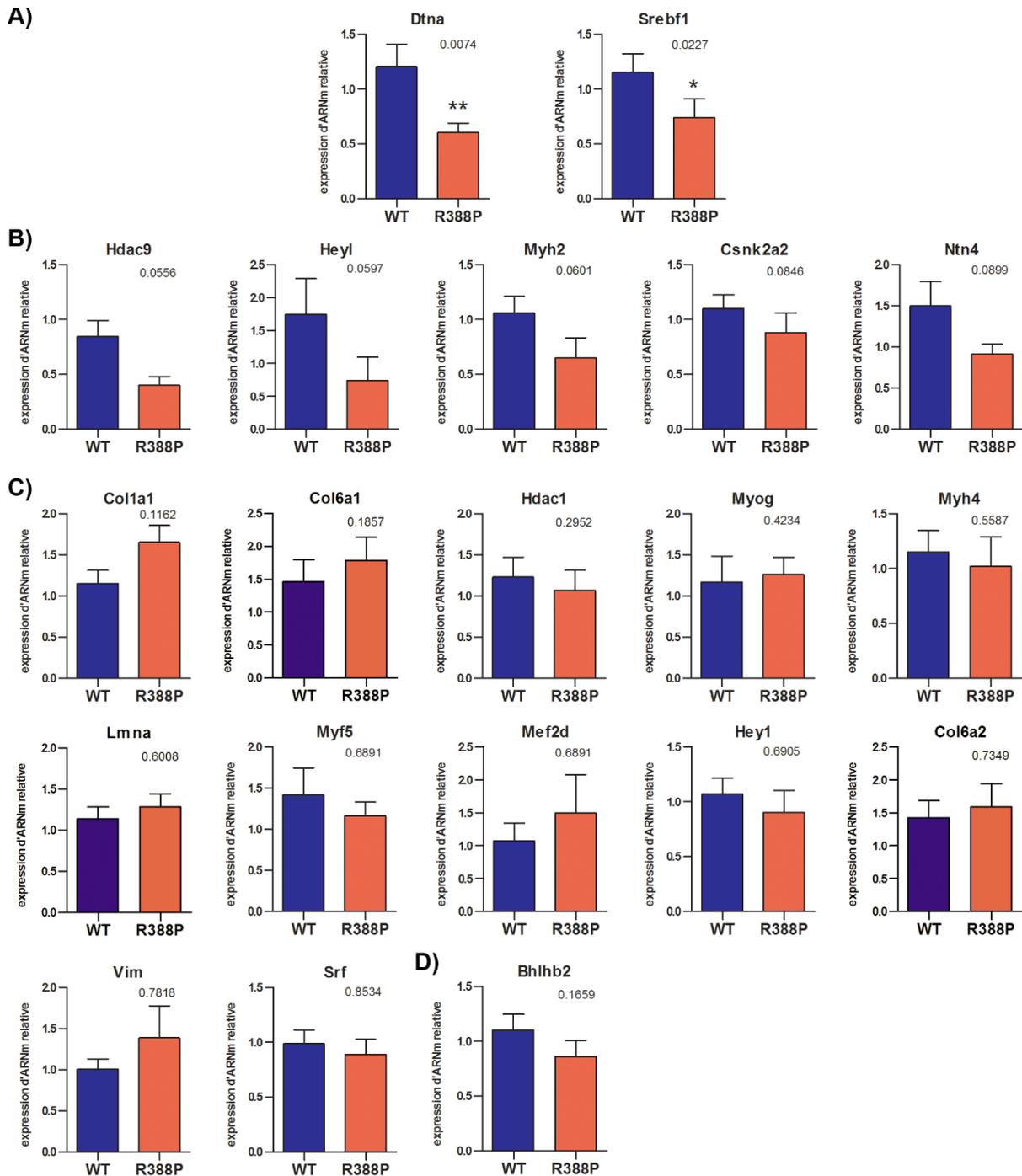


Figure 88 : Analyse transcriptomique de muscles transduits par des AAV afin d'exprimer les lamines A WT et R388P
 Expression relatives des ARNm de différents gènes par rapport au 18S. WT : n = 12 (sauf pour Hdac9 avec n = 5), R388P : n = 11 (sauf pour Hdac9 avec n = 5 et MyH2 avec n = 10). Test statistique de Mann-Whitney. Les gènes sont indiqués par ordre croissant des p-values (indiquées sur le graphique), avec en **A)** les gènes avec une différence significative d'expression relative de leur ARNm entre les muscles exprimant les protéines FLAG-LA WT et les muscles exprimant les protéines FLAG-LA R388P ; en **B)** les gènes avec une p-value supérieure à 0,05 et inférieure à 0,1 et en **C)** les gènes avec une p-value supérieure à 0,1. **D)** Expression de l'ARNm de Bhlhb2.

V. Changement de typage des fibres de muscles exprimant les lamines A R388P

A. Diminution du pourcentage des fibres de type IIA dans les muscles tibials antérieurs exprimant les protéines FLAG-LA R388P

Nous avons vu une diminution de l'expression d'ARNm de *Myh2* (MHC IIA) dans les muscles exprimant les protéines FLAG-LA R388P. Cela pourrait suggérer qu'il y ait une modification dans l'expression des isoformes de MHC et donc un changement dans le typage des fibres musculaires en réponse à l'expression des lamines A R388P. Pour étudier le typage des fibres musculaires, nous avons utilisé des anticorps anti myosine spécifiques des sous types de cette dernière. Des coupes transversales de muscles exprimant les protéines FLAG-LA WT et R388P ont ainsi été immunomarquées avec des anticorps anti-MyHC (*myosine heavy chain*) I, IIA, IIB et IIX. C'est grâce à notre collaboration avec Onnik Agbulut que nous avons été en mesure de réaliser ces marquages et les analyser plus efficacement puisqu'il nous a fourni un plug in image J permettant de détecter le contour de la majorité des fibres musculaires à partir d'un marquage périphérique (perlecan). Après avoir mesuré l'intensité moyenne des signaux MHC dans les fibres et déterminé des seuils de positivité, j'ai donc quantifié les pourcentages de fibres positives pour chaque immunomarquage MyHC.

Comme attendu dans le tibial antérieur, une très faible minorité de fibres sont positives pour MyHC I, les muscles exprimant les protéines FLAG-LA WT et R388P sont composés respectivement de $0,33 \pm 0,11\%$ et $0,49 \pm 0,08\%$ de fibres MyHC I positives dans une coupe transversale entière (Figure 89 B)).

Nous avons mis en évidence une différence du pourcentage de fibres positives pour MyHC IIA, avec $44 \pm 3\%$ et $32 \pm 2\%$ respectivement pour les muscles exprimant les lamines A WT et R388P (Figure 89 C)). On observe des variations d'intensité de marquage, et théoriquement on devrait pouvoir différencier les fibres faiblement positives des fibres fortement positives qui correspondraient respectivement aux fibres IIA (hybrides entre IIA et IIX), et les fibres IIA. Cependant, déterminer un seuil pour distinguer ces deux catégories faible/fort s'est avéré impossible, et la difficulté a été la même lors de l'analyse des autres marqueurs décrits ci-dessous.

Les muscles exprimant les protéines FLAG-LA WT ont $55 \pm 3\%$ de leurs fibres positives pour MyHC IIX, pourcentage qui augmente de manière non statistiquement significative à $64 \pm 4\%$ pour les muscles exprimant les protéines FLAG-LA R388P (Figure 89 D)). De la même manière, on observe une augmentation non statistiquement significative du pourcentage de fibres positives pour MyHC IIB dans les muscles exprimant les protéines FLAG-LA R388P (de $54 \pm 4\%$ à $60 \pm 5\%$) (Figure 89 E)).

En conclusion, les muscles exprimant les lamines A mutées (FLAG-LA R388P) ont donc un changement relatif de typage des fibres par rapport à ceux exprimant les lamines A sauvages (FLAG-LA WT), qui est principalement révélé par la diminution du pourcentage des fibres MHC IIA positives, laquelle corrèle avec la sous-régulation du gène *MyH2* (voir ci-dessus).

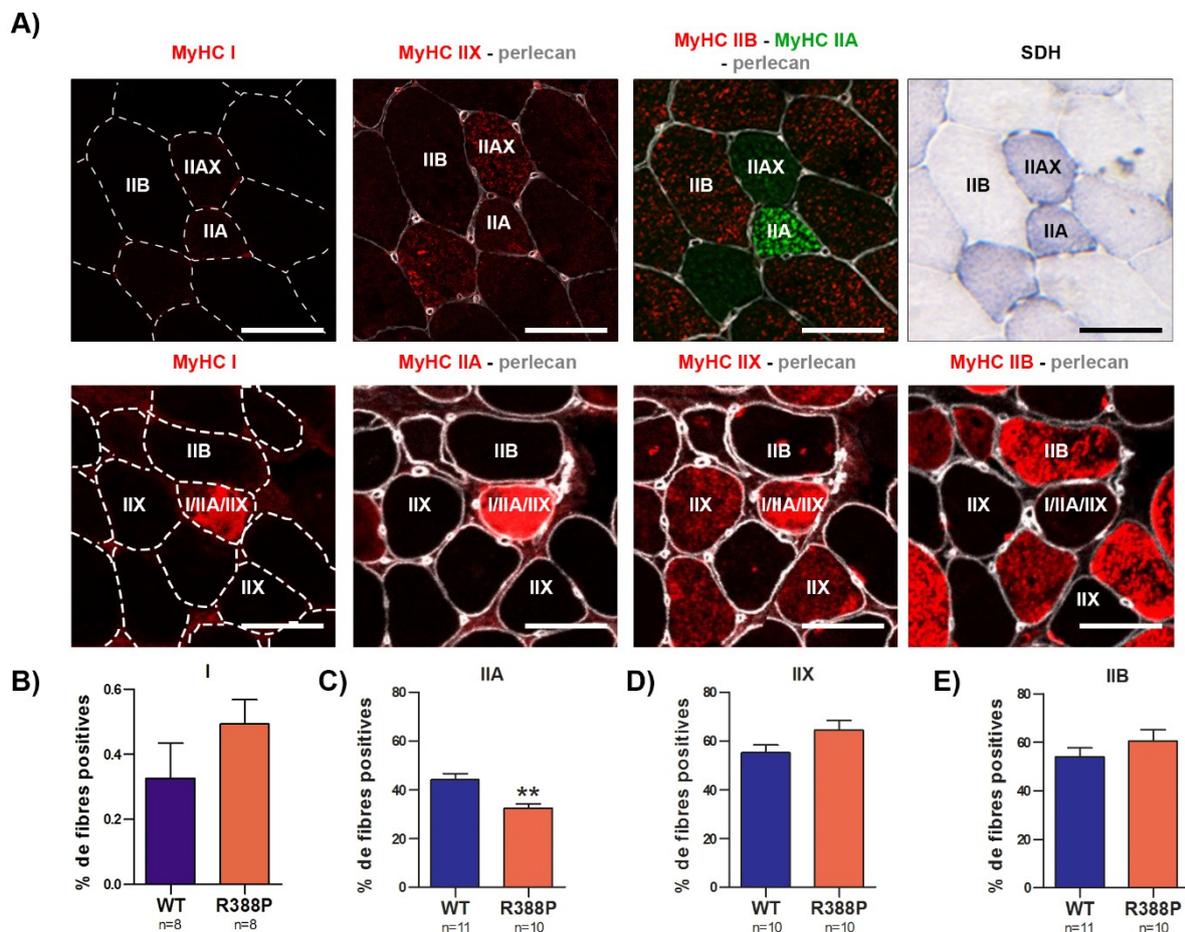


Figure 89 : Changement de typage des fibres de muscles tibials antérieurs exprimant les lamines A R388P.

A) Deux exemples d'immunomarquages réalisés sur des coupes transversales successives avec les anticorps anti-MyHC I, IIA, IIX et IIB. Barre d'échelle, 50 μ m. Pourcentage de fibres positives au marquage réalisé avec les anticorps anti-MyCH I (**B**), anti-MyHC IIA (**C**), anti-MyCH IIX (**D**) et anti-MyHC IIB (**E**). Test statistique de Mann-Whitney.

B. Diminution du nombre de fibres oxydatives dans les muscles exprimant les lamines A R388P

Etant donné que les muscles exprimant les FLAG-LA R388P ont une diminution du nombre de fibres IIA/IIAX, nous avons voulu déterminer si ce changement de typage était corrélé au niveau métabolique. Pour cela nous avons incubé des coupes de muscles avec un substrat spécifique de la succinate déshydrogénase (SDH), l'enzyme formant le complexe II de la chaîne respiratoire qui a la particularité d'intervenir également dans le cycle de Krebs. Ce marquage de l'activité mitochondriale de la SDH permet de différencier trois types de fibres, les non oxydatives, les oxydatives intermédiaires et enfin les oxydatives fortes (Figure 90 A)). J'ai mesuré l'intensité moyenne du signal SDH dans les fibres de 10 muscles exprimant les protéines FLAG-LA WT et de 10 muscles exprimant les protéines FLAG-LA R388P, puis j'ai déterminé des seuils pour classer les fibres dans les différentes catégories. Les muscles exprimant les protéines FLAG-LA WT ont en moyenne $23 \pm 2\%$, $45 \pm 3\%$ et $32 \pm 3\%$ de leurs fibres respectivement non oxydatives, oxydatives intermédiaires et fortement oxydatives (Figure 90 B)). Les muscles exprimant les protéines FLAG-LA R388P ont eux, $30 \pm 2\%$, $42 \pm 3\%$ et $29 \pm 3\%$ de leurs fibres respectivement non oxydatives, oxydatives intermédiaires et fortement oxydatives (Figure 90 B)). Ces différences sont significatives pour les fibres non oxydatives, et se

répercutent sur le pourcentage des fibres oxydatives intermédiaires ou fortement oxydatives par une légère diminution.

Ces résultats sont cohérents avec le changement de typage MyHC observé précédemment.

Globalement, l'analyse par immunohistochimie montre que les muscles exprimant les lamines A mutées (FLAG-LA R388P) ont donc une augmentation des fibres non oxydatives ou faiblement oxydatives (IIB/IIX) et une diminution des fibres oxydatives (IIA).

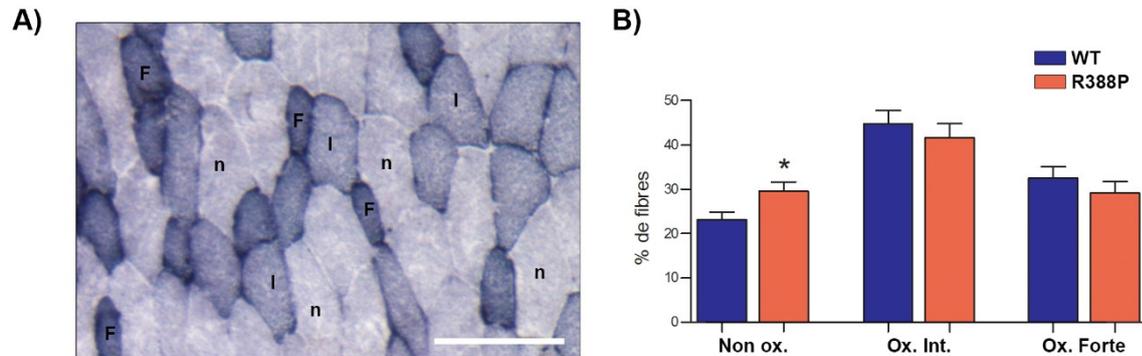


Figure 90 : Diminution du nombre de fibres oxydatives dans les muscles tibiaux antérieurs exprimant les lamines A R388P
A) Exemple d'un marquage SDH sur une coupe transversale de muscle. On distingue trois catégories de fibres : non oxydatives (n), oxydatives intermédiaires (I) et oxydatives fortes (F). Barre d'échelle, 100 μ m. **B)** Graphique représentant le pourcentage de fibres dans chaque catégorie du marquage SDH dans 10 muscles exprimant les protéines FLAG-LA WT et 10 muscles exprimant les protéines FLAG-LA R388P. Les données pour les fibres non oxydatives suivent une loi normale, un t-test a été fait pour l'analyse statistique. Pour les autres classes, des tests statistiques de Mann Whitney ont été réalisés.

C. Expression similaire de certains gènes impliqués dans le typage de fibres

Les muscles exprimant les protéines FLAG-LA R388P présentant un typage différent des muscles exprimant les protéines FLAG-LA WT, nous avons voulu déterminer quelles voies pouvaient être impliquées. Deux hypothèses sont envisageables, (1) soit, la surexpression de lamines A WT entraînerait une augmentation du nombre de fibres oxydatives par rapport à des souris contrôles et les lamines R388P auraient une perte de cette fonction, (2) soit, la mutation R388P de la lamine A est responsable d'un changement de typage des fibres oxydatives à glycolytiques. Il a été montré dans des souris délétées pour *Tbx15* codant le facteur de transcription mésodermale T-Box 15, qu'elles présentaient dans différents muscles, une diminution du nombre de fibres glycolytiques (type IIX/B) via l'activation de la signalisation d'AMPK et la diminution de l'expression d'*Igf2* (K. Y. Lee et al. 2015). A l'inverse, la surexpression du complexe transcriptionnel composé de *Eya1* et *Six1* a induit la reprogrammation des myofibres de type I et IIA (oxydatives) en myofibres IIB (glycolytiques) et IIX (intermédiaires) dans le muscle soleus des souris, via la régulation de gènes impliqués dans le métabolisme (aldolase A, enolase β) et la contraction des muscles (MHC IIB, MHC IIX...) (Grifone et al. 2004). Aussi nous avons décidé de réaliser des qPCR pour quantifier l'expression de ces gènes dans nos muscles de tibia antérieurs transduits. Nous n'avons pour l'instant pu quantifier que l'expression des ARNm de *Tbx15* et *Eya1* pour lesquels nous n'avons pas observé de différences significatives entre les muscles exprimant les FLAG-LA WT et R388P (Figure 91). Il serait également intéressant de faire des qPCR sur le gène *Six1*, en complément d'*Eya1* car même si nous n'avons pas vu de

différence significative entre les muscles exprimant les lamines WT et R388P, il pourrait y avoir une légère tendance avec une augmentation de l'expression d'*Eya1*.

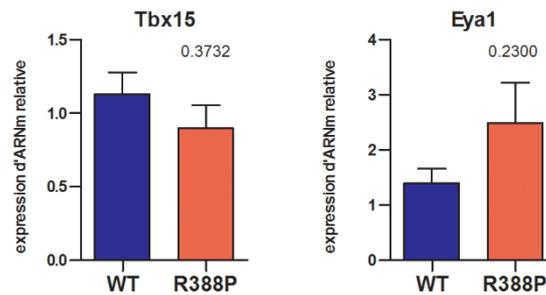


Figure 91 : Expression similaire des ARNm de *Tbx15* et *Eya1* dans les muscles exprimant les protéines FLAG-LA WT et R388P

Expression relative des ARNm de *Tbx15* et *Eya1* par rapport au 18S. WT : n = 12, R388P : n = 11. Test statistique de Mann-Whitney.

VI. Force musculaire

Pour déterminer l'impact fonctionnel de l'expression des lamines A ectopiques sur le muscle de souris, il aurait été intéressant de mesurer la force musculaire des muscles transduits par les AAV. Grâce à notre collaboration avec Onnik Agbulut nous avons été mis en contact avec le professeur Arnaud Ferry qui réalise justement des mesures de force musculaire maximale. Nous avons alors testé dès notre première expérience la force des muscles transduits. Il s'est avéré que ni le poids des muscles ni la force maximale générée par les muscles exprimant les lamines A WT et R388P n'étaient différents. Cependant, lors de cette première expérience nous n'avions eu qu'un faible taux de transduction (<25%). Aussi il aurait été intéressant de refaire ces mesures une fois que nous avons amélioré nos conditions de transduction. Mais cela n'a pas pu se faire pour des raisons techniques (limite de la quantité disponible des AAV) et budgétaires (Arnaud Ferry a récemment élargi son activité de mesure de force musculaire chez la souris en développant une plateforme où les prestations sont payantes).

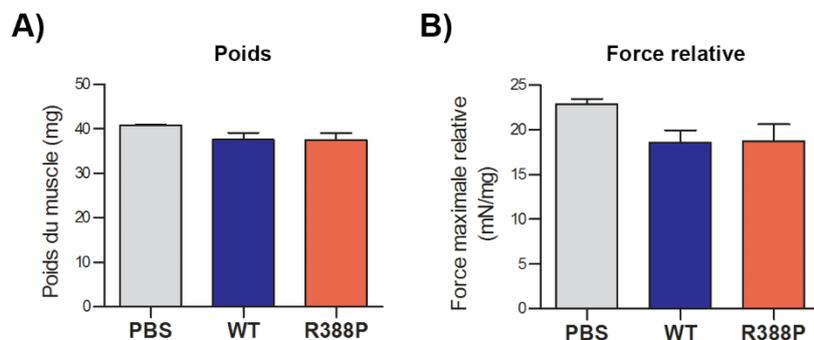


Figure 92 : Mesure de force maximale de muscles transduits par des AAV permettant l'expression des lamines A WT ou R388P.

n = 2 souris ayant reçu du PBS, n = 7 souris injectées avec des AAV-WT et n = 9 souris injectées avec des AAV-R388P.

Bilan général des expériences

Lamines A R388P

Propriétés intrinsèques ?	Impact sur le cycle cellulaire ?	Impact sur l'intégrité du noyau ?	Impact sur l'organisation de la chromatine ?	Impact sur l'organisation d'un muscle entier ?
Nucléoplasmiques HeLa ¹ / C2C12 ² / souris ³	Sénescence prématurée Fibroblastes ²	Défauts de localisation de partenaires HeLa / C2C12 ² / Fibroblastes	Expression de marqueurs épigénétiques altérée HeLa / C2C12 ² / Fibroblastes	Changement de typage des fibres Souris ³
Assemblées différemment : réseau en nid d'abeille Fibroblastes ²	Etude de la différenciation myogénique non exploitable Clones stables C2C12	Partenaires plus solubles C2C12 ²	Distribution de la chromatine modifiée C2C12 ²	Expression de gènes modifiée Souris ³
Plus dynamiques HeLa ¹		Niveau d'expression de partenaires altéré HeLa	Identité des domaines du génome associé aux lamines A (LADs) changée HeLa ¹	
Plus solubles HeLa ¹ / C2C12 ²		Dysmorphies nucléaires sévères HeLa / C2C12 ²		



Comment rétablir la forme des noyaux ?

- Non dépendant de du processus de maturation des lamines A
- Destruction du cytosquelette (actine, microtubules) induite par des drogues : sans effet
- Modification de la condensation de la chromatine induite par des drogues : sans effet

C2C12²

1 : article soumis à Genome Research
2 : article soumis à Journal of Cell Science
3 : article en préparation pour Cells

Chapitre 11

Discussion

Chapitre 11 Discussion

I. Importance de la conservation de l'arginine 388 des lamines A/C d'un point de vue clinique

La mutation des lamines A/C de la patiente HER Lo est intéressante pour plusieurs raisons. Tout d'abord, d'un point de vue phylogénique, il se trouve que l'acide aminé en position 388 est fortement conservé entre les espèces. En effet, un alignement des séquences protéiques dans un panel d'organismes allant du macaque au poisson zèbre ne montre aucune modification de cet acide aminé (Figure 93). La conservation de cet acide aminé suggère un rôle important pour l'arginine en position 388 des lamines A/C. A ce jour, la mutation de cet acide aminé a été identifiée chez trois patients comme responsable de différentes pathologies (www.umd.be).

Organisme	Séquence	370	380	388	390	400	410	420
Homme	DMEIHAYRKLLEGEERLR LSPSP T SQR SRGRASSHSSQT QGGGSVTKKRK			↓				
Souris	DMEIHAYRKLLEGEERLR LSPSP T SQR SRGRASSHSSQS QGGGSVTKKRK						S	
Rat	DMEIHAYRKLLEGEERLR LSPSP T SQR SRGRASSHSSQS QGGGSVTKKRK						S	
Xénope	DMEI NAYRKLLEGEERLR LSPSP NT QKRSART IASHS GAHSSS ASKRRR	N				N	T	Q
Poisson zèbre	DMEI S AYRKLLEGEERLR LSPSP PP ARGVT VTRSS GSGSH TKKRK	S				P	P	A
Macaque rhesus	DMEIHAYRKLLEGEERLR LSPSP T SQR SRGRASSHSSQT QGGGSVTKKRK							
Chien	DMEIHAYRKLLEGEERLR LSPSP T SQR SRGRASSHSSQT QGTGS I TKKRK						T	G
Bovin	DMEIHAYRKLLEGEERLR LSPSP T SQR SRGRASSHSSQT QSGS SVTKKRK						S	G
Sanglier	DMEIHAYRKLLEGEERLR LSPSP T SQR SRGRASSHSSQT QSGGSVTKKRK						S	G

Figure 93 : Alignement des séquences protéiques dans différentes espèces.

Les acides aminés surlignés en jaune ne correspondent pas à la séquence humaine, les zones à fond vert correspondent à des sauts dans les séquences par rapport à la séquence humaine. Homme (*Homo sapiens*), Souris (*Mus musculus*), Rat (*Rattus norvegicus*), Xénope (*Xenopus laevis*), Poisson zèbre (*Danio rerio*), Macaque rhesus (*Macaca mulatta*), Chien (*Canis lupus familiaris*), Bovin (*Bos taurus*), Sanglier (*Sus scrofa*)

Tout comme la mutation R388P, la mutation p.Arg388Cys, abrégée en R388C, a aussi été associée à une dystrophie musculaire congénitale (Benedetti et al. 2007). En revanche, la mutation p.Arg388His, abrégée en R388H, a été associée, soit à une cardiomyopathie dilatée soit à aucun symptôme (Parks et al. 2008). En conclusion, le fait que diverses mutations de la lamine A pour l'acide aminé en position 388 induisent des pathologies, confirme l'importance que doit jouer cette arginine pour que la lamine A soit pleinement fonctionnelle, en particulier dans les tissus musculaires striés squelettiques ou cardiaques (voir ci-dessous).

II. Les fibroblastes de la patiente présentent des phénotypes préalablement associés à des laminopathies

Les caractéristiques phénotypiques observées dans les fibroblastes de la patiente porteuse de la mutation p.R388P du gène *LMNA* ont également été reportées dans des fibroblastes de patients atteints de lipodystrophie, de dystrophie musculaire ou de syndrome de vieillissement prématuré (Vigouroux et al. 2001; Novelli et al. 2002; Muchir et al. 2004; Caron et al. 2007; Taimen et al. 2009; Verstraeten et al. 2009; Gordon et al. 2012). Ces phénotypes concernent la désorganisation de la lamina nucléaire avec un aspect en nid d'abeille, la déplétion localisée de lamine B1 et/ou l'entrée en sénescence prématurément. A l'inverse, alors que les dysmorphies nucléaires sont couramment observées dans les fibroblastes de patients ayant une laminopathie (Vigouroux et al. 2001; Novelli et al. 2002; De Sandre-Giovannoli et al. 2003; Eriksson et al. 2003; Csoka et al. 2004; R. D. Goldman et al. 2004; Muchir et al. 2004), les noyaux des fibroblastes de la patiente HER Lo ne présentaient pas une fréquence élevée de dysmorphies comparés aux fibroblastes contrôles. Des dysmorphies nucléaires très sévères ont cependant été observées lors de surexpression des lamines A R388P dans des myoblastes. Les fibroblastes de peau de la patiente ne présentent pas non plus une localisation exclusivement nucléoplasmique des lamines A/C à l'inverse des cellules (HeLa ou C2C12) transfectées. Cependant, nous avons noté que le marquage périphérique des lamines A/C était plus diffus que dans les fibroblastes contrôles. Ces données suggèrent que les lamines A mutées R388P auraient des effets doses dépendants variant selon le type de cellules. Dans la mesure où nous ne pouvons mesurer le ratio de lamines A/C mutées par rapport aux lamines A/C sauvages dans les fibroblastes de la patiente, nous pouvons seulement supposer que dans ce type cellulaire précis, le niveau d'expression des lamines A R388P et/ou de partenaires spécifiques, ne permet pas la formation des dysmorphies nucléaires.

III. Les lamines A R388P ne s'assemblent pas en polymères

Dans les modèles cellulaires utilisés murins ou humains, nous avons observé des spécificités de localisation (exclusivement nucléoplasmique avec exclusion de l'enveloppe nucléaire), de solubilité (augmentation) et de dynamique (augmentée) de la lamine A R388P par rapport à la lamine A WT. En revanche, je n'ai pas mis en évidence des différences aussi drastiques des propriétés des lamines A/C WT/R388P dans les fibroblastes de la patiente portant la mutation hétérozygote *LMNA* p.R388P par rapport aux fibroblastes contrôles. Comme discuté plus haut, il est probable que dans nos modèles cellulaires, le rapport d'expression [LA R388P / LA WT] soit plus important que dans les fibroblastes de la patiente, et mette ainsi plus en avant les propriétés intrinsèques de la lamine A mutée.

Les propriétés spécifiques des lamines A R388P suggèrent un assemblage altéré des lamines en filaments intermédiaires, ce qui est cohérent avec la nature et la position de la mutation sur la protéine. En effet, la mutation R388P de la lamine A/C est localisée au niveau d'une région critique pour l'assemblage des dimères de lamines en polymères selon le modèle de Strelkov (Strelkov et al. 2004). Selon ce modèle, des attractions électrostatiques au niveau des régions de la queue et de la

tête des dimères de lamines seraient responsables de leur polymérisation (Figure 94). Ainsi en ayant une proline à la place de l'arginine en position 388, les charges de cette région sont changées, ce qui pourrait réduire l'attraction électrostatique entre deux dimères voisins. De plus, l'expression des lamines A R388P ne déstabilise pas ou peu le réseau de lamines A/C endogènes, ce qui suggère que les lamines A R388P ne formeraient pas ou peu d'hétéropolymères avec les lamines A WT endogènes. Il serait intéressant de réaliser l'analyse du contenu en dimères de lamines (endogènes vs ectopiques) dans les contextes WT ou R388P, par exemple en analysant les protéines par électrophorèse en gel d'acrylamide et western blots, en conditions non dénaturantes.

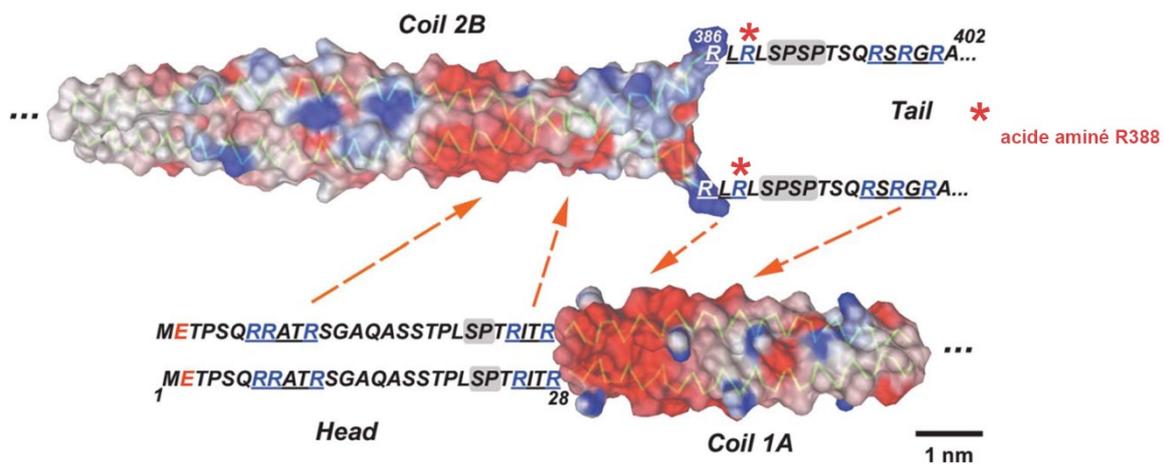


Figure 94 : Modèle d'assemblage des dimères de lamines en polymères.

Les segments du coiled-coil sont montrés en surface. Les séquences des acides aminés au début du domaine de la queue et du domaine de la tête sont indiquées. Les motifs de phosphorylation sont surlignés en gris et les clusters d'arginine sont soulignés. L'acide aminé R388 est indiqué avec un astérisque rouge. (Strelkov et al. 2004)

Une mutation localisée au niveau de ces régions importantes pour la polymérisation des dimères de lamine a également été identifiée comme responsable de dystrophie musculaire congénitale et d'EDMD, il s'agit de la délétion de la lysine en position 32 (D'Amico et al. 2005; Quijano-Roy et al. 2008). Par rapport au modèle de Strelkov, la lysine 32 est située sur la région d'un dimère s'associant à un autre dimère au niveau de la région contenant l'acide aminé R388. Il a été montré dans des fibroblastes de peau de souris *Lmna*^{ΔK32/ΔK32} que les lamines n'étaient plus localisées à la périphérie nucléaire, mais étaient uniquement nucléoplasmiques (Pilat et al. 2013). *In vitro*, il a été montré par microscopie électronique que les lamines humaines mutantes ΔK42 ne s'assemblaient pas en des structures bien organisées (Zwenger et al. 2013). Toujours *in vitro*, les lamines A/C ΔK46 de *C. elegans* (correspondant à la mutation ΔK32 chez l'homme) ne s'assemblent pas en filament de 10 nm d'épaisseur comme les WT, mais en des filaments d'épaisseur moyenne de 14 nm (Bank et al. 2011). Par des analyses de cryo-electron tomographie, il a été mis en évidence un décalage de 7 nm dans la position des domaines de la tête globulaire le long des protofilaments. Selon le modèle de Bank et de ses collaborateurs, la mutation ΔK46 altérerait l'assemblage des polymères en protofilaments. Ces auteurs n'émettent donc pas exactement la même hypothèse que nous, même s'ils démontrent une altération de l'assemblage des filaments de lamines A/C.

Une mutation située dans le même patch RLRL (charge +2) que l'acide aminé R388 a également été identifiée comme responsable d'une maladie musculaire, mais cette fois ci l'AD-

EDMD, il s'agit de la mutation p.Arg386Lys, abrégée en R386K (Bonne et al. 1999; Bonne et al. 2000). La lysine étant également un acide aminé basique, la mutation R386K n'est pas responsable d'un changement de charge comme la mutation R388P, l'arginine 386 est cependant aussi extrêmement conservée au sein des espèces (Figure 93) et au sein des filaments intermédiaires (Figure 95). Il a été observé par l'équipe de H. Worman, que dans les cellules C2C12 transfectées, la lamine A R386K (étiquetée FLAG) se localisait dans le nucléoplasme et formait parfois des agrégats ou foci intranucléaires de lamine, tout comme nous l'avons observé avec la lamine A R388P (Ostlund et al. 2001).

Dans le modèle de Strelkov, alors que la région où se situe l'acide aminé R388 est chargée positivement, une autre région correspondant aux acides aminés 357 à 364, en amont dans le coil 2B possède un patch chargé négativement. Il se trouve qu'une autre mutation d'un de ces acides aminés, la mutation p.Glu358Lys, abrégée en E358K, a également été identifiée comme causant des L-CMD et l'AD-EDMD (Quijano-Roy et al. 2008; Ostlund et al. 2001). Cette mutation change la charge de cet acide aminé puisque l'acide glutamique (E) est chargé négativement et qu'il est substitué par une lysine, un acide aminé basique. Il a été montré par microscopie électronique *in vitro* que les lamines mutantes E358K ne s'assemblaient pas non plus en des structures bien organisées (Zwarger et al. 2013). Exprimée dans des C2C12, cette lamine est localisée dans 50 à 70% des noyaux uniquement dans le nucléoplasme que ça soit ou non dans des foci (Ostlund et al. 2001).

En résumé, quatre mutations au niveau des régions impliquées dans la polymérisation des dimères de lamines A/C via des interactions électrostatiques ont donc été décrites comme causant des pathologies musculaires, que ça soit une L-CMD (Δ K32, R388P et E358K) ou une AD-EDMD (R386K, E358K), et ces lamines mutées sont localisées principalement au sein du nucléoplasme et non pas à la périphérie nucléaire. Deux autres mutations, N195K et M371K qui se situent sur la face externe des répétitions en heptade, pourraient également altérer la polymérisation des lamines. Les lamines mutées N195K et M371K causent les pathologies EDMD et L-CMD ; elles ont aussi la particularité de se localiser dans le nucléoplasme des C2C12 transfectées (Bonne et al. 2000; Ostlund et al. 2001).

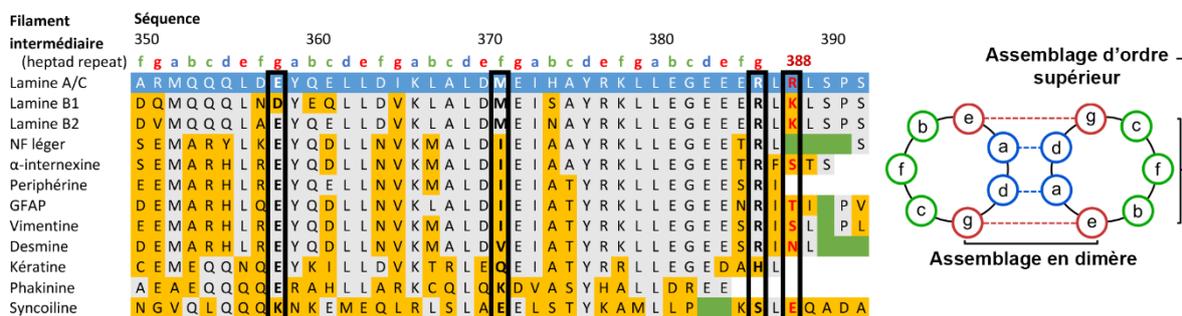


Figure 95 : Localisation de mutations des lamines A/C et alignement avec d'autres protéines des filaments intermédiaires.

L'hypothèse qui ressort de ces différentes informations, serait que les lamines A/C R388P, Δ K32, R386K, E358K, N195K et M371K sont nucléoplasmiques car elles ne s'assembleraient pas correctement en polymères ou protofilaments et causeraient ainsi des pathologies musculaires. Les

mécanismes sous-jacents de ces pathologies pourraient concerner une altération dans le rôle de soutien mécanique assuré par les lamines, un défaut d'interaction des lamines avec des protéines clefs pour des voies de signalisation impliquées dans le muscle ou encore des défauts d'organisation de la chromatine. Certaines de ces hypothèses sont discutées ci-dessous.

IV. Impact de la lamine A mutée R388P sur des partenaires des lamines A/C

Nous avons mis en évidence dans nos modèles cellulaires un impact différentiel de la surexpression des FLAG-LA WT et R388P sur la lamine B1, LAP2 α , l'émerine et SREBP1c. En particulier, les lamines mutées R388P semblent avoir une perte de fonction pour réguler la localisation normale de la lamine B1, LAP2 α et l'émerine. Ainsi, les lamines A mutées R388P altèrent l'intégrité de la périphérie nucléaire en modifiant l'ancrage de protéines normalement associées à l'enveloppe nucléaire et à la matrice nucléaire. D'autre part, les lamines mutées semblent avoir un gain de fonction pour stabiliser et donc augmenter l'expression de partenaires comme le facteur de transcription SREBP1 (ici ectopique). Dans la mesure où nous n'avons pas vu une augmentation du nombre d'interactions entre SREBP1c et les lamines A R388P comparé aux lamines A sauvages, nous supposons que les lamines mutées stabiliseraient SREBP1c de manière indirecte via des modifications post-traductionnelles de SREBP1c, telles que l'acétylation (Ponugoti et al. 2010). Afin de comprendre l'impact des lamines mutées sur la fonction de SREBP1c, il serait intéressant de quantifier l'expression des gènes cibles de ce facteur de transcription en réalisant des qPCR.

Dans les cellules de la patiente atteinte de L-CMD en raison de la mutation hétérozygote *LMNA* p.R388P, on peut imaginer que le pool de lamines A R388P soit en compétition avec le pool de lamines A WT pour lier des partenaires.

V. La lamine A mutée R388P modifie l'organisation de la chromatine

Grâce aux expériences de ChIP-Seq réalisées dans les cellules HeLa, en collaboration avec Philippe Collas nous avons montré que les lamines A R388P se lient globalement à un peu plus de régions génomiques que les lamines A sauvages. De plus, les LADs définies par les lamines A R388P sont anormalement riches en gènes et se recouvrent peu avec les LADs définies par les lamines A sauvages (index de Jaccard de 0,078). Les analyses de ChIP-Seq ne donnent par contre pas d'informations sur la localisation des LADs (nucléoplasme vs périphérie nucléaire) ni sur l'expression du génome.

D'après la littérature, l'hypothèse actuelle est que les lamines confèrent généralement la répression transcriptionnelle d'une manière dépendante des marques épigénétiques de la chromatine. Dans *C. Elegans*, un modèle a été proposé où MET-2, en induisant la formation de H3K9me2, entraînerait la localisation de cette chromatine à la périphérie nucléaire et où SET-25 en

induisant H3K9me3 établirait l'hétérochromatine répressive (Towbin et al. 2012). Par ailleurs, dans les cellules S2 de Drosophile, ont été montrés les rôles d'HDAC1 dans la désacétylation, la compaction de la chromatine et la mise en silence de gènes ainsi que de HDAC3 dans la rétention de ces domaines à la lamina (Milon et al. 2012).

Ces mécanismes pourraient être conservés dans les mammifères, puisque les LADs sont riches en H3K9me2 et entourés d'H3K27ac (Pickersgill et al. 2006; Guelen et al. 2008) alors que la déplétion de la H3K9 méthyltransférase G9a réduit l'accrochage des LADs à la périphérie nucléaire (Kind et al. 2013). Or, nous avons mis en évidence dans nos modèles cellulaires que les expressions des lamines A ectopiques WT ou R388P avaient des influences distinctes sur la détection globale *in situ* de l'histone H1 et de HP1 α , associées à la chromatine compacte, silencieuse, et sur les marques épigénétiques tels que H3K9ac, H3K27ac, H3K4me3 associées à l'euchromatine active transcriptionnellement. La surexpression des protéines FLAG-LA R388P a donc un impact majeur sur le statut épigénétique de la chromatine, ce qui pourrait avoir une conséquence sur l'organisation spatiale de celle-ci. Pour aller plus loin dans l'évaluation de l'impact fonctionnel des lamines A mutées R388P sur l'expression du génome, il serait nécessaire et intéressant d'une part d'étudier plus précisément les marques épigénétiques des régions de la chromatine liées par ces lamines mutées et d'autre part de réaliser des expériences de RNA-Seq.

Nous ne connaissons pas encore le(s) mécanisme(s) par le(s)quel(s) les lamines A R388P altèrent le statut épigénétique de la chromatine. Tenant compte des données obtenues dans nos différents modèles cellulaires ou animal, nous émettons l'hypothèse que SREBP1 pourrait jouer un rôle dans ce processus. D'abord, dans les modèles cellulaires, le gène *SREBF1* est lié spécifiquement par les lamines A mutées alors que l'expression de la protéine SREBP1 est fortement augmentée. En parallèle, nous avons trouvé que dans les muscles de souris surexprimant les lamines A R388P, le niveau d'ARNm de *Srebf1* est diminué. Ainsi, les lamines A R388P pourraient impacter l'expression de SREBP1 au niveau transcriptionnel et/ou post-transcriptionnel, par exemple en séquestrant la protéine SREBP1 ou en modulant son niveau d'acétylation via l'histone désacétylase SIRT1, autre partenaire de la lamine A (Ghosh et al. 2013; B. Liu et al. 2012). A noter que l'acétylation de SREBP1 régule également sa fonction (Ponugoti et al. 2010). Or il a été montré que parmi les nombreux gènes cibles de SREBP1, il y a deux histone désacétylases, HDAC5 et HDAC9 (Lecomte et al. 2010). Nous avons validé que l'expression du gène *Hdac9* était également diminuée dans les muscles de souris transduits avec les AAV codant la lamine A R388P. Au-delà des modifications de l'acétylation des histones, des rôles pour ces deux HDACs ont été mis en évidence dans le contexte musculaire. HDAC9 jouerait un rôle dans l'activité électrique des neurones (Méjat et al. 2005), alors que HDAC5 régulerait l'assimilation du glucose et l'action de l'insuline dans le muscle (Raichur et al. 2012). Il serait intéressant d'étudier si les muscles exprimant les lamines A mutées R388P et responsables de L-CMD présentent des altérations au niveau de la transmission des influx nerveux.

VI. Les lamines A R388P sont responsables de dysmorphies nucléaires

La surexpression des FLAG-LA R388P dans les cellules HeLa et dans les cellules C2C12 induit des dysmorphies nucléaires, phénotype qui n'est pas spécifiquement associé à la pathologie L-CMD, puisque décrit notamment dans les contextes HGPS (fibroblastes de patients portant la mutation *LMNA* p.G608G (Csoka et al. 2004; R. D. Goldman et al. 2004)), FPLD (fibroblastes de patients portant la mutation *LMNA* p.R482W/Q (Vigouroux et al. 2001)) et DCM (cœurs de souris hétérozygotes *Lmna*^{ΔK32} (Cattin et al. 2013)).

Les dysmorphies induites par la lamine A mutante responsable de L-CMD semblent cependant bien différentes de celles observées dans le contexte d'une autre laminopathie qui a fait l'objet de très nombreuses études, le syndrome progéroïde HGPS. En effet, il est intéressant de noter que, dans nos conditions de transfection, nous n'observons pas de dysmorphies nucléaires pour les cellules C2C12 exprimant la progérine mais plutôt des repliements de l'enveloppe nucléaire. Contrairement au contexte de la progéria où les défauts de forme des noyaux sont dus à un défaut de maturation de la pré-lamine A mutante (Capell et al. 2005; Toth et al. 2005; S. H. Yang et al. 2005), dans le contexte L-CMD (*LMNA* p.R388P), la lamine A mature est capable d'induire des dysmorphies nucléaires sévères. Dans le contexte progéria (fibroblastes de patiente) et dans des fibroblastes *siLMNA*, la forme des noyaux peut être rétablie avec un traitement à la rémodeline qui modifie l'organisation des microtubules ou au nocodazole et à la colchicine, deux drogues qui déstabilisent les microtubules (Larrieu et al. 2014), alors que dans le contexte des lamines A R388P, le traitement au nocodazole n'a pas eu d'effet. De plus, dans le contexte de la progéria, le remodelage de la chromatine par un inhibiteur d'HDAC (TSA) en association à la mévinoline a amélioré la forme des noyaux (Columbaro et al. 2005), dans le contexte des lamines A R388P, le traitement des cellules avec la TSA n'a pas eu d'effet.

En conclusion, les mécanismes sous-jacents aux dysmorphies nucléaires sont différents dans les contextes HGPS (expression de progérine) et L-CMD (expression de lamine A R388P). Pour autant, comment expliquer la génération des dysmorphies causées par les lamines A R388P ? Plusieurs modèles ont été proposés dans la littérature.

1. Rôle possible de l'état de la chromatine face aux forces du cytosquelette.

Un premier modèle a été proposé dans des cellules épithéliales de mammifères qui présentent des dysmorphies nucléaires en réponse au knock down de BRG1, la sous unité catalytique du complexe SWI/SNF (Imbalzano et al. 2013). Ce complexe qui comprend une famille d'enzymes de remodelage de la chromatine ATP-dépendantes, utilise l'énergie provenant de l'hydrolyse de l'ATP pour casser et déstabiliser les contacts histone-ADN sur le nucléosome (Imbalzano et al. 1994; Kwon et al. 1994). Or, des données de Chip-Seq dans des cellules HeLa indiquent qu'une fraction des régions liées par SWI/SNF sont associées à la lamina (Euskirchen et al. 2011). Les auteurs ont suggéré que BRG1 organiserait la chromatine au niveau de la lamina. Ils ont proposé que la perte de BRG1 altérerait la structure de la chromatine (condensation) dans la région de la lamina, alors que les

connections entre la chromatine et la lamina seraient maintenues, ce qui générerait des dysmorphies nucléaires (Figure 96 A)). A l'inverse, dans nos modèles cellulaires avec expression de la lamine A R388P, les changements de statut épigénétique de la chromatine observés suggèrent une décondensation globale de la chromatine.

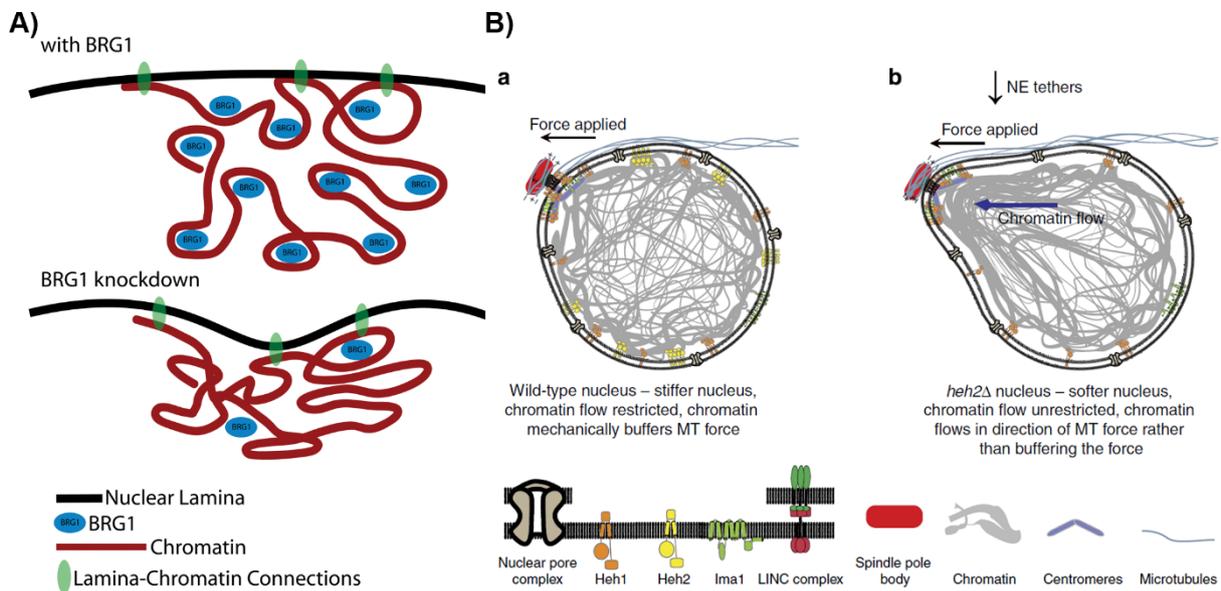


Figure 96 : Modèles de dysmorphies nucléaires proposés dans différentes études

A) Dysmorphies nucléaires dues au knock-down de BRG1 (Imbalzano et al. 2013). **B)** Dysmorphies nucléaires dues à la perte de l'adressage de la chromatine à la périphérie nucléaire (Schreiner et al. 2015)

De manière intéressante, chez la levure *S. pombe*, qui est dépourvue de lamines, il a été montré que la perte d'adressage de la chromatine à l'enveloppe nucléaire était responsable de dysmorphies nucléaires (Schreiner et al. 2015). Dans ce cas, ce serait l'augmentation du flux de chromatine associée à des membranes moins rigides, sous l'effet des forces du cytosquelette qui causerait les dysmorphies nucléaires (Figure 96 B)). En accord avec ce modèle, il a été montré dans des myocytes de rats que c'est la balance entre des forces de tension et de compression générées par le cytosquelette et la chromatine qui régule la forme des noyaux, (Figure 96 B)) (H. Lee et al. 2015). Cependant, dans nos modèles cellulaires de surexpression de lamines A R388P, la modification de structure de la chromatine soit par un inhibiteur d'HDAC, soit par un inhibiteur d'HAT en association ou non avec un déstabilisateur de microtubules n'a pas permis de retrouver une forme normale des noyaux. Ces données suggèrent que ce ne serait pas le changement de flux de la chromatine qui serait seul à l'origine des dysmorphies nucléaires. La dynamique de la chromatine pourrait cependant être un facteur additionnel, qu'il serait intéressant d'étudier dans nos modèles cellulaires.

2. Rôle direct possible des deux types de lamines.

Alors que nos données suggèrent que les flux de chromatine ne seraient pas l'élément principal responsable des dysmorphies nucléaires, notre hypothèse est que les flux de lamines A R388P en serait directement à l'origine. En accord avec cette hypothèse, nous avons observé une augmentation de la dynamique des lamines A R388P par rapport aux lamines A WT dans les cellules HeLa. Les lamines de type A et les lamines de type B régulent respectivement les propriétés de viscosité et d'élasticité du noyau (Swift et al. 2013). Swift et ses collaborateurs imaginent les lamines

de type B comme étant les parois élastiques d'un ballon, qui permettent le retour à une forme d'origine après déformation; et les lamines de type A à un fluide visqueux au sein du ballon qui empêche sa déformation. Au vu des altérations de l'intégrité de l'enveloppe nucléaire dans les cellules exprimant les lamines A R388P, avec notamment des anomalies du marquage de la lamine B1, on pourrait supposer que les dysmorphies nucléaires soient une conséquence d'une perte de fonction des lamines de type A mais aussi des lamines de type B concernant les propriétés de viscosité et d'élasticité du noyau (Figure 97).

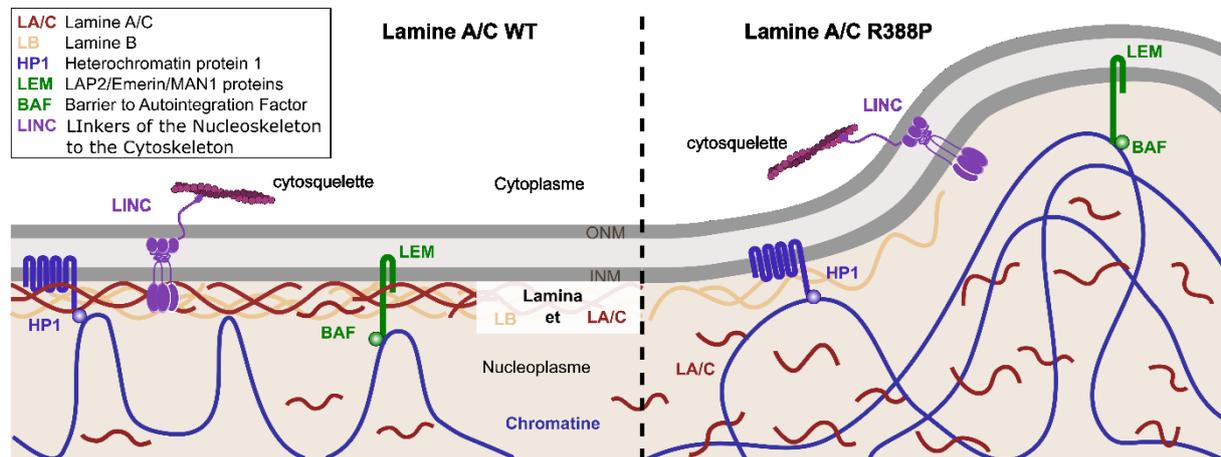


Figure 97 : Modèle de dysmorphies nucléaires causées par les lamines A R388P et leur impact sur la lamine B1

D'ores et déjà, nous pouvons proposer afin de diminuer les dysmorphies nucléaires, d'essayer d'intervenir directement sur le niveau d'expression des lamines mutées et le processus de leur assemblage en polymères.

D'autres éléments de la cellule pourraient cependant également contribuer aux dysmorphies nucléaires observées, tels que l' α -dystrobrevine, protéine appartenant au complexe associé à la dystrophine mais également présente dans le noyau (Borutinskaite et al. 2011; Fuentes-Mera et al. 2006; González-Ramírez et al. 2008; Navakauskienė et al. 2012). Il a été montré dans des C2C12 qu'elle interagissait avec la lamine B1 et que son extinction causait entre autres des altérations de localisation des lamines A/C, B1 et B2 et des dysmorphies nucléaires (Aguilar et al. 2015). Or, dans les muscles exprimant les lamines A R388P, une diminution du niveau d'ARNm de *Dtna*, codant l' α -dystrobrevine, a été observée. Aussi, il serait intéressant d'étudier la contribution éventuelle de l' α -dystrobrevine dans la génération des dysmorphies nucléaires causées par l'expression des lamines A R388P.

VII. Les lamines A R388P induisent un changement de typage des fibres musculaires du tibia antérieur de souris

L'avantage d'utiliser des AAV pour exprimer une protéine mutante dans un muscle de souris est que ce protocole expérimental est beaucoup plus rapide et moins onéreux à mettre en place que l'établissement de lignées de souris transgéniques.

Néanmoins, il est clair que ce protocole expérimental présente plusieurs inconvénients d'importance. En premier lieu, il nous limite à l'étude d'un muscle rapide qu'est le tibial antérieur alors que l'injection dans un muscle lent tel que le soleus est difficile à envisager. En effet, en raison de sa localisation et de son petit volume, une injection dans le soleus aurait nécessité au préalable une opération chirurgicale pour visualiser le muscle, opération que nous ne savons pas réaliser techniquement. Il est probable que le tibial antérieur, parce qu'il est un muscle rapide ne soit pas forcément le plus pertinent à étudier dans le contexte L-CMD. Notons qu'il a été rapporté dans une étude de huit enfants atteints de dystrophies musculaires liées au gène *LMNA* que le tibial antérieur ne présentait d'infiltration lipidique que dans le cas des patients les plus atteints et n'était que peu touché par l'atrophie en comparaison à d'autres muscles tels que le pectoral mineur ou le trapèze (Gómez-Andrés et al. 2016). L'autre inconvénient de ce protocole expérimental est qu'il ne permet pas d'observer l'impact de la protéine mutée sur un organisme entier mais seulement sur un organe transduit qui est en contact avec d'autres organes «sauvages». Enfin, avec ce protocole expérimental, les lamines ectopiques ne sont exprimées que pendant un temps relativement court (un mois) lorsque les souris sont déjà âgées de 10 semaines, aussi nous ne pouvons pas observer leur impact au niveau du développement embryonnaire. Ce modèle nous a cependant permis d'identifier des différences dans l'organisation des muscles exprimant les lamines A WT et R388P.

Nous avons mis en évidence une modification dans le typage des fibres musculaires du tibial antérieur injecté par les AAV codant la lamine A mutée R388P. Que peut signifier la diminution du nombre de fibres de type IIA/IIAX ? La fréquence relative de chaque type de fibre dans un muscle définit ses capacités fonctionnelles globales. De nombreux signaux environnementaux tels que le vieillissement, l'atrophie ou l'exercice peuvent modifier les caractéristiques fonctionnelles du muscle en changeant les types de fibre (Pette and Staron 2001; Higginson et al. 2002). En effet, l'exercice physique prolongé (type endurance) entraîne une augmentation dans le métabolisme oxydatif et conduit à la transition des myofibres rapides (type II) à lentes (type I) alors que la perte d'activité et le vieillissement ont des effets opposés (Bassel-Duby and Olson 2006). Dans notre cas, l'activité physique des souris n'a pas été mesurée. En revanche, tenant compte des propriétés des lamines A mutées révélées par ailleurs dans notre étude, on peut suggérer que le changement de typage des fibres soit une conséquence de l'impact des lamines A mutées sur la chromatine, aboutissant à la dérégulation de l'expression de gènes impliqués dans la détermination du typage des fibres. Parmi les gènes que nous avons identifiés comme dérégulés dans le tibial antérieur en réponse à l'expression des lamines A R388P, on peut citer HDAC9. Il est connu que Mef2c et MITR (*MEF2c-interacting transcription repressor*), l'isoforme de HDAC9 majoritaire dans le muscle qui est dépourvu du domaine catalytique des HDACs, contrôlent l'expression de MyoD et de la myogénine de manière dépendante de l'activité électrique, et que le niveau d'expression de ces dernières est alors augmenté en réponse à la dénervation du muscle (Méjat et al. 2005). Cependant dans notre modèle, la diminution du niveau d'ARNm de *Hdac9* ne se répercute pas au niveau de l'expression de *Myog*. Il est donc peu probable que HDAC9 soit directement impliqué dans l'altération du typage des fibres.

Par ailleurs, il a été montré que la surexpression forcée du complexe transcriptionnel composé de Six1 et Eya1 dans le muscle de souris soleus induisait la synthèse de novo de la MyHC IIB, isoforme normalement minoritaire dans les muscles à contraction lente (Grifone et al. 2004). Dans ce contexte, il a été observé un changement du typage des fibres, évoluant d'un type lent (MHC I) vers

un type rapide (MHC IIA, IIB et/ou IIX). Nos analyses transcriptomiques n'ont cependant pas montré de différence significative d'expression des ARNm d'*Eya1* entre les muscles du tibial antérieur exprimant les protéines FLAG-LA WT et R388P. Il nous reste à étudier l'expression du gène *Six1* et de d'autres gènes dont l'expression a également été associée au typage des fibres musculaires.

Il est intéressant de noter qu'un changement de typage a été observé lors de la modulation de l'expression du partenaire de la lamine A qu'est LAP2 α , aussi impliqué dans la régulation de l'expression de gènes. La perte de LAP2 α (souris knock out) a causé une augmentation du pourcentage de fibres de type II (47% vs 56%) au détriment des fibres de type I spécifiquement dans un muscle, le soleus (Gotic et al. 2010). Ainsi, dans le tibial antérieur, ils n'ont pas observé de changement de typage entre les fibres de type I et II. Cependant, il est difficile de comparer nos résultats avec cette étude, où la composition précise des différents types de fibres MHC IIA et MHC IIB n'a pas été faite.

Peut-on extrapoler les résultats que nous avons obtenus chez la souris directement avec les phénotypes de l'humain ? Probablement non, si l'on considère que chez l'homme, la protéine MyHC IIB n'est pas détectable bien que le gène correspondant (*MYH4*) soit présent dans le génome, et que les fibres typées comme IIB sur la base de la coloration ATPase sont en réalité des fibres IIX si on se base sur la composition en MyHC (Smerdu et al. 1994). De plus, à l'inverse des fibres IIX de la souris, les fibres IIX chez l'homme sont celles avec l'activité SDH la plus faible en comparaison à tous les autres types de fibre. Néanmoins, on peut imaginer que les mécanismes sous-jacents aux altérations de la fonction musculaire puissent également inclure une altération du typage des fibres musculaires chez la patiente atteinte de L-CMD en réponse à la mutation *LMNA* p.R388P. A noter que le typage des fibres musculaires est affecté dans différentes pathologies musculaires telles que la dystrophie musculaire de Duchenne (Talbot and Maves 2016).

Notons également que les muscles squelettiques ont un rôle dans le maintien du métabolisme du corps entier étant donné leurs fortes capacités oxydatives et la proportion importante de ces tissus dans le corps. Il a notamment été montré que les souris hétérozygotes *Tbx15*^{+/-} qui expriment une quantité réduite du facteur de transcription Tbx15 ont non seulement une diminution du nombre des fibres glycolytiques dans leurs muscles, mais présentent aussi une intolérance au glucose et une augmentation de l'adiposité (K. Y. Lee et al. 2015). De plus, dans la souris utilisée comme modèle de L-CMD induit par le mutant de *Lmna* Δ K32, il a été montré que l'activité transcriptionnelle de SREBP1 était diminuée dans le foie alors que les MEFs cultivés *ex vivo* ne différenciaient pas efficacement en adipocytes (Bertrand et al. 2012), or l'expression du gène codant SREBP est diminuée dans nos modèles animaux. Ainsi, le changement de typage des muscles observé dans les tibials antérieurs exprimant les lamines A R388P pourrait également représenter un mécanisme à l'origine de la perte du tissu adipeux et de l'insulinorésistance modérée observée chez la patiente HER Lo.

Conclusion et perspectives

Conclusion et Perspectives

Mes travaux de thèse rapportent le cas d'une patiente atteinte d'une dystrophie musculaire congénitale avec apparition d'une lipodystrophie au début de la puberté, porteuse d'une mutation du gène *LMNA* à l'état hétérozygote, la mutation p.R388P.

I. Avantages de l'étude de différents modèles

Au cours de ces trois années, nous avons travaillé sur différents modèles cellulaires et animaux. D'un point de vue organisationnel, gérer trois lignées cellulaires et des cultures de clones prend plus de temps que de multiplier les expériences sur un seul modèle, cependant cela permet de répondre à des questions distinctes et chaque modèle présente des avantages spécifiques.

En effet, même si les fibroblastes de la patiente ont eu une culture limitée et sont issus d'un tissu pas ou peu concerné par la maladie, ils expriment les lamines A/C à un niveau physiologique.

Les cellules HeLa ont le défaut d'être des cellules immortalisées issus également d'un tissu pas ou peu concerné par la maladie, où l'on a fait surexprimer les lamines sauvages ou mutées. Cependant, elles sont des cellules d'origine humaine dont la culture et la transfection sont aisées. De plus, elles ont l'avantage d'avoir été préalablement utilisées pour caractériser les phénotypes cellulaires induits en réponse à différentes mutations dans le gène *LMNA* ainsi que pour identifier les régions du génome associées aux lamines.

Les myoblastes C2C12 bien qu'étant d'origine murine et exprimant également les lamines A à des niveaux plus élevés que la normale après transfection, présentent les avantages de pouvoir être cultivés et transfectés relativement aisément et de provenir d'un tissu directement concerné par la maladie (le muscle squelettique).

L'injection d'AAV codant les lamines A sauvages vs mutées ne peut se faire que dans un muscle accessible de la souris, cependant cette approche expérimentale permet d'étudier dans un temps relativement court l'impact du mutant de lamine sur un organe entier (ici le tibia antérieur).

II. Résultats principaux

Mon travail de thèse a permis de montrer que les lamines A R388P avaient des effets pléiotropes. Les résultats principaux sont résumés ci-dessous :

Dans les cultures primaires, l'expression des lamines A/C mutées p.R388P induit une sénescence précoce.

Dans les cultures de cellules immortalisées HeLa/C2C12 la lamine A mutée semble avoir une stabilité comparable à celle de la lamine A sauvage mais n'est pas localisée normalement et est plus soluble et plus dynamique, suggérant un défaut de polymérisation. En effet, elle est déplétée de l'enveloppe nucléaire et s'accumule dans le nucléoplasme, ce qui a déjà été observé notamment dans des MEFs (*Mouse embryonic fibroblasts*) de souris *LMNA*^{ΔK32}, modèle cellulaire de la pathologie L-CMD. Par contre, les lamines A mutées R388P induisent des dysmorphies nucléaires sévères distinctes de celles décrites dans d'autres contextes de laminopathies. En effet, contrairement aux dysmorphies nucléaires présentes dans les cas de progéria, celles causées par les lamines A R388P ne sont pas dues à un défaut de maturation de la pré-lamine A et ne sont donc ni reversées en empêchant la farnésylation de la pré-lamine A, ni en relâchant les forces exercées par le cytosquelette ou en modifiant le degré de condensation de la chromatine via la modulation de l'acétylation des histones.

Dans les cellules HeLa, la quantité et l'identité des régions du génome liées par les lamines A R388P se sont révélées très différentes de celles liées par les lamines A sauvages, suggérant un impact spécifique de ce mutant lamine A sur l'expression du génome. De plus il a été montré une perte de la modulation épigénétique observée avec la surexpression de lamine A sauvage.

Dans les muscles tibials antérieurs, les lamines A R388P ne sont pas localisées normalement et sont également déplétées de l'enveloppe nucléaires et localisées uniquement dans le nucléoplasme. L'expression des lamines A R388P induit un changement de typage des fibres musculaires avec une diminution des fibres oxydatives, les fibres utilisées principalement pour des exercices peu puissants et prolongés tels que le maintien de la posture. De plus, on observe dans les muscles exprimant les lamines A R388P une modification de l'expression de certains gènes dont *Srebfl* qui code le facteur de transcription SREBP1 et *Dtna* qui code l' α dystrobrevine, protéine du complexe DGC (*dystrophin associated glycoprotein complex*) et dont la déplétion induit une dystrophie des muscles squelettiques et cardiaque chez la souris (Grady et al. 1999).

III. Perspectives

Les résultats obtenus jusqu'à présent ouvrent la voie à de nouvelles questions quant à l'impact de la mutation *LMNA* p.R388P.

A. Quelles sont les propriétés mécaniques des noyaux exprimant les lamines A R388P?

Notre hypothèse est que les noyaux exprimant les lamines A R388P auraient des propriétés d'élasticité (via la lamine B1) et de viscosité (via la lamine A) différentes des noyaux contrôles exprimant des lamines A sauvages, ce qui contribuerait à générer des dysmorphies nucléaires. Pour tester cette hypothèse, nous souhaiterions réaliser des expériences biophysiques qui permettent de mesurer les propriétés d'élasticité et de viscosité des noyaux, comme par exemple en aspirant les noyaux exprimant les lamines A R388P ou WT à travers une micropipette (Swift et al. 2013). Par ailleurs, l'étude de la réponse des cellules à des modifications de leur environnement en terme de rigidité ou de soumission à des stress mécaniques (par exemple, forces de type uniforme biaxiales

appliquées aux membranes) donnerait aussi des indications sur la capacité de transmission des forces entre le noyau et le cytosquelette dans les différents contextes de lamines A (WT vs R388P) (Verstraeten et al. 2008; Swift et al. 2013).

B. Quelles sont les conséquences des modifications de l'organisation 3D du génome sur l'expression de gènes ?

En réponse à l'expression des lamines A R388P, alors que notre analyse ChIP-Seq supporte un changement de l'organisation 3D du génome, notre étude sur les marques épigénétiques suggère une modification de la compaction de la chromatine. Il serait bon d'approfondir ces points en poursuivant les analyses sur les modifications épigénétiques (par immunofluorescence) et en étudiant l'état de la compaction de la chromatine par observation au microscope électronique.

Afin d'explorer l'impact de la modification de l'organisation du génome et des marques épigénétiques sur la transcription, il sera nécessaire de réaliser des expériences de RNA-Seq.

Cette approche dans les cellules HeLa permettra d'établir un lien, si il existe, entre la liaison des lamines A R388P à des gènes et le niveau d'expression de ces derniers. En parallèle, des expériences de RNA-Seq effectuées avec les myoblastes C2C12 exprimant les lamines A mutées ou avec des nouveaux modèles cellulaires devraient permettre de déterminer quelles voies de signalisation sont altérées spécifiquement dans ces types cellulaires et qui pourraient contribuer au développement de la pathologie de la patiente atteinte de L-CMD en raison de la mutation LMNA p.R388P.

C. Quel est l'impact de la diminution du nombre des fibres oxydatives dans le muscle ?

Nous avons commencé à étudier les voies qui pourraient être responsables de la diminution du nombre des fibres oxydatives mais de l'augmentation du nombre de fibres glycolytiques dans les muscles tibiaux antérieurs injectés par des AAV pour exprimer les lamines A R388P. Cependant, il reste à compléter ces études par des mesures d'expression d'autres gènes et de protéines connus pour être impliqués dans le typage des fibres, comme Six1 ou Nfatc1. Il serait aussi intéressant d'étudier l'évolution du typage des fibres au cours du temps et/ou en fonction de l'âge de l'animal. Pour cela, les analyses *in vivo* pourraient être réalisées à différents temps après injection des AAV dans le muscle de souris plus ou moins jeunes. Afin de déterminer l'impact fonctionnel du changement de typage des fibres, il serait nécessaire de réaliser par exemple des expériences de mesure de force maximale générée par le muscle. Pour éviter les désagréments du modèle animal utilisé ici (muscle injecté avec les AAV), nous pourrions envisager de générer un modèle de souris KI *Lmna* R388P.

D. Les lamines A R388P altèrent-elles la différenciation adipocytaire et musculaire ?

Il serait particulièrement intéressant de développer des nouveaux modèles cellulaires afin d'étudier la différenciation adipocytaire ou musculaire. Trois modèles pourraient être envisagés: 1) des précurseurs de cellules musculaires ou adipeuses transduits par des lentivirus pour exprimer les lamines mutantes, 2) des iPSc (*Induced Pluripotent Stem cell*) générées à partir de cellules de

patients, 3) ou encore des lignées de cellules portant la mutation *LMNA* d'intérêt générées grâce au système CRISPR/Cas9. Des modèles humains présenteraient de plus un avantage certains en comparaison à des modèles murins. Avec ces modèles cellulaires, nous pourrions évaluer l'expression et la fonction du facteur de transcription SREBP1, préalablement montré comme jouant un rôle dans les tissus musculaires et adipeux ; les deux tissus majoritairement affectés chez la patiente atteinte de L-CMD causée par la mutation *LMNA* p.R388P. Nous avons montré que SREBP1 est modifié en réponse à l'expression de lamine A R388P (protéine stabilisée par les lamines A R388P dans les cellules HeLa mais expression du gène diminuée dans les muscles de souris). On pourrait alors grâce à ces modèles d'abord valider si les lamines R388P causent véritablement un défaut de différenciation myoblaste-myotube ou préadipocytes-adipocyte et si tel est le cas, évaluer la contribution d'une éventuelle dérégulation de SREBP1 dans ce processus.

E. Y a-t-il des mécanismes sous-jacents communs aux L-CMD causées par des mutations distinctes du gène *LMNA* ?

A long terme, Il serait particulièrement intéressant de comparer les effets induits par la lamine A R388P à ceux induits par des mutations du gène *LMNA* qui génèrent l'expression de lamines A mutantes qui présentent également un défaut d'assemblage en polymères mais aussi à d'autres mutations du gène *LMNA* responsables de dystrophie musculaire congénitale (L-CMD). Dans le cas où l'on retrouverait des fonctions communément altérées, celles-ci pourraient être ciblées à des fins thérapeutiques.

Matériels et méthodes

Matériels et méthodes

IV. Identification de la nouvelle mutation hétérozygote p.R388P du gène *LMNA*

Une patiente diagnostiquée pour une dystrophie musculaire congénitale, des anomalies du rythme atrial et pour une lipodystrophie a été adressée à l'âge de 11 ans au département de biologie moléculaire de La Pitié-Salpêtrière (Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, France) pour un séquençage du gène *LMNA*. Ses parents d'origine Caucasienne et sa sœur étaient asymptomatiques. Les études cliniques, biologiques et moléculaires de la patiente et de ses proches ont été faites après consentement éclairé selon les procédures légales.

L'ADN génomique a été extrait des leucocytes du sang périphérique. La région codante entière et les jonctions d'épissage du gène *LMNA* ont été amplifiés par PCR avec des amorces spécifiques chez le proband et ses proches et soumis à un séquençage direct comme décrit préalablement (Bonne et al. 1999). Une transversion 1163G>C hétérozygote dans l'exon 7, prédisant une substitution p.R388P, a été identifiée chez le proband mais pas chez ses parents et sa sœur. Cette mutation, qui est apparue *de novo*, était absente chez plus de 150 sujets contrôles non apparentés.

V. Etudes cellulaires

A. Culture cellulaire

1. Culture de fibroblastes

Les fibroblastes humains ont été cultivés dans du Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), à forte concentration en glucose, GlutaMAX (Gibco), 10% de sérum de veau fœtal, 1mM de pyruvate de sodium, 1% de pénicilline-streptomycine et 5 µg/ml de plasmocine.

2. Culture et transfection des cellules HeLa

Les cellules humaines HeLa ont été cultivées dans du Minimum Essential Medium (MEM) contenant du glutamax (Gibco) avec 1% d'acides aminés non essentiels et 10% de sérum de veau fœtal. Le produit XtremeGENE 9 (Roche) a été utilisé pour transférer les cellules selon les instructions du fabricant. Un ratio de 3 : 1 entre la quantité de réactif de transfection XtremeGENE 9 (µl) et d'ADN (µg) a été appliqué. Les cellules ont été analysées 24 h après transfection.

3. Culture et transfection des cellules C2C12

Les myoblastes C2C12 ont été cultivés dans du milieu Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) à forte concentration en glucose et contenant du GlutaMAX™ (Gibco) ainsi que 10% de sérum de veau fœtal. Le produit XtremeGENE 9 (Roche) ou la lipofectamine™ 2000 (Life technologies) ont été utilisés en accord avec les instructions du fournisseur. Les cellules ont été analysées 24 h après transfection sauf si précisé.

4. Test de Senescence par la β -Galactosidase

Les fibroblastes ont été mis à pousser sur lamelles de verre, fixés 12 min à température ambiante avec une solution de formaldéhyde à 3% dans du PBS et incubés sur la nuit à 37°C dans [1 mg/ml X-gal, 40 mM acide citrique, 126 mM phosphate de sodium pH 6, 5 mM ferricyanide de potassium, 5 mM ferrocyanide de potassium, 150 mM NaCl, 2 mM MgCl₂]. L'activité de la β -Galactosidase spécifique à la sénescence a été déterminée en quantifiant le pourcentage de cellules colorées en bleu par observation directe des lamelles au microscope (n = 900-1100 cellules dans chaque cas).

5. Traitements cellulaires

a) Traitement à la cycloheximide

Les cellules HeLa ont été cultivées dans des puits de boîtes à 24 puits. 24 h après transfection, 110 μ l de cycloheximide (diluée à 600 μ g/ml dans du milieu de culture) ont été ajoutés aux 550 μ l de milieu de culture présents dans chaque puits (*i.e* une concentration finale de cycloheximide de 100 μ g/ml). Des extraits protéiques de cellules ont été préparés aux différents temps (0, 1 h, 2 h et 3 h après le début du traitement), en ajoutant du tampon de Laemmli (SDS, DTT) dans les puits.

b) Traitement au nocodazole

Vingt-quatre heures après transfection avec les plasmides d'intérêt, les C2C12 ont été incubées en présence de nocodazole (Sigma-Aldrich ; stock préparé à 20 mM dans du DMSO) à 5 ou 10 μ M ou dans 0,05% de DMSO pendant 1 ou 3 h.

c) Traitement à la cytochalasine D

Vingt-quatre heures après transfection avec les plasmides d'intérêt, les C2C12 ont été incubées en présence de cytochalasine D (Sigma-Aldrich, stock préparé à 2 mM dans du DMSO) à 1 ou 2 μ M ou dans 0,2% de DMSO pendant 20 min ou 3 h.

d) Traitement à la mévinoline

Six heures après transfection avec les plasmides d'intérêt, les C2C12 ont été incubées en présence de mévinoline (Sigma-Aldrich ; stock préparé à 25 mM dans du DMSO) à 10 ou 30 μ M ou dans 1% de DMSO pendant 18 h.

e) Traitement à l'acide anacardique

Six heures après transfection avec les plasmides d'intérêt, les C2C12 ont été incubées en présence d'acide anacardique (Sigma-Aldrich, stock préparé à 20 mg/ml dans du DMSO) à 50 ou 100 μ M ou dans 0,175% de DMSO pendant 18 h.

f) Traitement à la Trichostatine A (TSA)

Six heures après transfection avec les plasmides d'intérêt, les C2C12 ont été incubées en présence de Trichostatine A (Sigma-Aldrich, stock préparé à 1 mM dans du DMSO) à 0,1 μ M ou dans 0,01% de DMSO pendant 18 h.

6. Etablissement de clones stables

Des cellules C2C12 ont été transfectées comme décrit ci-dessus avec les plasmides pEGFP-C1-preLA-WT, pEGFP-C1-preLA R388P et pEGFP-C1-vide. 24 h post-transfection, l'antibiotique G418 (Euromedex) a été ajouté au milieu de culture à 750 μ g/ml, les cellules ont par la suite toujours été cultivées dans ce milieu. Trois jours après transfection les cellules ont été amplifiées puis triées au FACS Aria II (BD Biosciences) pour garder les cellules les plus fluorescentes et les ensemercer en boîtes à 6 puits (polyclones). Après amplification des cellules pendant 14 jours, les cellules ont de nouveau été triées au FACS puis collectées 1 par 1 en plaque à 96 puits (clones). Après amplification des cellules, les 10 clones de chaque condition exprimant la GFP le plus fortement (estimation au microscope) ont été gardés. Du fait de l'hétérogénéité d'expression des protéines étiquetées GFP au sein de chaque clone, les populations clonales ont de nouveau été triées au FACS 5 semaines après le premier clonage.

B. Construction des plasmides

Les plasmides pcDNA-HA-SREBP1c, pcDNA-vide, pCMV-FLAG-preLA-WT, pCMV-FLAG-pre-LA-L647R, pCMV-FLAG-LAm-WT et pEGFP-C1-preLA-WT ont été construits au sein du laboratoire avant mon arrivée (Duband-Goulet et al. 2011).

Les plasmides du Tableau 5 ont été construits à partir des matrices indiquées avec le kit QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis (Agilent Technologies) en accord avec les instructions du fabricant. Brièvement, une partie des plasmides matrices ont été amplifiés par PCR en utilisant les amorces indiquées, contenant la séquence d'intérêt mutée. Les produits de PCR ont ensuite été digérés par l'enzyme DpnI. Pour finir les bactéries ultra-compétentes XL10-Gold® ont été transformées.

Nom du plasmide	Matrice	Primer forward	Primer Reverse
pCMV-Flag-LAm-R388P	pCMV-Flag-LAm-WT	gag gag agg cta cca ctg tcc ccc agc	gct ggg gga cag tgg tag cct ctc ctc
pCMV-Flag-preLA-R388P	pCMV-Flag-preLA-WT	gag gag agg cta cca ctg tcc ccc agc	gct ggg gga cag tgg tag cct ctc ctc
pCMV-Flag-preLA-R388P-L647R	pCMV-Flag-preLA-L647R	gag gag agg cta cca ctg tcc ccc agc	gct ggg gga cag tgg tag cct ctc ctc
pCMV-Flag-preLA-R388P-S390A	pCMV-Flag-preLA-R388P	agg cta cca ctg gcc ccc agc cct acc	ggt agg gct ggg ggc cag tgg tag cct
pCMV-Flag-preLA-R388P-S390A-S392A	pCMV-Flag-preLA-R388P	agg cta cca ctg gcc ccc gcc cct acc tcg cag	ctg cga ggt agg ggc ggg ggc cag tgg tag cct

pCMV-Flag-preLA-S22A-R388P-S390A-S392A	pCMV-Flag-preLA-R388P-S390A-S392A	tcc act ccg ctg gcc ccc acc cgc atc	gat gcg ggt ggg ggc cag cgg agt gga
pCMV-Flag-preLA-WT-S390A-S392A	pCMV-Flag-preLA-WT	agg cta cgc ctg gcc ccc gcc cct acc tcg cag	ctg cga ggt agg ggc ggg ggc gcg tgg tag cct
pSVK3-Flag-preLA-R388P	pSVK3-Flag-preLA-WT	gag gag agg cta cca ctg tcc ccc agc	gct ggg gga cag tgg tag cct ctc ctc

Tableau 5: Mutagénèses dirigées

Le plasmide pEGFP-C1-preLA-R388P a été construit à partir du plasmide pEGFP-C1-preLA-WT (généralisé auparavant au sein du laboratoire) et du pCMV-FLAG-pLA-R388P. Une partie de la séquence du pCMV-FLAG-preLA-R388P a été amplifiée par PCR (acide aminé 174 à 465) en utilisant les amorces 5'-GCCCTAGGTGAGGCCAAGAAGCAACTT-3' et 5'-GCCCATGGACTGGTCTCATTGGACTTGT-3'. Le produit de PCR (après purification avec le kit QUIAGEN) et le plasmide pEGFP-C1-pLA-WT ont été digérés avec les enzymes EcoNI et PflmI (3 h à 37°C). Les ADNs ont ensuite été déposés sur gel d'agarose, et après migration les bandes souhaitées ont été extraites du gel (kit de Macherey-Nagel). Elles ont ensuite été liguées par la T4 DNA Ligase (Promega) à 14°C sur la nuit avec un rapport vecteur/insert de 1/3. Des bactéries DH5 α ont ensuite été transformées par le produit de ligation. Une colonie a ensuite été mise en maxiculture et le plasmide purifié en préparant une maxiprep avec le kit QIAGEN.

C. Analyses d'ARN

48 h avant l'extraction d'ARN 250 000 cellules HeLa ont étéensemencées par puits de boîte de culture à 6 puits et 400 000 fibroblastes humains ont étéensemencés dans des boîtes de cultures de 10 cm de diamètre. Les extraits totaux d'ARN ont été préparés en utilisant le kit RNeasy® Mini Kit (Qiagen) selon les instructions du fabricant.

La transcription inverse et la qPCR ont été réalisées en une seule étape en utilisant le kit QuantiTect SYBR Green RT-PCR (Qiagen) selon les instructions du fabricant. Les plaques de 384 puits contenant les mix PCR ont été centrifugées 1 min à 2000 rpm avant d'être traitées par le LightCycler 480 System (Roche).

D. Analyses microscopiques

1. Immunofluorescence

Les cellules ont été mises en culture sur lamelles de verre (12 mm de diamètre), elles ont ensuite été fixées par une solution de paraformaldéhyde à 3% dans du PBS pendant 12 min à température ambiante puis lavées avec du PBS. Les cellules fixées ont par la suite été perméabilisées dans du PBS contenant 0,5% de Triton X-100, pendant 5 min à température ambiante, puis elles ont été saturées par du PBS contenant 0,1% de Triton X-100 et 2% de BSA pendant 25 min à température ambiante. Les anticorps primaires et secondaires qui ont été dilués dans du PBS, 0,1% de Triton X-100 et 1% BSA ont été ajoutés aux cellules pendant 30 min à température ambiante. Après marquage de l'ADN au Hoechst, suivi de deux lavages en PBS, les lamelles ont ensuite été montées dans du Mowiol. Les lames ont été observées au microscope confocal LSM 700 (ZEISS) de la plateforme d'imagerie de l'institut BFA.

2. Détermination de la dysmorphie des noyaux

Les cellules ont d'abord été traitées par immunofluorescence pour marquer les protéines ectopiques d'intérêt avec des anticorps anti-FLAG ou les lamines de type A endogènes avec les anticorps anti-LA/C. Ensuite, la dysmorphie des noyaux a été estimée à partir des acquisitions d'images réalisées au microscope confocal, soit directement en observant à l'œil ou indirectement en utilisant le logiciel Image J qui permet de calculer la circularité des noyaux ($4\pi \times \text{surface} / \text{périmètre}^2$).

3. Détection in situ des interactions protéine-protéine par Proximity Ligation Assay (PLA)

Des cellules HeLa ou C2C12 transfectées ont été fixées et incubées avec des couples d'anticorps primaires: [lapin anti-FLAG et souris anti-HA(SREBP1)], [souris anti-GFP et lapin anti-LAP2 α] ou [lapin anti-FLAG et souris anti-émerine] afin de détecter respectivement les interactions [FLAG-LA – HA-SREBP1c], [GFP-LA – LAP2 α] ou [FLAG-LA – émerine]. Les sondes PLA Duolink anti-lapin PLUS et anti-souris MINUS ainsi que les réactifs de détection ont ensuite été utilisés selon les recommandations du fabricant (Olink, Bioscience) et comme décrit précédemment (Barateau and Buendia 2016). La détection des signaux PLA s'est faite au microscope en utilisant le même filtre que pour le fluorophore Cy3. La détection des cellules transfectées exprimant les protéines FLAG-LA a demandé en complément l'ajout d'un autre anticorps secondaire couplé au fluorophore Cy2 (chèvre anti lapin). Voir l'Annexe pour plus de détails concernant cette technique. Des acquisitions d'images ont ensuite été réalisées au microscope confocal LSM 700 (ZEISS) de la plateforme d'imagerie de l'institut de BFA. Les analyses quantitatives des signaux PLA ont été réalisées grâce à un plugin Image J développé par un de nos collaborateurs, Fabien Gerbal (Vadrot et al. 2014). Les résultats obtenus représentaient l'intensité des signaux PLA en fonction de la distance à la périphérie des noyaux. Un signal considéré comme périphérique correspond à un signal situé à une distance de la périphérie équivalent à moins de 10% de la distance de la périphérie au barycentre.

E. Analyses d'extraits protéiques

1. Extraits protéiques totaux

Les extraits protéiques totaux ont été réalisés à partir de cellules cultivées dans des puits de boîtes de culture. Après un lavage bref des cellules au PBS, le tampon d'échantillon de Laemmli (0,062 M Tris, 1% SDS, 10% glycérol, 100 mM DTT, bleu de bromophénol) préalablement chauffé à 95°C est ajouté directement dans le puits, les cellules sont grattées à l'aide d'un cône de pipette puis les lysats sont transférés dans des tubes de 1,5 ml et chauffés 10 min à 95°C. Les lysats cellulaires sont ensuite conservés à -20°C.

2. Extraction de la matrice nucléaire

Les cellules HeLa, les fibroblastes humains et les myoblastes C2C12 ont étéensemencés en puits de boîtes 6 puits. 24 h après transfection pour les cellules HeLa et les C2C12 et 4 jours post-ensemencement pour les fibroblastes humains, les cellules ont été extraites séquentiellement selon

le protocole suivant de Fey et de ses collaborateurs (Fey et al. 1984). Les cellules ont été incubées avec 800 µl de Tampon 1 (100 mM NaCl, 300 mM sucrose, 10 mM PIPES pH 6.8, 3 mM MgCl₂ et 0,1% Triton X-100) pendant 10 min à 4°C, pour relâcher les protéines solubles (S1). Puis, les cellules ont été incubées avec 800 µl de Tampon 2 (300 mM sucrose, 10 mM PIPES pH 6,8, 3 mM MgCl₂, 0.1% Triton X-100 et 250 mM sulfate d'ammonium) pendant 5 min à 4°C, pour relâcher les protéines du cytosquelette (S2). Ensuite, les cellules ont été incubées avec 800 µl de Tampon 3 (50 mM NaCl, 300 mM sucrose, 10 mM PIPES pH 6,8, 3 mM MgCl₂, 0,1% Triton X-100, 100 µg/ml DNAase I bovine pancréatique et 100 µg/ml RNase A pancréatique) pendant 30 min à température ambiante. Le sulfate d'ammonium a ensuite été ajouté au goutte à goutte pour obtenir une concentration finale de 250 mM et les cellules ont été incubées 5 min à température ambiante, le matériel lié à la chromatine a alors été relâché (S3). A noter qu'un cocktail d'inhibiteurs de protéases a été ajouté à tous les tampons. Finalement, le matériel insoluble (Ins) a été resuspendu en ajoutant du tampon d'échantillon de Laemmli (SDS, DTT) directement dans les puits. Les protéines solubles ont été précipitées en ajoutant 0,18% de DOC et 10% de TCA et ensuite resuspendues dans un volume de tampon d'échantillon de Laemmli (SDS, DTT).

3. Western blot

Les extraits protéiques ont été séparés sur des gels de SDS-polyacrylamide et transférés sur des membranes de nitrocellulose dans un tampon (25 M Tris-Base, 192 mM glycine, 0,15% SDS et 20% EtOH) en utilisant un système de transfert semi-sec (BioRad). L'efficacité du transfert des protéines a été déterminée par coloration au rouge ponceau des membranes. Puis, les membranes de nitrocellulose ont été bloquées pendant 1 h dans du tampon TBS (10 mM Tris, pH 8,0, 150 mM NaCl) contenant 5% de lait, incubées avec l'anticorps primaire approprié pendant 1h dans du tampon TBS contenant 1% de lait, lavées 3 fois pendant 5 min avec du tampon TBST (tampon TBS contenant 0,05% de Tween-20), incubées avec des anticorps secondaires couplés à l'enzyme peroxydase HRP pendant 1 h. Après 2 lavages avec du TBST et un lavage au TBS, de l'ECL (enhanced chemiluminescence, West pico System : Pierce) a été utilisé pour détecter les signaux. Au final, les signaux ont été enregistrés au FUJI LAS-400.

VI. Expérimentation animale

A. Injection d'AAV dans le muscle tibial antérieur

Sabrina Batonnet-Pichon est la maîtresse de conférences universitaire de notre laboratoire qui a dirigé les injections d'AAV dans le muscle du tibia antérieur. Des C57BL/6J femelles de 10 semaines ont été commandées chez Janvier Labs. Après avoir reçu un mélange de sédatifs analgésique (Xylazine, 0,1 mg / 10 g de poids de la souris) et d'un anesthésique dissociatif (Kétamine, 1 mg / 10 g de poids de la souris) en intra péritonéale, les souris ont été identifiées par découpe de morceaux d'oreille et mises sur tapis chauffant pour toute la durée de l'expérience. Elles ont ensuite eu leurs pattes rasées avant de leur injecter à l'aide d'une seringue à insuline, 70 µl d'AAV (le volume maximale, correspondant à 1.75.10¹¹ vg/ml), en prenant soin d'insérer l'aiguille dans le tibia antérieur du côté de la cheville, de remonter jusqu'au genou le plus parallèlement possible au tibia,

de commencer à injecter près du genou et de continuer à injecter tout en retirant la seringue afin de garantir une répartition la plus homogène possible des AAV. Les souris ont ensuite été remises dans leur cage pour leur réveil (40 min après l'injection de Kétamine-Xylazine). Une fois réveillées, les souris ont été replacées dans leurs cages ventilées en zone Exempt d'Organismes Pathogènes Spécifiques (EOPS) A2 de l'animalerie. Les souris ont été gardées un mois dans cette zone sans autre manipulations en attendant la dissection.

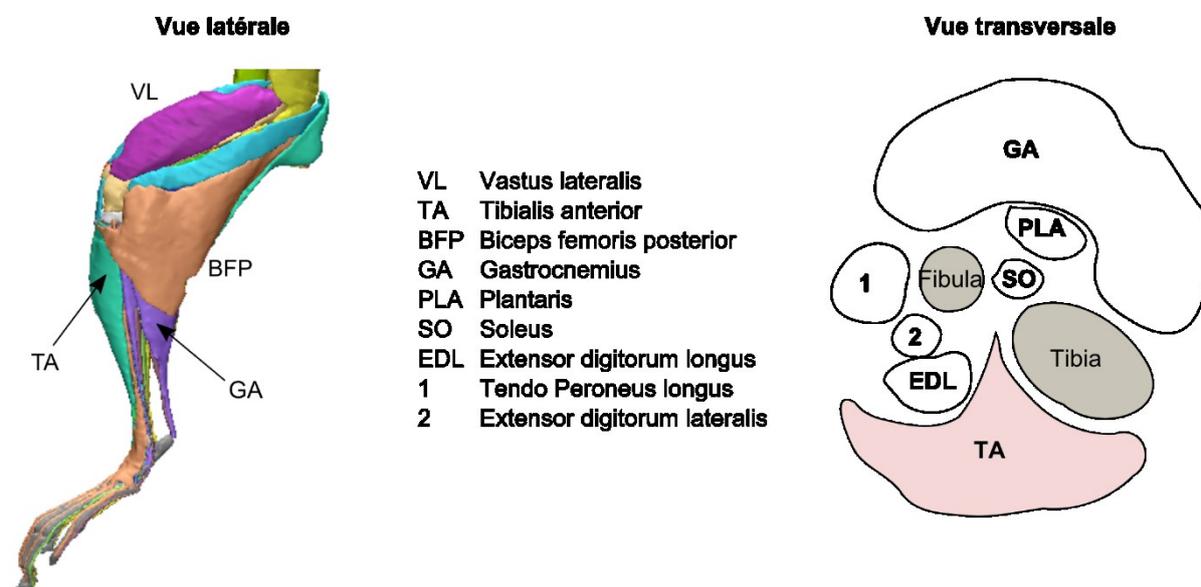


Figure 98 : Schémas en vue latérale et transversale d'une patte arrière de souris
Schéma de gauche adapté de (Charles et al. 2016). Sont représentés dans la vue transversale en gris les os et en rose le tibia antérieur. Les muscles soleus et plantaris ne sont pas visibles sur le schéma de la patte en vue latérale.

B. Congélation du muscle tibial antérieur

Les souris de 15 semaines ont été sacrifiées par dislocation cervicale. Les tibials antérieurs ont ensuite été récupérés par dissection. Plusieurs protocoles ont ensuite été utilisés en fonction de l'utilisation souhaitée des muscles pour la suite. (1) Pour les analyses sur coupes de muscles, les muscles ont été montés sur des support en liège avec de la gomme (Gum tragacanth (Fisher G/1100/48) préparée à 9%), et plongées dans de l'isopentane refroidi dans l'azote pendant au moins 1 min. (2) Pour les analyses sur coupes de muscles des noyaux et plus particulièrement des marquages anti-FLAG, les muscles ont été préalablement fixés dans de la paraformaldéhyde diluée à 4% dans du PBS, avec agitation sur roue à 4°C pendant 1 h, puis incubés sous agitation avec des bains de PBS/sucrose 5% pendant 2 h, PBS/sucrose 10% pendant 3 h, PBS/sucrose 25% sur la nuit à 4°C. Ils ont ensuite été congelés comme décrit plus haut. (3) Pour les analyses d'extraits protéiques et d'ARNm, les muscles ont été congelés directement dans des tubes eppendorf jetés dans l'azote liquide.

C. Coupes du muscle tibial antérieur

Des coupes de 6 µm d'épaisseur ont été coupées au cryostat Leica CM1950 et adhérentes sur des lames superfrost plus (Thermo Scientific). Les lames ont ensuite été stockées à -80°C avant utilisation.

D. Analyses histochimiques du muscle tibial antérieur

1. Immunohistochimie

Les coupes de muscles ont été sorties des congélateurs -80°C et laissées à réchauffer à température ambiante pendant 20 min. Selon les anticorps utilisés les coupes ont été fixées avec 2% de PFA pendant 5 min ou non fixées. Elles ont ensuite été mises à saturer dans une solution de blocage (2% de sérum de chèvre, 2% de BSA dans du PBS), rincées dans du PBS, incubées avec du Fab 1/100 (Jackson Laboratory 115-007-003) dans du PBS, rincées dans du PBS, incubées avec les anticorps primaires dilués dans la solution de blocage sur la nuit à 4°C, rincées 3 fois au PBS, incubées avec l'anticorps secondaire. Finalement, les coupes ont été montées dans du milieu de montage mowiol avec Hoechst et observées au microscope confocal LSM 700 (ZEISS).

2. Hématoxyline/Eosine

Les coupes de muscles ont été sorties des congélateurs -80°C et laissées à réchauffer à température ambiante pendant 20 min. Elles ont ensuite été colorées par Hématoxyline (Harris) pendant 6 min à RT, puis lavées 5 fois à l'eau du robinet, colorées dans l'éosine alcoolique (Sigma-Aldrich HT110116-500ml) pendant 1 min à RT. Puis les coupes ont été déshydratées en les incubant (2 min pour chaque) dans une série d'alcools de degrés croissants (30%, 50%, 70%, 85%, 95%, 100% deux fois). Les coupes ont ensuite été incubées dans deux bains successifs d'Histoclear pour 10 et 15 min. Puis elles ont été montées directement dans du milieu de montage VeraMount sans laisser le temps aux coupes de sécher.

3. Coloration SDH

Les coupes de muscles ont été sorties des congélateurs -80°C et laissées à réchauffer à température ambiante pendant 20 min. Elles ont ensuite été colorées en les incubant dans un tampon phosphate 0,2 M – SDH (05,4% succinate de sodium, 0,1% nitrobleu de tetrazolium) pendant 2 h à 37°C. Les coupes sont ensuite rincées abondamment dans l'eau puis montées dans du mowiol ou utilisées pour une immunofluorescence en complément.

4. Sirius Red

Les coupes de muscles ont été sorties des congélateurs -80°C et fixées 10 min au paraformaldéhyde (4% dilué dans PBS). Après deux lavages à l'eau du robinet et un lavage à l'eau distillée les coupes ont été incubées dans un bain d'EtOH 100% pendant 5 min. Les coupes ont ensuite été mises à sécher pendant au moins 20 min puis incubées dans une solution de rouge sirius 0,3% filtrée (dans de l'acide picrique saturé) pendant 1 h. Après rinçage à l'eau distillée, le marquage a été fixé via l'incubation dans deux bains d'acide acétique 0,5% (5 min chacun). Les coupes ont ensuite été déshydratées par 3 bains d'EtOH 100% puis clarifiées dans deux bains de xylène. Enfin les lames ont été montées avec de l'Eukitt.

5. Oil Red O et Hématoxyline/Eosine

Les coupes de muscles ont été sorties du congélateur -80°C laissées à réchauffer à température ambiante pendant 20 min. Elles ont ensuite été fixées dans 4% de paraformaldéhyde pendant 1 h à RT, rincées à l'eau déionisée 30 sec, puis colorées par Hématoxyline (Harris) pendant 6 min à RT. Après 3 lavages de 30 sec à l'eau déionisée les coupes ont été colorées par la solution d'Oil Red O préparée le jour même (60% de solution stock diluée dans de l'eau déionisée et filtrée) (solution stock : 0,5% Oil Red O (Sigma-Aldrich, O0625) dans 60% de triéthyl phosphate (Sigma-Aldrich,90530)). Les coupes ont été rincées 3 fois 30 sec à l'eau déionisée puis montées sous lamelle avec du mowiol.

E. Analyses d'extraits d'ARNm

Les muscles congelés ont été réduits en poudre via l'utilisation d'un mortier adapté à l'azote liquide. La poudre obtenue a ensuite été répartie pour réaliser les extraits protéiques et les extraits d'ARNm.

L'échantillon a été homogénéisé dans du Trizol (Molecular Research Center, Inc) (1 ml pour 50-100 mg de tissu) au polytron puis centrifugés (12 000 g, 10 min, 4°C). Le surnageant a été récupéré et laissé à température ambiante pendant 5 min, 100 µl de 1-bromo-3-chloropropane par mL de TRI Reagent utilisé a été ajouté. Après avoir vortexé, les échantillons sont centrifugés pour séparer les phases (12 000 g, 15 min, 4°C). La phase aqueuse supérieure est transférée dans un nouveau tube contenant 500 µl de 2-propanol par ml de TRI Reagent utilisé. Après avoir vortexé 5 sec l'échantillon et l'avoir laissé 5 min à température ambiante, il est centrifugé (13 000 g, 20 min, 4°C) et le culot d'ARN est lavé 3 fois avec de l'éthanol 75%. Le culot d'ARN est séché, repris dans 30 µl d'eau RNase free et conservé à -80°C.

Le 1st Strand cDNA synthesis kit for RT-PCR (AMV) (ROCHE: ref 11 483 188 001) a été utilisé selon les recommandations du fabricant pour obtenir les cDNA à partir de 500 ng d'ARNm. Les cDNA ont ensuite été analysés par qPCR avec le kit SYBR Green I Master (ROCHE Ref 04 887 652 001) selon les recommandations du fabricant. Pour chaque plaque, une gamme de dilution de chaque couple d'amorces a été réalisée pour permettre la quantification absolue des gènes cibles et des gènes de référence (18S). Des analyses de quantifications relatives ont ensuite été réalisées par rapport au 18S. Les valeurs ont été normalisées par la médiane des valeurs des muscles exprimant les FLAG-LA WT de chaque expérience.

VII. Liste des amorces d'ARN

Gène	Nom du primer	Séquence 5' 3'	Espèce
18S	18S-F	CGGCTACCACATCCAAGGAA	Souris
18S	18S-R	TATACGCTATTGGAGCTGGAA	Souris
Bhlhb2	For-Bhlhb2-2	TTGTGCGGAAGAAATCTCGAGGCA	Souris
Bhlhb2	Rev-Bhlhb2-2	AGTGTTCATGCTTCGCCAGGTA	Souris
Col1a1	For-CollagenI-1	GGTATGCTTGATCTGTATCTGC	Souris
Col1a1	Rev-CollagenI-1	AGTCCAGTTCTTCATTGCATT	Souris
Col6a1	For-Col6a1-1	GAGCGGAGAGTACTGGATCG	Souris
Col6a1	Rev-Col6a1-1	GCTTCTTTTCCTTGGGGTTTC	Souris
Col6a2	For-Col6a2-1	CCAGCGAAGAAGCTATACAGC	Souris
Col6a2	Rev-Col6a2-1	GGACACCCCTTCTACGTTGT	Souris
Csnk2a2	For-Cnsk2a2-1	GGTACTTCAAGGGACCAGAGC	Souris
Csnk2a2	Rev-Cnsk2a2-1	TTCGAACAAGCTGGTCATAGT	Souris
Dtna	For-Sreb1-3	AATCAGGACCATGCGG	Souris
Dtna	Rev-Sreb1-3	CTCAACCTATGAAAATAAGTTTGC	Souris
Eya1	For-Eya1-1	TGGCCCTACCCCTTCCCCAC	Souris
Eya1	Rev-Eya1-1	TGACAATCCAATTTCCGTCTT	Souris
Flag-laminAC	ForpcmvTag Flag-	ACAAGGATGACGACGACGATAAG	Humain
Flag-laminAC	Rev-Flaglam	GACCCCAAGCGATCAT	Humain
GAPDH	ForGAPDHv1	GTGAAGGTCGGAGTCAACGG	Humain
GAPDH	RevGAPDHv1	ACATGTAACCATGTAGTTGAGGTC	Humain
HA-SREBP1c	Forhasrebpc	TTATGCACCGGATCCCGTC	Humain
HA-SREBP1c	Revhasrebpc	TGGGTCAAATAGGCCAGGGAA	Humain
Hdac1	For-Hdac9-3	CTTGAAGGTGCGGTCCAGGTTA	Souris
Hdac1	Rev-Hdac9-3	GCTGCTACTGACCGAGGATTCT	Souris
Hdac9	For-Dtna-1	GCAGAGATGAGGGCTCAAG	Souris
Hdac9	Rev-Dtna-1	TGACGTTCCAAATGTCCACC	Souris
Hey1	For-Hey1-3	CACGCCACTATGCTCAATGT	Souris
Hey1	Rev-Hey1-3	TCTCCCTCACCTCACTGCT	Souris
Heyl	For-HeyL-3	CAGCCCTCGCAGATGCAA	Souris
Heyl	Rev-HeyL-3	CCAATCGTCGCAATTAGAAAAG	Souris
LA	ForLAendo	ATCACCACCACGGCT	Humain
LA	RevLAendo	CAGAAGAGCCAGAGGAGA	Humain
Lmna	For-Lmna-1	ATAACGGGAAGCAGCGAGAGTT	Souris
Lmna	Rev-Lmna-1	TTGCTGTTCTCTCAGCAGACT	Souris
Mef2d	For-Mef2d-2	AGGGAGGCAAAGGGTTAATGC	Souris
Mef2d	Rev-Mef2d-2	CCTGGCTGAGTAAACTTGGTG	Souris
Myf5	For-Myf5-1	CAACTGCTCTGACGGCAT	Souris
Myf5	Rev-Myf5-1	ACAATGCTGGACAAGCAATCC	Souris
Myh2	For-MyH2-1	AAAGCTCCAAGGACCCTCTT	Souris
Myh2	Rev-MyH2-1	AGCTCATGACTGCTGAACTC	Souris
Myh4	For-MyH4-1	GTCCTTCTCAAACCTTAAAGT	Souris
Myh4	Rev-MyH4-1	ATCTCAGCGTCGGAACATCAT	Souris
Myog	For-Myog-1	GTCCCAACCCAGGAGATCAT	Souris
Myog	Rev-Myog-1	CTGTCCACGATGGACGTAAG	Souris
Ntn4	For-Ntn4-1	CCGACACTCAGGTAATGTGAA	Souris
Ntn4	Rev-Ntn4-1	CATTGACTTCGGCATGGGA	Souris
Sreb1	For-Hdac1-1	TACTACGACGGGATGTTGAAAC	Souris
Sreb1	Rev-Hdac1-1	TCCTCAGCATTGGCTTTGTGA	Souris
SREBP1c	ForSREBP1cendo	GATTGCACTTTCGAAGACAT	Humain
SREBP1c	RevSREBP1cendo	AGGTGGAGACAAGCTGC	Humain
Srf	For-SRF-1	GCAAGGCGCTGATTCAGAC	Souris
Srf	Rev-SRF-1	TCAGATTCGACACCTGGTAG	Souris
Tbx15	For-Tbx15-1	TGTTGCGCACTGACCTTTG	Souris
Tbx15	Rev-Tbx15-1	CCAGTGCTGGAGGTGGTT	Souris
Vim	For-Vimentin-1	CGGCTGCGAGAGAAATTGC	Souris
Vim	Rev-Vimentin-1	CCACTTCCGTTCAAGGTCAAG	Souris

VIII. Liste des anticorps

Protéine	Produit chez	Source	dilution IF	dilution WB	dilution IHC
Actin	souris	millipore		1/5 000	
Desmine	souris	Santa Cruz		1/150	
Emerine	souris	Novocastra (4G5)	1/30	1/700	
FLAG	souris	Sigma-Aldrich	1/400	1/600	
FLAG	lapin	Sigma-Aldrich	1/100	1/650	
GAPDH	lapin	Sigma-Aldrich		1/15 000	
GFP	souris	Roche	1/200	1/1 000	
H3K27ac	lapin	Abcam	1/300	1/1 000	
H3K4me3	lapin	Active motif	1/600		
H3K9ac	lapin	Upstate	1/75		
H3K9me3	lapin	Upstate	1/600	1/1000	
H4K16ac	souris	abcam	1/200	1/200	
HA	souris	Sigma-Aldrich	1/100	1/500	
Histone H1	souris	abcam		1/500	
HP1 α	lapin	généré au laboratoire	1/100	1/200	
LA/C	lapin	généré au laboratoire	1/400	1/5 000	
LA/C	souris	Novocastra	1/200		
LAP2 α	lapin	Immunoquest (IQ175)	1/250	1/2 500	
LB1	lapin	généré au laboratoire	1/250	1/2 000	
Mf20	souris (IgG2b)	DSHB	1/50	1/5 000	
MHI	souris (IgG)	O. Agbulut			1/20
MHIIA	souris (IgG1)	O. Agbulut			1/20
MHIIB	souris (IgM)	O. Agbulut			1/2
MHIIX	souris (IgM)	DSHB (6H1)			1/30
Myogénine	souris	Santa Cruz	1/100	1/1 000	
Nup153	souris	B. Burke	1/100		
Perlecan	rat	millipore			1/300
preLA	chèvre	Santa Cruz (C20)	1/100	1/500	
SREBP1K10	lapin	Santa Cruz	1/60		
α -Tubuline	souris	Sigma-Aldrich	1/500	1/10 000	
γ -tubuline	souris	Sigma-Aldrich	1/300		

anti-	Fluorescence	Produit chez	Source	dilution IF
Souris	Cy3	Chèvre		1/400
Souris	Cy2	Ane		1/60
Lapin	Cy2	Chèvre		1/60
Lapin	Dy595	Ane	Interchim	1/200
Rat	488	Chèvre	Invitrogen (A11006)	1/400
Souris (IgG1)	Dy555	Chèvre	Life Technologies (A21127)	1/500
Souris	488	Chèvre	Invitrogen (948492)	1/400
Lapin	Cy5	Ane		1/150
Souris (IgM)	Cy3	Lapin		1/250

IX. Analyses statistiques

Le test de normalité d'Agostino & Pearson omnibus a été réalisé. Si les données suivaient une loi normale un t-test a ensuite été utilisé sinon les tests de Mann Whitney ou de Kruskal-Wallis ont été réalisés. Les tests de Kruskal-Wallis ont été faits avec le logiciel R en utilisant l'option « pairwise comparison of groups ».

Pour les graphiques, les boîtes de dispersion sont représentées selon la méthode de Tukey, c'est-à-dire que la longueur des « moustaches » vaut 1,5 fois l'écart interquartile. Les histogrammes représentent les moyennes \pm s.e.m.

Tous les résultats de significativité sont représentés selon la nomenclature ci-dessous :

Symbole	p-value
	>0,05
*	<0,05
**	0<0,01
***	<0,001

Références

- Adjei, A A, R B Cohen, W Franklin, C Morris, D Wilson, J R Molina, L J Hanson, et al. 2008. "Phase I Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Study of the Oral, Small-Molecule Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase 1/2 Inhibitor AZD6244 (ARRY-142886) in Patients with Advanced Cancers." *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 26 (13): 2139–46. doi:10.1200/JCO.2007.14.4956.
- Aguilar, A, K M Wagstaff, R Suárez-Sánchez, S Zinker, D A Jans, and B Cisneros. 2015. "Nuclear Localization of the Dystrophin-Associated Protein α -Dystrobrevin through Importin α 2/ β 1 Is Critical for Interaction with the Nuclear Lamina/maintenance of Nuclear Integrity." *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 29 (5): 1842–58. doi:10.1096/fj.14-257147.
- Ahmady, E, S A Deeke, S Rabaa, L Kouri, L Kenney, A F R Stewart, and P G Burgon. 2011. "Identification of a Novel Muscle A-Type Lamin-Interacting Protein (MLIP)." *The Journal of Biological Chemistry* 286 (22). American Society for Biochemistry and Molecular Biology: 19702–13. doi:10.1074/jbc.M110.165548.
- Al-Haboubi, T, D K Shumaker, J Köser, M Wehnert, and B Fahrenkrog. 2011. "Distinct Association of the Nuclear Pore Protein Nup153 with A- and B-Type Lamins." *Nucleus (Austin, Tex.)* 2 (5): 500–509. doi:10.4161/nucl.2.5.17913.
- Ameen, N A., Y Figueroa, and P J. I. Salas. 2001. "Anomalous Apical Plasma Membrane Phenotype in CK8-Deficient Mice Indicates a Novel Role for Intermediate Filaments in the Polarization of Simple Epithelia." *Journal of Cell Science* 114 (Pt 3): 563–75.
- Antonin, W, R Ungricht, and U Kutay. 2011. "Traversing the NPC along the Pore Membrane." *Nucleus*. Taylor & Francis.
- Arimura, T, A Helbling-Leclerc, C Massart, S Varnous, F I Niel, E Lacène, Y Fromes, et al. 2005. "Mouse Model Carrying H222P-Lmna Mutation Develops Muscular Dystrophy and Dilated Cardiomyopathy Similar to Human Striated Muscle Laminopathies." *Human Molecular Genetics* 14 (1): 155–69. doi:10.1093/hmg/ddi017.
- Arimura, T, R Sato, N Machida, H Bando, D-Y Zhan, S Morimoto, R Tanaka, Y Yamane, G Bonne, and A Kimura. 2010. "Improvement of Left Ventricular Dysfunction and of Survival Prognosis of Dilated Cardiomyopathy by Administration of Calcium Sensitizer SCH00013 in a Mouse Model." *Journal of the American College of Cardiology* 55 (14): 1503–5. doi:10.1016/j.jacc.2009.10.065.
- Azibani, F, A Muchir, N Vignier, G Bonne, and A T Bertrand. 2014. "Striated Muscle Laminopathies." *Seminars in Cell & Developmental Biology*, January. Elsevier Ltd, 1–9. doi:10.1016/j.semcdb.2014.01.001.
- Bakay, M, Z Wang, G Melcon, L Schiltz, J Xuan, P Zhao, V Sartorelli, et al. 2006. "Nuclear Envelope Dystrophies Show a Transcriptional Fingerprint Suggesting Disruption of Rb-MyoD Pathways in Muscle Regeneration." *Brain : A Journal of Neurology* 129 (Pt 4): 996–1013. doi:10.1093/brain/awl023.
- Bank, E M, K Ben-Harush, N Wiesel-Motiuk, R Barkan, N Feinstein, O Lotan, O Medalia, and Y Gruenbaum. 2011. "A Laminopathic Mutation Disrupting Lamin Filament Assembly Causes Disease-like Phenotypes in *Caenorhabditis Elegans*." *Molecular Biology of the Cell* 22 (15): 2716–28. doi:10.1091/mbc.E11-01-0064.
- Bär, H, D Fischer, B Goudeau, R A Kley, C S Clemen, P Vicart, H Herrmann, M Vorgerd, and R Schröder. 2005. "Pathogenic Effects of a Novel Heterozygous R350P Desmin Mutation on the Assembly of Desmin Intermediate Filaments in Vivo and in Vitro." *Human Molecular Genetics* 14 (10): 1251–60. doi:10.1093/hmg/ddi136.
- Barateau, A, and B Buendia. 2016. "In Situ Detection of Interactions Between Nuclear Envelope Proteins and Partners." *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 1411: 147–58. doi:10.1007/978-1-4939-3530-7_9.
- Barrowman, J, C Hamblet, C M George, and S Michaelis. 2008. "Analysis of Prelamin A Biogenesis Reveals the Nucleus to Be a CaaX Processing Compartment." *Molecular Biology of the Cell* 19 (12): 5398–5408. doi:10.1091/mbc.E08-07-0704.
- Bartz, R R, and C A Piantadosi. 2010. "Clinical Review: Oxygen as a Signaling Molecule." *Critical Care (London, England)* 14 (5): 234. doi:10.1186/cc9185.
- Bassel-Duby, R, and E N Olson. 2006. "Signaling Pathways in Skeletal Muscle Remodeling." *Annual Review of Biochemistry* 75: 19–37. doi:10.1146/annurev.biochem.75.103004.142622.
- Beaulieu, J-M, M D Nguyen, and J-P Julien. 1999. "Late Onset of Motor Neurons in Mice Overexpressing Wild-Type Peripherin." *The Journal of Cell Biology* 147 (3): 531–44.

- Benedetti, S, I Menditto, M Degano, C Rodolico, L Merlini, A D'Amico, L Palmucci, et al. 2007. "Phenotypic Clustering of Lamin A/C Mutations in Neuromuscular Patients." *Neurology* 69 (12): 1285–92. doi:10.1212/01.wnl.0000261254.87181.80.
- Bengoechea-Alonso, MT, and J Ericsson. 2009. "A Phosphorylation Cascade Controls the Degradation of Active SREBP1." *The Journal of Biological Chemistry* 284 (9): 5885–95. doi:10.1074/jbc.M807906200.
- Bengtsson, L. 2007. "What MAN1 Does to the Smads. TGFbeta/BMP Signaling and the Nuclear Envelope." *The FEBS Journal* 274 (6): 1374–82.
- Benjamin, D, M Colombi, C Moroni, and M N Hall. 2011. "Rapamycin Passes the Torch: A New Generation of mTOR Inhibitors." *Nature Reviews. Drug Discovery* 10 (11): 868–80. doi:10.1038/nrd3531.
- Berger, R, L Theodor, J Shoham, E Gokkel, F Brok-Simoni, K B. Avraham, N G. Copeland, N A. Jenkins, G Rechavi, and A J. Simon. 1996. "The Characterization and Localization of the Mouse Thymopoietin/lamina-Associated Polypeptide 2 Gene and Its Alternatively Spliced Products." *Genome Research* 6 (5): 361–70.
- Bertrand, A T, L Renou, A Papadopoulos, M Beuvin, E Lacène, C Massart, C Ottolenghi, et al. 2012. "DelK32-Lamin A/C Has Abnormal Location and Induces Incomplete Tissue Maturation and Severe Metabolic Defects Leading to Premature Death." *Human Molecular Genetics* 21 (5): 1037–48. doi:10.1093/hmg/ddr534.
- Bertrand, A T, S Ziaei, C Ehret, H Duchemin, K Mamchaoui, A Bigot, M Mayer, et al. 2014. "Cellular Microenvironments Reveal Defective Mechanosensing Responses and Elevated YAP Signaling in LMNA-Mutated Muscle Precursors." *Journal of Cell Science* 127 (Pt 13). The Company of Biologists Ltd: 2873–84. doi:10.1242/jcs.144907.
- Bilak, S R., S W. Sernett, M M. Bilak, R M. Bellin, M H. Stromer, T W. Huiatt, and R M. Robson. 1998. "Properties of the Novel Intermediate Filament Protein Synemin and Its Identification in Mammalian Muscle." *Archives of Biochemistry and Biophysics* 355 (1): 63–76. doi:10.1006/abbi.1998.0702.
- Blizzard, C A, A E King, J Vickers, and T Dickson. 2013. "Cortical Murine Neurons Lacking the Neurofilament Light Chain Protein Have an Attenuated Response to Injury in Vitro." *Journal of Neurotrauma* 30 (22): 1908–18. doi:10.1089/neu.2013.2850.
- Blondel, S, A-L Egesipe, P Picardi, A-L Jaskowiak, M Notarnicola, J Ragot, J Tournois, et al. 2016. "Drug Screening on Hutchinson Gilford Progeria Pluripotent Stem Cells Reveals Aminopyrimidines as New Modulators of Farnesylation." *Cell Death & Disease* 7 (January). Macmillan Publishers Limited: e2105. doi:10.1038/cddis.2015.374.
- Bonne, G, M R Di Barletta, S Varnous, H-M Bécane, E-H Hammouda, L Merlini, F Muntoni, et al. 1999. "Mutations in the Gene Encoding Lamin A/C Cause Autosomal Dominant Emery-Dreifuss Muscular Dystrophy." *Nature Genetics* 21 (3). Nature Publishing Group: 285–88. doi:10.1038/6799.
- Bonne, G, E Mercuri, A Muchir, J-A Urtizberea, H-M Bécane, D Recan, L Merlini, et al. 2000. "Clinical and Molecular Genetic Spectrum of Autosomal Dominant Emery-Dreifuss Muscular Dystrophy due to Mutations of the Lamin A/C Gene." *Annals of Neurology* 48 (2): 170–80.
- Borutinskaite, V V, K-E Magnusson, and R Navakauskiene. 2011. "α-Dystrobrevin Distribution and Association with Other Proteins in Human Promyelocytic NB4 Cells Treated for Granulocytic Differentiation." *Molecular Biology Reports* 38 (5): 3001–11. doi:10.1007/s11033-010-9965-9.
- Brachner, A, S Reipert, R Foisner, and J Gotzmann. 2005. "LEM2 Is a Novel MAN1-Related Inner Nuclear Membrane Protein Associated with A-Type Lamins." *Journal of Cell Science* 118 (Pt 24): 5797–5810. doi:10.1242/jcs.02701.
- Braun, T, M A Rudnicki, H-H Arnold, and R Jaenisch. 1992. "Targeted Inactivation of the Muscle Regulatory Gene Myf-5 Results in Abnormal Rib Development and Perinatal Death." *Cell* 71 (3): 369–82.
- Broers, J L V, H J H Kuijpers, C Ostlund, H J Worman, J Endert, and F C S Ramaekers. 2005. "Both Lamin A and Lamin C Mutations Cause Lamina Instability as Well as Loss of Internal Nuclear Lamin Organization." *Experimental Cell Research* 304 (2): 582–92. doi:10.1016/j.yexcr.2004.11.020.
- Broers, J L V, B M Machiels, G J J M V Eys, H J H Kuijpers, E M M Manders, R van Driel, and F C S Ramaekers. 1999. "Dynamics of the Nuclear Lamina as Monitored by GFP-Tagged A-Type Lamins." *Journal of Cell Science* 112 (Pt 2 (October)): 3463–75.
- Broers, J L V, E A G Peeters, H J H Kuijpers, J Endert, C V C Bouten, C W J Oomens, F P T Baaijens, and F C S Ramaekers. 2004. "Decreased Mechanical Stiffness in LMNA-/- Cells Is Caused by Defective Nucleo-Cytoskeletal Integrity: Implications for the Development of Laminopathies." *Human Molecular Genetics* 13 (21): 2567–80. doi:10.1093/hmg/ddh295.
- Brown, S C, S Torelli, I Ugo, F De Biasia, E V Howman, E Poon, J Britton, K E Davies, and F Muntoni. 2005. "Syncoilin Upregulation in Muscle of Patients with Neuromuscular Disease." *Muscle & Nerve* 32 (6): 715–25. doi:10.1002/mus.20431.
- Bruston, F, E Delbarre, C Ostlund, H J Worman, B Buendia, and I Duband-Goulet. 2010. "Loss of a DNA Binding Site within the Tail of Prelamin A Contributes to Altered Heterochromatin Anchorage by Progerin." *FEBS Letters* 584 (14): 2999–

3004. doi:10.1016/j.febslet.2010.05.032.
- Buas, M F, S Kabak, and T Kadesch. 2010. "The Notch Effector Hey1 Associates with Myogenic Target Genes to Repress Myogenesis." *Journal of Biological Chemistry* 285 (2). American Society for Biochemistry and Molecular Biology: 1249–58. doi:10.1074/jbc.M109.046441.
- Buendia, B, J-c Courvalin, and P Collas. 2001. "Dynamics of the Nuclear Envelope at Mitosis and during Apoptosis." *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS* 58 (12–13): 1781–89.
- Buendia, B, A Santa-Maria, and J-c Courvalin. 1999. "Caspase-Dependent Proteolysis of Integral and Peripheral Proteins of Nuclear Membranes and Nuclear Pore Complex Proteins during Apoptosis." *Journal of Cell Science* 112 (Pt 1 (June): 1743–53.
- Cai, M, Y Huang, R Ghirlando, K L Wilson, R Craigie, and G M Clore. 2001. "Solution Structure of the Constant Region of Nuclear Envelope Protein LAP2 Reveals Two LEM-Domain Structures: One Binds BAF and the Other Binds DNA." *The EMBO Journal* 20 (16): 4399–4407. doi:10.1093/emboj/20.16.4399.
- Cao, H, and R A Hegele. 2000. "Nuclear Lamin A/C R482Q Mutation in Canadian Kindreds with Dunnigan-Type Familial Partial Lipodystrophy." *Human Molecular Genetics* 9 (1): 109–12.
- Cao, K, J J Graziotto, C D Blair, J R Mazzulli, M R Erdos, D Krainc, and F S Collins. 2011. "Rapamycin Reverses Cellular Phenotypes and Enhances Mutant Protein Clearance in Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome Cells." *Science Translational Medicine* 3 (89): 89ra58. doi:10.1126/scitranslmed.3002346.
- Capell, B C, M R Erdos, J P Madigan, J J Fiordalisi, R Varga, K N Conneely, L B Gordon, C J Der, A D Cox, and F S Collins. 2005. "Inhibiting Farnesylation of Progerin Prevents the Characteristic Nuclear Blebbing of Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (36): 12879–84. doi:10.1073/pnas.0506001102.
- Capetanaki, Y, S Papathanasiou, A Diokmetzidou, G Vatsellas, and M Tsikitis. 2015. "Desmin Related Disease: A Matter of Cell Survival Failure." *Current Opinion in Cell Biology* 32 (February): 113–20. doi:10.1016/j.ceb.2015.01.004.
- Caron, M, M Auclair, B Donadille, V Béréziat, B Guerci, M Laville, H Narbonne, et al. 2007. "Human Lipodystrophies Linked to Mutations in A-Type Lamins and to HIV Protease Inhibitor Therapy Are Both Associated with Prelamin A Accumulation, Oxidative Stress and Premature Cellular Senescence." *Cell Death and Differentiation* 14 (10): 1759–67. doi:10.1038/sj.cdd.4402197.
- Cattin, M-E, A T Bertrand, S Schlossarek, M-C Le Bihan, S Skov Jensen, C Neuber, C Crocini, et al. 2013. "Heterozygous Lmna^{delK32} Mice Develop Dilated Cardiomyopathy through a Combined Pathomechanism of Haploinsufficiency and Peptide Toxicity." *Human Molecular Genetics* 22 (15): 3152–64. doi:10.1093/hmg/ddt172.
- Cau, P, C Navarro, K Harhour, P Roll, S Sigaudy, E Kaspi, S Perrin, A De Sandre-Giovannoli, and N Lévy. 2014. "Nuclear Matrix, Nuclear Envelope and Premature Aging Syndromes in a Translational Research Perspective." *Seminars in Cell & Developmental Biology*, March. doi:10.1016/j.semcdb.2014.03.022.
- Caux, F, E Dubosclard, O Lascols, B Buendia, O Chazouillères, A Cohen, J-C Courvalin, 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." *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 88 (3): 1006–13. doi:10.1210/jc.2002-021506.
- Cenni, V, J Bertacchini, F Beretti, G Lattanzi, A Bavelloni, M Riccio, M Ruzzene, et al. 2008. "Lamin A Ser404 Is a Nuclear Target of Akt Phosphorylation in C2C12 Cells." *Journal of Proteome Research* 7 (11): 4727–35. doi:10.1021/pr800262g.
- Cenni, V, P Sabatelli, E Mattioli, S Marmiroli, C Capanni, A Ognibene, S Squarzone, et al. 2005. "Lamin A N-Terminal Phosphorylation Is Associated with Myoblast Activation: Impairment in Emery-Dreifuss Muscular Dystrophy." *Journal of Medical Genetics* 42 (3). BMJ Publishing Group Ltd: 214–20. doi:10.1136/jmg.2004.026112.
- Charles, J P, O Cappellari, A J Spence, J R Hutchinson, and D J Wells. 2016. "Musculoskeletal Geometry, Muscle Architecture and Functional Specialisations of the Mouse Hindlimb." Edited by William D Phillips. *PLOS ONE* 11 (4). Public Library of Science: e0147669. doi:10.1371/journal.pone.0147669.
- Chaturvedi, P, R Khanna, and V K Parnaik. 2012. "Ubiquitin Ligase RNF123 Mediates Degradation of Heterochromatin Protein 1 α and β in Lamin A/C Knock-down Cells." *PLoS One* 7 (10): e47558. doi:10.1371/journal.pone.0047558.
- Chaturvedi, P, and V K Parnaik. 2010. "Lamin A Rod Domain Mutants Target Heterochromatin Protein 1 α and β for Proteasomal Degradation by Activation of F-Box Protein, FBXW10." *PLoS One* 5 (5): e10620. doi:10.1371/journal.pone.0010620.
- Chen, C-Y, Y-H Chi, R A Mutalif, M F Starost, T G Myers, S A Anderson, C L Stewart, and K-T Jeang. 2012. "Accumulation of the Inner Nuclear Envelope Protein Sun1 Is Pathogenic in Progeric and Dystrophic Laminopathies." *Cell* 149 (3): 565–77. doi:10.1016/j.cell.2012.01.059.

- Chen, L, L Lee, B A Kudlow, H G Dos Santos, O Sletvold, Y Shafeghati, E G Botha, et al. 2003. "LMNA Mutations in Atypical Werner's Syndrome." *Lancet* 362 (9382): 440–45. doi:10.1016/S0140-6736(03)14069-X.
- Choi, J C, A Muchir, W Wu, S Iwata, S Homma, J P Morrow, and H J Worman. 2012. "Temsirolimus Activates Autophagy and Ameliorates Cardiomyopathy Caused by Lamin A/C Gene Mutation." *Science Translational Medicine* 4 (144): 144ra102. doi:10.1126/scitranslmed.3003875.
- Ciska, M, K Masuda, and S Moreno Díaz de la Espina. 2013. "Lamin-like Analogues in Plants: The Characterization of NMCP1 in *Allium Cepa*." *Journal of Experimental Botany* 64 (6): 1553–64. doi:10.1093/jxb/ert020.
- Clawson, G A, L L Norbeck, C L Hatem, C Rhodes, P Amiri, J H McKerrow, S R Patierno, and G Fiskum. 1992. "Ca(2+)-Regulated Serine Protease Associated with the Nuclear Scaffold." *Cell Growth & Differentiation: The Molecular Biology Journal of the American Association for Cancer Research* 3 (11): 827–38.
- Clevers, H. 2006. "Wnt/beta-Catenin Signaling in Development and Disease." *Cell* 127 (3): 469–80. doi:10.1016/j.cell.2006.10.018.
- Cohen, T V, V F Gnocchi, J E Cohen, A Phadke, H Liu, J a Ellis, R Foisner, C L Stewart, P S Zammit, and T a Partridge. 2013. "Defective Skeletal Muscle Growth in Lamin A/C-Deficient Mice Is Rescued by Loss of Lap2a." *Human Molecular Genetics* 22 (14): 2852–69. doi:10.1093/hmg/ddt135.
- Collas, P. 1999. "Sequential PKC- and Cdc2-Mediated Phosphorylation Events Elicit Zebrafish Nuclear Envelope Disassembly." *Journal of Cell Science* 112 (Pt 6 (March): 977–87.
- Collas, P, E G Lund, and A R Oldenburg. 2014. "Closing the (Nuclear) Envelope on the Genome: How Nuclear Lamins Interact with Promoters and Modulate Gene Expression." *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology* 36 (1): 75–83. doi:10.1002/bies.201300138.
- Colucci-Guyon, E, M Giménez Y Ribotta, T Maurice, C Babinet, and A Privat. 1999. "Cerebellar Defect and Impaired Motor Coordination in Mice Lacking Vimentin." *Glia* 25 (1): 33–43.
- Columbaro, M, C Capanni, E Mattioli, G Novelli, V K Parnaik, S Squarzone, N M Maraldi, and G Lattanzi. 2005. "Rescue of Heterochromatin Organization in Hutchinson-Gilford Progeria by Drug Treatment." *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 62 (22): 2669–78. doi:10.1007/s00018-005-5318-6.
- Crisp, M, Q Liu, K Roux, J B Rattner, C Shanahan, B Burke, P D Stahl, and D Hodzic. 2006. "Coupling of the Nucleus and Cytoplasm: Role of the LINC Complex." *The Journal of Cell Biology* 172 (1): 41–53. doi:10.1083/jcb.200509124.
- Csoka, A B, H Cao, P J Sammak, D Constantinescu, G P Schatten, and R A Hegele. 2004. "Novel Lamin A/C Gene (LMNA) Mutations in Atypical Progeroid Syndromes." *Journal of Medical Genetics* 41 (4). BMJ Publishing Group Ltd: 304–8. doi:10.1136/jmg.2003.015651.
- Cui, L, J Miao, T Furuya, Q Fan, X Li, P K Rathod, X-Z Su, and L Cui. 2008. "Histone Acetyltransferase Inhibitor Anacardic Acid Causes Changes in Global Gene Expression during in Vitro Plasmodium Falciparum Development." *Eukaryotic Cell* 7 (7): 1200–1210. doi:10.1128/EC.00063-08.
- D'Amico, A, G Haliloglu, P Richard, B Talim, S Maugren, A Ferreiro, P Guicheney, et al. 2005. "Two Patients with 'Dropped Head Syndrome' due to Mutations in LMNA or SEPN1 Genes." *Neuromuscular Disorders: NMD* 15 (8): 521–24. doi:10.1016/j.nmd.2005.03.006.
- Dahl, K N, P Scaffidi, M F Islam, A G Yodh, K L Wilson, and T Misteli. 2006. "Distinct Structural and Mechanical Properties of the Nuclear Lamina in Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (27): 10271–76. doi:10.1073/pnas.0601058103.
- Daigle, N, J Beaudouin, L Hartnell, G Imreh, E Hallberg, J Lippincott-Schwartz, and J Ellenberg. 2001. "Nuclear Pore Complexes Form Immobile Networks and Have a Very Low Turnover in Live Mammalian Cells." *The Journal of Cell Biology* 154 (1): 71–84.
- De Sandre-Giovannoli, A, R Bernard, P Cau, CI Navarro, J Amiel, I Boccaccio, S Lyonnet, et al. 2003. "Lamin a Truncation in Hutchinson-Gilford Progeria." *Science (New York, N.Y.)* 300 (5628): 2055. doi:10.1126/science.1084125.
- De Sandre-Giovannoli, A, M Chaouch, S Kozlov, J-Mi Vallat, M Tazir, N Kassouri, P Szepietowski, 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." *American Journal of Human Genetics* 70 (3): 726–36. doi:10.1086/339274.
- Decaudain, A, M-C Vantyghem, B Guerci, A-C Hécart, M Auclair, Y Reznik, H Narbonne, et al. 2007. "New Metabolic Phenotypes in Laminopathies: LMNA Mutations in Patients with Severe Metabolic Syndrome." *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 92 (12): 4835–44. doi:10.1210/jc.2007-0654.
- Dechat, T, A Gajewski, B Korbei, D Gerlich, N Daigle, T Haraguchi, K Furukawa, J Ellenberg, and R Foisner. 2004. "LAP2alpha and BAF Transiently Localize to Telomeres and Specific Regions on Chromatin during Nuclear Assembly." *Journal of Cell Science* 117 (Pt 25): 6117–28. doi:10.1242/jcs.01529.

- Dechat, T, B Korbei, O A Vaughan, S Vlcek, C J Hutchison, and R Foisner. 2000. "Lamina-Associated Polypeptide 2alpha Binds Intranuclear A-Type Lamins." *Journal of Cell Science* 113 Pt 19 (October): 3473–84.
- Delbarre, E, M Tramier, M Coppey-Moisand, C Gaillard, J-C Courvalin, and B Buendia. 2006. "The Truncated Prelamin A in Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome Alters Segregation of A-Type and B-Type Lamin Homopolymers." *Human Molecular Genetics* 15 (7): 1113–22. doi:10.1093/hmg/ddl026.
- Demmerle, J, A J Koch, and J M Holaska. 2012. "The Nuclear Envelope Protein Emerin Binds Directly to Histone Deacetylase 3 (HDAC3) and Activates HDAC3 Activity." *Journal of Biological Chemistry* 287 (26). American Society for Biochemistry and Molecular Biology: 22080–88. doi:10.1074/jbc.M111.325308.
- Dessalle, K, V Euthine, S Chanon, J Delarichaudy, I Fujii, S Rome, H Vidal, G Nemoz, C Simon, and E Lefai. 2012. "SREBP-1 Transcription Factors Regulate Skeletal Muscle Cell Size by Controlling Protein Synthesis through Myogenic Regulatory Factors." *PLoS One* 7 (11): e50878. doi:10.1371/journal.pone.0050878.
- Dhe-Paganon, S, E D Werner, Y-I Chi, and S E Shoelson. 2002. "Structure of the Globular Tail of Nuclear Lamin." *The Journal of Biological Chemistry* 277 (20): 17381–84. doi:10.1074/jbc.C200038200.
- Dittmer, T, and T Misteli. 2011. "The Lamin Protein Family." *Genome Biology* 12 (5): 222. doi:10.1186/gb-2011-12-5-222.
- Dokmanovic, M, C Clarke, and P A Marks. 2007. "Histone Deacetylase Inhibitors: Overview and Perspectives." *Molecular Cancer Research : MCR* 5 (10). Molecular Cancer Research: 981–89. doi:10.1158/1541-7786.MCR-07-0324.
- Dooley, K A, S Millinder, and T F Osborne. 1998. "Sterol Regulation of 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzyme A Synthase Gene through a Direct Interaction between Sterol Regulatory Element Binding Protein and the Trimeric CCAAT-Binding Factor/nuclear Factor Y." *The Journal of Biological Chemistry* 273 (3): 1349–56.
- Dorner, D, S Vlcek, N Foeger, A Gajewski, C Makolm, J Gotzmann, C J Hutchison, and R Foisner. 2006. "Lamina-Associated Polypeptide 2alpha Regulates Cell Cycle Progression and Differentiation via the Retinoblastoma-E2F Pathway." *The Journal of Cell Biology* 173 (1): 83–93. doi:10.1083/jcb.200511149.
- Dreesen, O, Al Chojnowski, P F Ong, T Y Zhao, J E Common, D Lunny, E B Lane, et al. 2013. "Lamin B1 Fluctuations Have Differential Effects on Cellular Proliferation and Senescence." *The Journal of Cell Biology* 200 (5): 605–17. doi:10.1083/jcb.201206121.
- Dreuillet, C, M Harper, J Tillit, M Kress, and M Ernoult-Lange. 2008. "Mislocalization of Human Transcription Factor MOK2 in the Presence of Pathogenic Mutations of Lamin A/C." *Biology of the Cell / under the Auspices of the European Cell Biology Organization* 100 (1): 51–61. doi:10.1042/BC20070053.
- Duband-Goulet, I, S Woerner, S Gasparini, W Attanda, E Kondé, C Tellier-Lebègue, C T Craescu, et al. 2011. "Subcellular Localization of SREBP1 Depends on Its Interaction with the C-Terminal Region of Wild-Type and Disease Related A-Type Lamins." *Experimental Cell Research* 317 (20). Elsevier Inc.: 2800–2813. doi:10.1016/j.yexcr.2011.09.012.
- Dubinska-Magiera, M, M Zaremba-Czogalla, and R Rzepecki. 2013. "Muscle Development, Regeneration and Laminopathies: How Lamins or Lamina-Associated Proteins Can Contribute to Muscle Development, Regeneration and Disease." *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS* 70 (15): 2713–41. doi:10.1007/s00018-012-1190-3.
- Dutour, A, P Roll, B Gaborit, S Courrier, M-C Alessi, D-Al Tregouet, F Angelis, et al. 2011. "High Prevalence of Laminopathies among Patients with Metabolic Syndrome." *Human Molecular Genetics* 20 (19): 3779–86. doi:10.1093/hmg/ddr294.
- Dwyer, N, and G Blobel. 1976. "A Modified Procedure for the Isolation of a Pore Complex-Lamina Fraction from Rat Liver Nuclei." *The Journal of Cell Biology* 70 (3): 581–91.
- Eckes, B, E Colucci-Guyon, H Smola, S Nodder, C Babinet, T Krieg, and P Martin. 2000. "Impaired Wound Healing in Embryonic and Adult Mice Lacking Vimentin." *Journal of Cell Science* 113 (Pt 1 (July): 2455–62.
- Eckes, B, D Dogic, E Colucci-Guyon, N Wang, A Maniotis, D Ingber, A Merckling, et al. 1998. "Impaired Mechanical Stability, Migration and Contractile Capacity in Vimentin-Deficient Fibroblasts." *Journal of Cell Science* 111 (Pt 1 (July): 1897–1907.
- Eggert, M, N Radomski, D Linder, D Tripier, P Traub, and E Jost. 1993. "Identification of Novel Phosphorylation Sites in Murine A-Type Lamins." *European Journal of Biochemistry / FEBS* 213 (2): 659–71.
- Eggert, M, N Radomski, D Tripier, P Traub, and E Jost. 1991. "Identification of Phosphorylation Sites on Murine Nuclear Lamin C by RP-HPLC and Microsequencing." *FEBS Letters* 292 (1–2): 205–9.
- Engler, A J, C Carag-Krieger, C P Johnson, M Raab, H-Y Tang, D W Speicher, J W Sanger, J M Sanger, and D E Discher. 2008. "Embryonic Cardiomyocytes Beat Best on a Matrix with Heart-like Elasticity: Scar-like Rigidity Inhibits Beating." *Journal of Cell Science* 121 (Pt 22): 3794–3802. doi:10.1242/jcs.029678.
- Engler, A J, M A Griffin, S Sen, C G Bönnemann, H L Sweeney, and D E Discher. 2004. "Myotubes Differentiate Optimally on Substrates with Tissue-like Stiffness: Pathological Implications for Soft or Stiff Microenvironments." *The Journal of Cell Biology* 166 (6): 877–87. doi:10.1083/jcb.200405004.

- Eriksson, M, W T Brown, L B Gordon, M W Glynn, J Singer, L Scott, M R Erdos, et al. 2003. "Recurrent de Novo Point Mutations in Lamin A Cause Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome." *Nature* 423 (6937): 293–98. doi:10.1038/nature01629.
- Espada, J, I Varela, I Flores, A P Ugalde, J Cadiñanos, A M Pendás, C L Stewart, et al. 2008. "Nuclear Envelope Defects Cause Stem Cell Dysfunction in Premature-Aging Mice." *The Journal of Cell Biology* 181 (1): 27–35. doi:10.1083/jcb.200801096.
- Euskirchen, G M, R K Auerbach, E Davidov, T A Gianoulis, G Zhong, J Rozowsky, N Bhardwaj, M B Gerstein, and M Snyder. 2011. "Diverse Roles and Interactions of the SWI/SNF Chromatin Remodeling Complex Revealed Using Global Approaches." Edited by Gregory P. Copenhaver. *PLoS Genetics* 7 (3). Public Library of Science: e1002008. doi:10.1371/journal.pgen.1002008.
- Fadini, G P, G Ceolotto, E Pagnin, S de Kreutzenberg, and A Avogaro. 2011. "At the Crossroads of Longevity and Metabolism: The Metabolic Syndrome and Lifespan Determinant Pathways." *Aging Cell* 10 (1): 10–17. doi:10.1111/j.1474-9726.2010.00642.x.
- Fatkin, D, C MacRae, T Sasaki, M R Wolff, M Porcu, M Frenneaux, J Atherton, et al. 1999. "Missense Mutations in the Rod Domain of the Lamin A/C Gene as Causes of Dilated Cardiomyopathy and Conduction-System Disease." *The New England Journal of Medicine* 341 (23): 1715–24. doi:10.1056/NEJM199912023412302.
- Favreau, C, D Higuete, J-C Courvalin, and B Buendia. 2004. "Expression of a Mutant Lamin A That Causes Emery-Dreifuss Muscular Dystrophy Inhibits in Vitro Differentiation of C2C12 Myoblasts." *Molecular and Cellular Biology* 24 (4): 1481–92.
- Fawcett, D W. 1966. "On the Occurrence of a Fibrous Lamina on the Inner Aspect of the Nuclear Envelope in Certain Cells of Vertebrates." *The American Journal of Anatomy* 119 (1): 129–45. doi:10.1002/aja.1001190108.
- Ferraro, A, M Eufemi, L Cervoni, R Marinetti, and Cmende Turano. 1989. "Glycosylated Forms of Nuclear Lamins." *FEBS Letters* 257 (2): 241–46.
- Fey, E G, K M Wan, and S Penman. 1984. "Epithelial Cytoskeletal Framework and Nuclear Matrix-Intermediate Filament Scaffold: Three-Dimensional Organization and Protein Composition." *The Journal of Cell Biology* 98 (6): 1973–84.
- Fisher, D Z, N Chaudhary, and G Blobel. 1986. "cDNA Sequencing of Nuclear Lamins A and C Reveals Primary and Secondary Structural Homology to Intermediate Filament Proteins." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83 (17): 6450–54.
- Florini, J R, D Z Ewton, and K A Magri. 1991. "Hormones, Growth Factors, and Myogenic Differentiation." *Annual Review of Physiology* 53 (January): 201–16. doi:10.1146/annurev.ph.53.030191.001221.
- Frangioni, J V, and B G Neel. 1993. "Use of a General Purpose Mammalian Expression Vector for Studying Intracellular Protein Targeting: Identification of Critical Residues in the Nuclear Lamin A/C Nuclear Localization Signal." *Journal of Cell Science* 105 (Pt 2 (June): 481–88.
- Frock, R L, B A Kudlow, A M Evans, S A Jameson, S D Hauschka, and B K Kennedy. 2006. "Lamin A/C and Emerin Are Critical for Skeletal Muscle Satellite Cell Differentiation." *Genes & Development* 20 (4): 486–500. doi:10.1101/gad.1364906.
- Fuentes-Mera, L, R Rodríguez-Muñoz, R González-Ramírez, F García-Sierra, E González, D Mornet, and B Cisneros. 2006. "Characterization of a Novel Dp71 Dystrophin-Associated Protein Complex (DAPC) Present in the Nucleus of HeLa Cells: Members of the Nuclear DAPC Associate with the Nuclear Matrix." *Experimental Cell Research* 312 (16): 3023–35. doi:10.1016/j.yexcr.2006.06.002.
- Furukawa, K, and Y Hotta. 1993. "cDNA Cloning of a Germ Cell Specific Lamin B3 from Mouse Spermatocytes and Analysis of Its Function by Ectopic Expression in Somatic Cells." *The EMBO Journal* 12 (1): 97–106.
- Furukawa, K, H Inagaki, and Y Hotta. 1994. "Identification and Cloning of an mRNA Coding for a Germ Cell-Specific A-Type Lamin in Mice." *Experimental Cell Research* 212 (2): 426–30. doi:10.1006/excr.1994.1164.
- Gajewski, A, E Csaszar, and R Foisner. 2004. "A Phosphorylation Cluster in the Chromatin-Binding Region Regulates Chromosome Association of LAP2." *Journal of Biological Chemistry* 279 (34): 35813–21. doi:10.1074/jbc.M402546200.
- Galcheva-Gargova, Z, and L Stateva. 1988. "Immunological Identification of Two Lamina-like Proteins in Saccharomyces Cerevisiae." *Bioscience Reports* 8 (3): 287–91.
- Galiová, G, E Bártoová, I Raska, J Krejčí, and S Kozubek. 2008. "Chromatin Changes Induced by Lamin A/C Deficiency and the Histone Deacetylase Inhibitor Trichostatin A." *European Journal of Cell Biology* 87 (5): 291–303. doi:10.1016/j.ejcb.2008.01.013.
- Galisson, F, L Mahrouche, M Courcelles, E Bonneil, S Meloche, M K Chelbi-Alix, and P Thibault. 2011. "A Novel Proteomics Approach to Identify SUMOylated Proteins and Their Modification Sites in Human Cells." *Molecular & Cellular Proteomics : MCP* 10 (2): M110.004796. doi:10.1074/mcp.M110.004796.

- García-Pelagio, K P, J Muriel, A O'Neill, P F Desmond, R M Lovering, L Lund, M Bond, and R J Bloch. 2015. "Myopathic Changes in Murine Skeletal Muscle Lacking Synemin." *American Journal of Physiology. Cell Physiology* 308 (6): C448-62. doi:10.1152/ajpcell.00331.2014.
- Gareau, J R, and C D Lima. 2010. "The SUMO Pathway: Emerging Mechanisms That Shape Specificity, Conjugation and Recognition." *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 11 (12): 861-71. doi:10.1038/nrm3011.
- Garg, A, L Subramanyam, A K Agarwal, V Simha, B Levine, M R D'Apice, G Novelli, and Y Crow. 2009. "Atypical Progeroid Syndrome due to Heterozygous Missense LMNA Mutations." *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 94 (12): 4971-83. doi:10.1210/jc.2009-0472.
- Geiss-Friedlander, R, and F Melchior. 2007. "Concepts in Sumoylation: A Decade On." *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 8 (12): 947-56. doi:10.1038/nrm2293.
- Gerace, L, A Blum, and G Blobel. 1978. "Immunocytochemical Localization of the Major Polypeptides of the Nuclear Pore Complex-Lamina Fraction. Interphase and Mitotic Distribution." *The Journal of Cell Biology* 79 (2 Pt 1): 546-66.
- Gesson, K, S Vidak, and R Foisner. 2014. "Lamina-Associated Polypeptide (LAP)2 α and Nucleoplasmic Lamins in Adult Stem Cell Regulation and Disease." *Seminars in Cell & Developmental Biology* 29 (May): 116-24. doi:10.1016/j.semcdb.2013.12.009.
- Ghosh, S, B Liu, and Z Zhou. 2013. "Resveratrol Activates SIRT1 in a Lamin A-Dependent Manner." *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)* 12 (6): 872-76. doi:10.4161/cc.24061.
- Giandomenico, V, M Simonsson, E Grönroos, and J Ericsson. 2003. "Coactivator-Dependent Acetylation Stabilizes Members of the SREBP Family of Transcription Factors." *Molecular and Cellular Biology* 23 (7): 2587-99.
- Gibbs-Seymour, I, E Markiewicz, S Bekker-Jensen, N Mailand, and C J Hutchison. 2015. "Lamin A/C-Dependent Interaction with 53BP1 Promotes Cellular Responses to DNA Damage." *Aging Cell* 14 (2): 162-69. doi:10.1111/ace.12258.
- Gilbert, P M, K L Havenstrite, K E G Magnusson, A Sacco, N A Leonardi, P Kraft, N K Nguyen, S Thrun, M P Lutolf, and H M Blau. 2010. "Substrate Elasticity Regulates Skeletal Muscle Stem Cell Self-Renewal in Culture." *Science (New York, N.Y.)* 329 (5995): 1078-81. doi:10.1126/science.1191035.
- Gillespie-Brown, J, S J Fuller, M A Bogoyevitch, S Cowley, and P H Sugden. 1995. "The Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase MEK1 Stimulates a Pattern of Gene Expression Typical of the Hypertrophic Phenotype in Rat Ventricular Cardiomyocytes." *The Journal of Biological Chemistry* 270 (47): 28092-96.
- Glynn, M W, and T W Glover. 2005. "Incomplete Processing of Mutant Lamin A in Hutchinson-Gilford Progeria Leads to Nuclear Abnormalities, Which Are Reversed by Farnesyltransferase Inhibition." *Human Molecular Genetics* 14 (20): 2959-69. doi:10.1093/hmg/ddi326.
- Goldberg, M W, J Fiserova, I Huttenlauch, and R Stick. 2008. "A New Model for Nuclear Lamina Organization." *Biochemical Society Transactions* 36 (Pt 6): 1339-43. doi:10.1042/BST0361339.
- Goldman, A E, R D Moir, M Montag-Lowy, M Stewart, and R D Goldman. 1992. "Pathway of Incorporation of Microinjected Lamin A into the Nuclear Envelope." *The Journal of Cell Biology* 119 (4): 725-35.
- Goldman, R D, D K Shumaker, M R Erdos, M Eriksson, A E Goldman, L B Gordon, Y Gruenbaum, et al. 2004. "Accumulation of Mutant Lamin A Causes Progressive Changes in Nuclear Architecture in Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (24). National Academy of Sciences: 8963-68. doi:10.1073/pnas.0402943101.
- Gómez-Andrés, D, I Dabaj, D Mompoin, K Hankiewicz, V Azzi, C Ioos, N B Romero, et al. 2016. "Pediatric Laminopathies: Whole-Body Magnetic Resonance Imaging Fingerprint and Comparison with Sepn1 Myopathy." *Muscle & Nerve* 54 (2): 192-202. doi:10.1002/mus.25018.
- González, J M, A Navarro-Puche, B Casar, P Crespo, and V Andrés. 2008. "Fast Regulation of AP-1 Activity through Interaction of Lamin A/C, ERK1/2, and c-Fos at the Nuclear Envelope." *The Journal of Cell Biology* 183 (4): 653-66. doi:10.1083/jcb.200805049.
- González-Ramírez, R, S L Morales-Lázaro, V Tapia-Ramírez, D Mornet, and B Cisneros. 2008. "Nuclear and Nuclear Envelope Localization of Dystrophin Dp71 and Dystrophin-Associated Proteins (DAPs) in the C2C12 Muscle Cells: DAPs Nuclear Localization Is Modulated during Myogenesis." *Journal of Cellular Biochemistry* 105 (3): 735-45. doi:10.1002/jcb.21870.
- Gonzalo, S, and R Kreienkamp. 2015. "DNA Repair Defects and Genome Instability in Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome." *Current Opinion in Cell Biology* 34 (June): 75-83. doi:10.1016/j.ceb.2015.05.007.
- Gordon, L B, M E Kleinman, D T Miller, D S Neuberg, A Giobbie-Hurder, M Gerhard-Herman, L B Smoot, et al. 2012. "Clinical Trial of a Farnesyltransferase Inhibitor in Children with Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (41): 16666-71. doi:10.1073/pnas.1202529109.

- Gotic, I, W M Schmidt, K Biadasiewicz, M Leschnik, R Spilka, J Braun, C L Stewart, and R Foisner. 2010. "Loss of LAP2 Alpha Delays Satellite Cell Differentiation and Affects Postnatal Fiber-Type Determination." *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 28 (3). Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company: 480–88. doi:10.1002/stem.292.
- Grady, R M, R W Grange, K S Lau, M M Maimone, M C Nichol, J T Stull, and J R Sanes. 1999. "Role for Alpha-Dystrobrevin in the Pathogenesis of Dystrophin-Dependent Muscular Dystrophies." *Nature Cell Biology* 1 (4): 215–20. doi:10.1038/12034.
- Granger, B L, and E Lazarides. 1982. "Structural Associations of Synemin and Vimentin Filaments in Avian Erythrocytes Revealed by Immunoelectron Microscopy." *Cell* 30 (1): 263–75.
- Grifone, R, C Laclef, F Spitz, S Lopez, J Demignon, J-E Guidotti, K Kawakami, et al. 2004. "Six1 and Eya1 Expression Can Reprogram Adult Muscle from the Slow-Twitch Phenotype into the Fast-Twitch Phenotype." *Molecular and Cellular Biology* 24 (14). American Society for Microbiology: 6253–67. doi:10.1128/MCB.24.14.6253-6267.2004.
- Guelen, L, L Pagie, E Brassat, W Meuleman, M B Faza, W Talhout, B H Eussen, et al. 2008. "Domain Organization of Human Chromosomes Revealed by Mapping of Nuclear Lamina Interactions." *Nature* 453 (7197): 948–51. doi:10.1038/nature06947.
- Guo, D, J Han, B-L Adam, N H Colburn, M-H Wang, Z Dong, D L Eizirik, J-X She, and C-Y Wang. 2005. "Proteomic Analysis of SUMO4 Substrates in HEK293 Cells under Serum Starvation-Induced Stress." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 337 (4): 1308–18. doi:10.1016/j.bbrc.2005.09.191.
- Haberland, M, M A Arnold, J McAnally, D Phan, Y Kim, and E N Olson. 2007. "Regulation of HDAC9 Gene Expression by MEF2 Establishes a Negative-Feedback Loop in the Transcriptional Circuitry of Muscle Differentiation." *Molecular and Cellular Biology* 27 (2): 518–25. doi:10.1128/MCB.01415-06.
- Hale, C M, A L Shrestha, S B Khatau, P J Stewart-Hutchinson, L Hernandez, C L Stewart, D Hodzic, and D Wirtz. 2008. "Dysfunctional Connections between the Nucleus and the Actin and Microtubule Networks in Laminopathic Models." *Biophysical Journal* 95 (11): 5462–75. doi:10.1529/biophysj.108.139428.
- Hall, G, J D Hasday, and T B Rogers. 2006. "Regulating the Regulator: NF-kappaB Signaling in Heart." *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 41 (4): 580–91. doi:10.1016/j.yjmcc.2006.07.006.
- Haque, F, D J Lloyd, D T Smallwood, C L Dent, C M Shanahan, A M Fry, R C Trembath, and S Shackleton. 2006. "SUN1 Interacts with Nuclear Lamin A and Cytoplasmic Nesprins To Provide a Physical Connection between the Nuclear Lamina and the Cytoskeleton." *Molecular and Cellular Biology* 26 (10): 3738–51. doi:10.1128/MCB.26.10.3738-3751.2006.
- Haraguchi, T, J M Holaska, M Yamane, T Koujin, N Hashiguchi, C Mori, K L Wilson, and Y Hiraoka. 2004. "Emerin Binding to Btf, a Death-Promoting Transcriptional Repressor, Is Disrupted by a Missense Mutation That Causes Emery-Dreifuss Muscular Dystrophy." *European Journal of Biochemistry / FEBS* 271 (5): 1035–45.
- Harris, C A, P J Andryuk, S Cline, H K Chan, A Natarajan, J J Siekierka, and G Goldstein. 1994. "Three Distinct Human Thymopoietins Are Derived from Alternatively Spliced mRNAs." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91 (14): 6283–87.
- Hart, G W, and R J Copeland. 2010. "Glycomics Hits the Big Time." *Cell* 143 (5): 672–76. doi:10.1016/j.cell.2010.11.008.
- Hasty, P, A Bradley, J H Morris, D G Edmondson, J M Venuti, E N Olson, and W H Klein. 1993. "Muscle Deficiency and Neonatal Death in Mice with a Targeted Mutation in the Myogenin Gene." *Nature* 364 (6437): 501–6. doi:10.1038/364501a0.
- Hayes, D N, A S Lucas, T Tanvetyanon, M K Krzyzanowska, C H Chung, B A Murphy, J Gilbert, et al. 2012. "Phase II Efficacy and Pharmacogenomic Study of Selumetinib (AZD6244; ARRY-142886) in Iodine-131 Refractory Papillary Thyroid Carcinoma with or without Follicular Elements." *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 18 (7): 2056–65. doi:10.1158/1078-0432.CCR-11-0563.
- Heald, R, and F McKeon. 1990. "Mutations of Phosphorylation Sites in Lamin A That Prevent Nuclear Lamina Disassembly in Mitosis." *Cell* 61 (4): 579–89.
- Heineke, J, and J D Molkentin. 2006. "Regulation of Cardiac Hypertrophy by Intracellular Signalling Pathways." *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 7 (8). Nature Publishing Group: 589–600. doi:10.1038/nrm1983.
- Heitlinger, E, M Peter, M Häner, A Lustig, U Aebi, and E A Nigg. 1991. "Expression of Chicken Lamin B2 in Escherichia Coli: Characterization of Its Structure, Assembly, and Molecular Interactions." *The Journal of Cell Biology* 113 (3): 485–95.
- Hellems, J, O Preobrazhenska, A Willaert, P Debeer, P C M Verdonk, T Costa, K Janssens, et al. 2004. "Loss-of-Function Mutations in LEMD3 Result in Osteopoikilosis, Buschke-Ollendorff Syndrome and Melorheostosis." *Nature Genetics* 36 (11): 1213–18. doi:10.1038/ng1453.
- Henrion, D, F Terzi, K Matrougui, M Duriez, C M Boulanger, E Colucci-Guyon, C Babinet, et al. 1997. "Impaired Flow-Induced Dilation in Mesenteric Resistance Arteries from Mice Lacking Vimentin." *The Journal of Clinical Investigation* 100 (11):

2909–14. doi:10.1172/JCI119840.

- Hernandez, L, K J Roux, Er S M Wong, L C Mounkes, R Mutalif, R Navasankari, B Rai, et al. 2010. "Functional Coupling between the Extracellular Matrix and Nuclear Lamina by Wnt Signaling in Progeria." *Developmental Cell* 19 (3): 413–25. doi:10.1016/j.devcel.2010.08.013.
- Herrmann, H, and U Aebi. 2004. "Intermediate Filaments: Molecular Structure, Assembly Mechanism, and Integration into Functionally Distinct Intracellular Scaffolds." *Annual Review of Biochemistry* 73 (January). Annual Reviews 4139 El Camino Way, P.O. Box 10139, Palo Alto, CA 94303-0139, USA: 749–89. doi:10.1146/annurev.biochem.73.011303.073823.
- Herrmann, H, H Bär, L Kreplak, S V Strelkov, and U Aebi. 2007. "Intermediate Filaments: From Cell Architecture to Nanomechanics." *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 8 (7). Nature Publishing Group: 562–73. doi:10.1038/nrm2197.
- Heyn, H, S Moran, and M Esteller. 2013. "Aberrant DNA Methylation Profiles in the Premature Aging Disorders Hutchinson-Gilford Progeria and Werner Syndrome." *Epigenetics: Official Journal of the DNA Methylation Society* 8 (1): 28–33. doi:10.4161/epi.23366.
- Higginson, J, H Wackerhage, N Woods, P Schjerling, A Ratkevicius, N Grunnet, and B Quistorff. 2002. "Blockades of Mitogen-Activated Protein Kinase and Calcineurin Both Change Fibre-Type Markers in Skeletal Muscle Culture." *Pflügers Archiv: European Journal of Physiology* 445 (3): 437–43. doi:10.1007/s00424-002-0939-1.
- Hocevar, B A, D J Burns, and A P Fields. 1993. "Identification of Protein Kinase C (PKC) Phosphorylation Sites on Human Lamin B. Potential Role of PKC in Nuclear Lamina Structural Dynamics." *The Journal of Biological Chemistry* 268 (10): 7545–52.
- Hodzic, D M, D B Yeater, L Bengtsson, H Otto, and P D Stahl. 2004. "Sun2 Is a Novel Mammalian Inner Nuclear Membrane Protein." *The Journal of Biological Chemistry* 279 (24): 25805–12. doi:10.1074/jbc.M313157200.
- Holaska, J M, K K Lee, A K Kowalski, and K L Wilson. 2003. "Transcriptional Repressor Germ Cell-Less (GCL) and Barrier to Autointegration Factor (BAF) Compete for Binding to Emerin in Vitro." *The Journal of Biological Chemistry* 278 (9): 6969–75. doi:10.1074/jbc.M208811200.
- Howman, E V, N Sullivan, E P Poon, J E Britton, D Hilton-Jones, and K E Davies. 2003. "Syncoilin Accumulation in Two Patients with Desmin-Related Myopathy." *Neuromuscular Disorders: NMD* 13 (1): 42–48.
- Huang, S, R A Risques, G M Martin, P S Rabinovitch, and J Oshima. 2008. "Accelerated Telomere Shortening and Replicative Senescence in Human Fibroblasts Overexpressing Mutant and Wild-Type Lamin A." *Experimental Cell Research* 314 (1): 82–91. doi:10.1016/j.yexcr.2007.08.004.
- Hutchison, C J, and H J Worman. 2004. "A-Type Lamins: Guardians of the Soma?" *Nature Cell Biology* 6 (11). Nature Publishing Group: 1062–67. doi:10.1038/ncb1104-1062.
- Imbalzano, A N, K M Imbalzano, and J A Nickerson. 2013. "BRG1, a SWI/SNF Chromatin Remodeling Enzyme ATPase, Is Required for Maintenance of Nuclear Shape and Integrity." *Communicative & Integrative Biology* 6 (5): e25153. doi:10.4161/cib.25153.
- Imbalzano, A N, H Kwon, M R Green, and R E Kingston. 1994. "Facilitated Binding of TATA-Binding Protein to Nucleosomal DNA." *Nature* 370 (6489). Nature Publishing Group: 481–85. doi:10.1038/370481a0.
- Ingber, D E. 2003. "Mechanobiology and Diseases of Mechanotransduction." *Annals of Medicine* 35 (8): 564–77.
- Ishikawa, H, R Bischoff, and H Holtzer. 1968. "Mitosis and Intermediate-Sized Filaments in Developing Skeletal Muscle." *The Journal of Cell Biology* 38 (3): 538–55.
- Ivorra, C, M Kubicek, J M González, S M Sanz-González, A Alvarez-Barrientos, J-E O'Connor, B Burke, and V Andrés. 2006. "A Mechanism of AP-1 Suppression through Interaction of c-Fos with Lamin A/C." *Genes & Development* 20 (3): 307–20. doi:10.1101/gad.349506.
- Izmiryan, A, Y Cheraud, L Khanamiryan, J F Letierrier, T Federici, E Peltekian, V Moura-Neto, D Paulin, Z Li, and Z G Xue. 2006. "Different Expression of Synemin Isoforms in Glia and Neurons during Nervous System Development." *Glia* 54 (3): 204–13. doi:10.1002/glia.20378.
- Jackson, M F, K E Hoversten, J M Powers, G D Trobridge, and B D Rodgers. 2013. "Genetic Manipulation of Myoblasts and a Novel Primary Myosatellite Cell Culture System: Comparing and Optimizing Approaches." *The FEBS Journal* 280 (3): 827–39. doi:10.1111/febs.12072.
- Jahn, D, S Schramm, M Schnölzer, C J Heilmann, C G de Koster, W Schütz, R Benavente, and M Alsheimer. 2012. "A Truncated Lamin A in the Lmna ^{-/-} Mouse Line: Implications for the Understanding of Laminopathies." *Nucleus (Austin, Tex.)* 3 (5): 463–74. doi:10.4161/nucl.21676.
- Joanne, P, O Chourbagi, C Hourdé, A Ferry, G Butler-Browne, P Vicart, J Dumonceaux, and O Agbulut. 2013. "Viral-Mediated

- Expression of Desmin Mutants to Create Mouse Models of Myofibrillar Myopathy." *Skeletal Muscle* 3 (1). BioMed Central Ltd: 4. doi:10.1186/2044-5040-3-4.
- Johnson, B R, R T Nitta, R L Frock, L Mounkes, D A Barbie, C L Stewart, E Harlow, and B K Kennedy. 2004. "A-Type Lamins Regulate Retinoblastoma Protein Function by Promoting Subnuclear Localization and Preventing Proteasomal Degradation." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (26): 9677–82. doi:10.1073/pnas.0403250101.
- Jung, C H, S-H Ro, J Cao, N M Otto, and D-H Kim. 2010. "mTOR Regulation of Autophagy." *FEBS Letters* 584 (7): 1287–95. doi:10.1016/j.febslet.2010.01.017.
- Kaya, F, S Belin, P Bourgeois, J Micaleff, O Blin, and M Fontés. 2007. "Ascorbic Acid Inhibits PMP22 Expression by Reducing cAMP Levels." *Neuromuscular Disorders : NMD* 17 (3): 248–53. doi:10.1016/j.nmd.2006.12.008.
- Kim, C-H, H Neiswender, E J Baik, W C Xiong, and L Mei. 2008. "Beta-Catenin Interacts with MyoD and Regulates Its Transcription Activity." *Molecular and Cellular Biology* 28 (9): 2941–51. doi:10.1128/MCB.01682-07.
- Kim, S C, R Sprung, Y Chen, Y Xu, H Ball, J Pei, T Cheng, et al. 2006. "Substrate and Functional Diversity of Lysine Acetylation Revealed by a Proteomics Survey." *Molecular Cell* 23 (4): 607–18. doi:10.1016/j.molcel.2006.06.026.
- Kim, Y, and Y Zheng. 2013. "Generation and Characterization of a Conditional Deletion Allele for Lmna in Mice." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 440 (1): 8–13. doi:10.1016/j.bbrc.2013.08.082.
- Kim, Y-M, H-T Shin, Y-H Seo, H-O Byun, S-H Yoon, I-K Lee, D-H Hyun, H-Y Chung, and G Yoon. 2010. "Sterol Regulatory Element-Binding Protein (SREBP)-1-Mediated Lipogenesis Is Involved in Cell Senescence." *The Journal of Biological Chemistry* 285 (38): 29069–77. doi:10.1074/jbc.M110.120386.
- Kind, J, L Pagie, H Ortaobozkoyun, S Boyle, S S De Vries, H Janssen, M Amendola, L D Nolen, W A Bickmore, and B Van Steensel. 2013. "Single-Cell Dynamics of Genome-Nuclear Lamina Interactions." *Cell* 153 (1). doi:10.1016/j.cell.2013.02.028.
- Kind, J, and B van Steensel. 2010. "Genome-Nuclear Lamina Interactions and Gene Regulation." *Current Opinion in Cell Biology* 22 (3): 320–25. doi:10.1016/j.ceb.2010.04.002.
- Kochin, V, T Shimi, E Torvaldson, S A Adam, A Goldman, C-G Pack, J Melo-Cardenas, S Y Imanishi, R D Goldman, and J E Eriksson. 2014. "Interphase Phosphorylation of Lamin A." *Journal of Cell Science* 127 (Pt 12): 2683–96. doi:10.1242/jcs.141820.
- Kollmar, M. 2015. "Polyphyly of Nuclear Lamin Genes Indicates an Early Eukaryotic Origin of the Metazoan-Type Intermediate Filament Proteins." *Scientific Reports* 5 (January): 10652. doi:10.1038/srep10652.
- Koopman, R, G Schaart, and M K Hesselink. 2001. "Optimisation of Oil Red O Staining Permits Combination with Immunofluorescence and Automated Quantification of Lipids." *Histochemistry and Cell Biology* 116 (1): 63–68.
- Krimm, I, C Ostlund, B Gilquin, J Couprie, P Hossenlopp, J-P Mornon, G Bonne, J-C Courvalin, H J Worman, and S Zinn-Justin. 2002. "The Ig-like Structure of the C-Terminal Domain of Lamin A/C, Mutated in Muscular Dystrophies, Cardiomyopathy, and Partial Lipodystrophy." *Structure (London, England : 1993)* 10 (6): 811–23.
- Krohne, G, W W Franke, S Ely, A D'Arcy, and E Jost. 1978. "Localization of a Nuclear Envelope-Associated Protein by Indirect Immunofluorescence Microscopy Using Antibodies against a Major Polypeptide from Rat Liver Fractions Enriched in Nuclear Envelope-Associated Material." *Cytobiologie* 18 (1): 22–38.
- Kubben, N, J W Voncken, G Konings, M van Weeghel, M M van den Hoogenhof, M Gijbels, A van Erk, et al. 2011. "Post-Natal Myogenic and Adipogenic Developmental: Defects and Metabolic Impairment upon Loss of A-Type Lamins." *Nucleus (Austin, Tex.)* 2 (3): 195–207. doi:10.4161/nucl.2.3.15731.
- Kuga, T, N Nozaki, K Matsushita, F Nomura, and T Tomonaga. 2010. "Phosphorylation Statuses at Different Residues of Lamin B2, B1, and A/C Dynamically and Independently Change throughout the Cell Cycle." *Experimental Cell Research* 316 (14): 2301–12. doi:10.1016/j.yexcr.2010.05.017.
- Kwon, H, A N Imbalzano, P A Khavari, R E Kingston, and M R Green. 1994. "Nucleosome Disruption and Enhancement of Activator Binding by a Human SW1/SNF Complex." *Nature* 370 (6489): 477–81. doi:10.1038/370477a0.
- Lammerding, J, L G Fong, J Y Ji, K Reue, C L Stewart, S G Young, and R T Lee. 2006. "Lamins A and C but Not Lamin B1 Regulate Nuclear Mechanics." *The Journal of Biological Chemistry* 281 (35). American Society for Biochemistry and Molecular Biology: 25768–80. doi:10.1074/jbc.M513511200.
- Lammerding, J, J Hsiao, P C Schulze, S Kozlov, C L Stewart, and R T Lee. 2005. "Abnormal Nuclear Shape and Impaired Mechanotransduction in Emerin-Deficient Cells." *The Journal of Cell Biology* 170 (5): 781–91. doi:10.1083/jcb.200502148.
- Lammerding, J, P C Schulze, T Takahashi, S Kozlov, T Sullivan, R D Kamm, C L Stewart, and R T Lee. 2004. "Lamin A/C Deficiency Causes Defective Nuclear Mechanics and Mechanotransduction." *The Journal of Clinical Investigation* 113

- (3). American Society for Clinical Investigation: 370–78. doi:10.1172/JCI19670.
- Lariviere, R C, and J-P Julien. 2004. "Functions of Intermediate Filaments in Neuronal Development and Disease." *Journal of Neurobiology* 58 (1): 131–48. doi:10.1002/neu.10270.
- Larrieu, D, S Britton, M Demir, R Rodriguez, and St P Jackson. 2014. "Chemical Inhibition of NAT10 Corrects Defects of Laminopathic Cells." *Science (New York, N.Y.)* 344 (6183): 527–32. doi:10.1126/science.1252651.
- Lecomte, V, E Meugnier, V Euthine, C Durand, D Freyssenet, G Nemoz, S Rome, H Vidal, and E Lefai. 2010. "A New Role for Sterol Regulatory Element Binding Protein 1 Transcription Factors in the Regulation of Muscle Mass and Muscle Cell Differentiation." *Molecular and Cellular Biology* 30 (5): 1182–98. doi:10.1128/MCB.00690-09.
- Lee, H, W J Adams, P W Alford, M L McCain, A W Feinberg, S P Sheehy, J A Goss, and K K Parker. 2015. "Cytoskeletal Prestress Regulates Nuclear Shape and Stiffness in Cardiac Myocytes." *Experimental Biology and Medicine (Maywood, N.J.)* 240 (11): 1543–54. doi:10.1177/1535370215583799.
- Lee, J S H, C M Hale, P Panorchan, S B Khatau, J P George, Y Tseng, C L Stewart, D Hodzic, and D Wirtz. 2007. "Nuclear Lamin A/C Deficiency Induces Defects in Cell Mechanics, Polarization, and Migration." *Biophysical Journal* 93 (7): 2542–52. doi:10.1529/biophysj.106.102426.
- Lee, K K, T Haraguchi, R S Lee, T Koujin, Y Hiraoka, and K L Wilson. 2001. "Distinct Functional Domains in Emerin Bind Lamin A and DNA-Bridging Protein BAF." *Journal of Cell Science* 114 (Pt 24): 4567–73.
- Lee, K Y, M K Singh, S Ussar, P Wetzell, M F Hirshman, L J Goodyear, A Kispert, and C R Kahn. 2015. "Tbx15 Controls Skeletal Muscle Fibre-Type Determination and Muscle Metabolism." *Nature Communications* 6 (August). Nature Publishing Group: 8054. doi:10.1038/ncomms9054.
- Lehner, C F, G Fürstenberger, H M Eppenberger, and E A Nigg. 1986. "Biogenesis of the Nuclear Lamina: In Vivo Synthesis and Processing of Nuclear Protein Precursors." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83 (7): 2096–99.
- Lehner, C F, R Stick, H M Eppenberger, and E A Nigg. 1987. "Differential Expression of Nuclear Lamin Proteins during Chicken Development." *The Journal of Cell Biology* 105 (1): 577–87.
- Lendahl, U, L B Zimmerman, and R D McKay. 1990. "CNS Stem Cells Express a New Class of Intermediate Filament Protein." *Cell* 60 (4): 585–95.
- Lenz-Böhme, B, J Wismar, S Fuchs, R Reifegerste, E Buchner, H Betz, and B Schmitt. 1997. "Insertional Mutation of the Drosophila Nuclear Lamin Dm0 Gene Results in Defective Nuclear Envelopes, Clustering of Nuclear Pore Complexes, and Accumulation of Annulate Lamellae." *The Journal of Cell Biology* 137 (5): 1001–16.
- Lin, F, J M Morrison, W Wu, and H J Worman. 2005. "MAN1, an Integral Protein of the Inner Nuclear Membrane, Binds Smad2 and Smad3 and Antagonizes Transforming Growth Factor-Beta Signaling." *Human Molecular Genetics* 14 (3): 437–45. doi:10.1093/hmg/ddi040.
- Lin, F, and H J Worman. 1993. "Structural Organization of the Human Gene Encoding Nuclear Lamin A and Nuclear Lamin C." *The Journal of Biological Chemistry* 268 (22): 16321–26.
- . 1995. "Structural Organization of the Human Gene (LMNB1) Encoding Nuclear Lamin B1." *Genomics* 27 (2): 230–36. doi:10.1006/geno.1995.1036.
- Liu, B, S Ghosh, X Yang, H Zheng, X Liu, Z Wang, G Jin, et al. 2012. "Resveratrol Rescues SIRT1-Dependent Adult Stem Cell Decline and Alleviates Progeroid Features in Laminopathy-Based Progeria." *Cell Metabolism* 16 (6): 738–50. doi:10.1016/j.cmet.2012.11.007.
- Liu, B, J Wang, K M Chan, W M Tjia, W Deng, X Guan, J-d Huang, et al. 2005. "Genomic Instability in Laminopathy-Based Premature Aging." *Nature Medicine* 11 (7): 780–85. doi:10.1038/nm1266.
- Liu, G-H, T Guan, K Datta, J Coppinger, J Yates, and L Gerace. 2009. "Regulation of Myoblast Differentiation by the Nuclear Envelope Protein NET39." *Molecular and Cellular Biology* 29 (21): 5800–5812. doi:10.1128/MCB.00684-09.
- Liu, Y, A Rusinol, M Sinensky, Y Wang, and Y Zou. 2006. "DNA Damage Responses in Progeroid Syndromes Arise from Defective Maturation of Prelamin A." *Journal of Cell Science* 119 (Pt 22): 4644–49. doi:10.1242/jcs.03263.
- Lloyd, D J, R C Trembath, and S Shackleton. 2002. "A Novel Interaction between Lamin A and SREBP1: Implications for Partial Lipodystrophy and Other Laminopathies." *Human Molecular Genetics* 11 (7): 769–77.
- Lund, E, and P Collas. 2013. "Nuclear Lamins: Making Contacts with Promoters." *Nucleus (Austin, Tex.)* 4 (6): 424–30. doi:10.4161/nucl.26865.
- Lund, E, I Duband-Goulet, A Oldenburg, B Buendia, and P Collas. 2015. "Distinct Features of Lamin A-Interacting Chromatin Domains Mapped by ChIP-Sequencing from Sonicated or Micrococcal Nuclease-Digested Chromatin." *Nucleus* 6 (1): 30–39. doi:10.4161/19491034.2014.990855.

- Lund, E, A R Oldenburg, and P Collas. 2014. "Enriched Domain Detector: A Program for Detection of Wide Genomic Enrichment Domains Robust against Local Variations." *Nucleic Acids Research* 42 (11): e92. doi:10.1093/nar/gku324.
- Lund, E, A R Oldenburg, E Delbarre, C T Freberg, I Duband-goulet, R Eskeland, B Buendia, and P Collas. 2013. "Lamin A / C-Promoter Interactions Specify Chromatin State – Dependent Transcription Outcomes," 1580–89. doi:10.1101/gr.159400.113.1580.
- Lussi, Y C, I Hügi, E Laurell, U Kutay, and B Fahrenkrog. 2011. "The Nucleoporin Nup88 Is Interacting with Nuclear Lamin A." *Molecular Biology of the Cell* 22 (7): 1080–90. doi:10.1091/mbc.E10-05-0463.
- Machado, C, and D J Andrew. 2000. "D-Titin: A Giant Protein with Dual Roles in Chromosomes and Muscles." *The Journal of Cell Biology* 151 (3): 639–52.
- Machado, C, C E Sunkel, and D J Andrew. 1998. "Human Autoantibodies Reveal Titin as a Chromosomal Protein." *The Journal of Cell Biology* 141 (2): 321–33.
- Machiels, B M, A H G Zorenc, J M Endert, H J H Kuijpers, G J J M Van Eys, F C S Ramaekers, and J L V Broers. 1996. "An Alternative Splicing Product of the Lamin A / C Gene Lacks Exon 10 * Expression of the A-Type Lamins Was Studied in the" 271 (16): 9249–53.
- Mallampalli, M P, G Huyer, P Bendale, M H Gelb, and S Michaelis. 2005. "Inhibiting Farnesylation Reverses the Nuclear Morphology Defect in a HeLa Cell Model for Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (40): 14416–21. doi:10.1073/pnas.0503712102.
- Malone, C J, W D Fixsen, H R Horvitz, and M Han. 1999. "UNC-84 Localizes to the Nuclear Envelope and Is Required for Nuclear Migration and Anchoring during C. Elegans Development." *Development (Cambridge, England)* 126 (14): 3171–81.
- Manju, K, B Muralikrishna, and V K Parnaik. 2006. "Expression of Disease-Causing Lamin A Mutants Impairs the Formation of DNA Repair Foci." *Journal of Cell Science* 119 (Pt 13). The Company of Biologists Ltd: 2704–14. doi:10.1242/jcs.03009.
- Manning, A L, M S Longworth, and N J Dyson. 2010. "Loss of pRB Causes Centromere Dysfunction and Chromosomal Instability." *Genes & Development* 24 (13): 1364–76. doi:10.1101/gad.1917310.
- Mansharamani, M, and K L Wilson. 2005. "Direct Binding of Nuclear Membrane Protein MAN1 to Emerin in Vitro and Two Modes of Binding to Barrier-to-Autointegration Factor." *The Journal of Biological Chemistry* 280 (14): 13863–70. doi:10.1074/jbc.M413020200.
- Maraldi, N M, C Capanni, V Cenni, M Fini, and G Lattanzi. 2011. "Laminopathies and Lamin-Associated Signaling Pathways." *Journal of Cellular Biochemistry* 112 (4): 979–92. doi:10.1002/jcb.22992.
- Mariño, G, A P Ugalde, A F Fernández, F G Osorio, A Fueyo, J M P Freije, and C López-Otín. 2010. "Insulin-like Growth Factor 1 Treatment Extends Longevity in a Mouse Model of Human Premature Aging by Restoring Somatotroph Axis Function." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (37): 16268–73. doi:10.1073/pnas.1002696107.
- Marji, J, S I O'Donoghue, D McClintock, V P Satagopam, R Schneider, D Ratner, H J Worman, L B Gordon, and K Djabali. 2010. "Defective Lamin A-Rb Signaling in Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome and Reversal by Farnesyltransferase Inhibition." *PLoS One* 5 (6): e11132. doi:10.1371/journal.pone.0011132.
- Markiewicz, E. 2002. "Lamin A/C Binding Protein LAP2alpha Is Required for Nuclear Anchorage of Retinoblastoma Protein." *Molecular Biology of the Cell* 13 (12): 4401–13. doi:10.1091/mbc.E02-07-0450.
- Markiewicz, E, T Dechat, R Foisner, R A Quinlan, and C J Hutchison. 2002. "Lamin A / C Binding Protein LAP2 α Is Required for Nuclear Anchorage of Retinoblastoma Protein" 13 (December): 4401–13. doi:10.1091/mbc.E02.
- Markiewicz, E, M Ledran, and C J Hutchison. 2005. "Remodelling of the Nuclear Lamina and Nucleoskeleton Is Required for Skeletal Muscle Differentiation in Vitro." *Journal of Cell Science* 118 (Pt 2). The Company of Biologists Ltd: 409–20. doi:10.1242/jcs.01630.
- Markiewicz, E, K Tilgner, N Barker, M van de Wetering, H Clevers, M Dorobek, I Hausmanowa-Petrusewicz, et al. 2006. "The Inner Nuclear Membrane Protein Emerin Regulates Beta-Catenin Activity by Restricting Its Accumulation in the Nucleus." *The EMBO Journal* 25 (14): 3275–85. doi:10.1038/sj.emboj.7601230.
- Mattioli, E, M Columbaro, C Capanni, N M Maraldi, V Cenni, K Scotlandi, M T Marino, L Merlini, S Squarzone, and G Lattanzi. 2011. "Prelamin A-Mediated Recruitment of SUN1 to the Nuclear Envelope Directs Nuclear Positioning in Human Muscle." *Cell Death and Differentiation* 18 (8). Nature Publishing Group: 1305–15. doi:10.1038/cdd.2010.183.
- McCall, M A, R G Gregg, R R Behringer, M Brenner, C L Delaney, E J Galbreath, C L Zhang, R A Pearce, S Y Chiu, and A Messing. 1996. "Targeted Deletion in Astrocyte Intermediate Filament (Gfap) Alters Neuronal Physiology." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 (13): 6361–66.

- McClintock, D, D Ratner, M Lokuge, D M Owens, L B Gordon, F S Collins, and K Djabali. 2007. "The Mutant Form of Lamin A That Causes Hutchinson-Gilford Progeria Is a Biomarker of Cellular Aging in Human Skin." *PLoS One* 2 (12): e1269. doi:10.1371/journal.pone.0001269.
- McCord, R P, A Nazario-Toole, H Zhang, P S Chines, Y Zhan, M R Erdos, F S Collins, J Dekker, and K Cao. 2013. "Correlated Alterations in Genome Organization, Histone Methylation, and DNA-Lamin A/C Interactions in Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome." *Genome Research* 23 (2): 260–69. doi:10.1101/gr.138032.112.
- McCullagh, K J A, B Edwards, E Poon, R M Lovering, D Paulin, and K E Davies. 2007. "Intermediate Filament-like Protein Syncoilin in Normal and Myopathic Striated Muscle." *Neuromuscular Disorders: NMD* 17 (11–12): 970–79. doi:10.1016/j.nmd.2007.06.004.
- McKeon, F D, M W Kirschner, and D Caput. 1986. "Homologies in Both Primary and Secondary Structure between Nuclear Envelope and Intermediate Filament Proteins." *Nature* 319 (6053): 463–68. doi:10.1038/319463a0.
- Mehta, I S, C H Eskiw, H D Arican, I R Kill, and J M Bridger. 2011. "Farnesyltransferase Inhibitor Treatment Restores Chromosome Territory Positions and Active Chromosome Dynamics in Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome Cells." *Genome Biology* 12 (8): R74. doi:10.1186/gb-2011-12-8-r74.
- Méjat, A, F Ramond, R Bassel-Duby, S Khochbin, E N Olson, and L Schaeffer. 2005. "Histone Deacetylase 9 Couples Neuronal Activity to Muscle Chromatin Acetylation and Gene Expression." *Nature Neuroscience* 8 (3). Nature Publishing Group: 313–21. doi:10.1038/nn1408.
- Melcon, G, S Kozlov, D A Cutler, T Sullivan, L Hernandez, P Zhao, S Mitchell, et al. 2006. "Loss of Emerin at the Nuclear Envelope Disrupts the Rb1/E2F and MyoD Pathways during Muscle Regeneration." *Human Molecular Genetics* 15 (4): 637–51. doi:10.1093/hmg/ddi479.
- Mercuri, E, A Y Manzur, H Jungbluth, G Bonne, A Muchir, C Sewry, K Schwartz, and F Muntoni. 2000. "Early and Severe Presentation of Autosomal Dominant Emery-Dreifuss Muscular Dystrophy (EMD2)." *Neurology* 54 (8): 1704–5.
- Mercuri, E, M Poppe, R Quinlivan, S Messina, M Kinali, L Demay, J Bourke, et al. 2004. "Extreme Variability of Phenotype in Patients with an Identical Missense Mutation in the Lamin A/C Gene: From Congenital Onset with Severe Phenotype to Milder Classic Emery-Dreifuss Variant." *Archives of Neurology* 61 (5): 690–94. doi:10.1001/archneur.61.5.690.
- Meuleman, W, D Peric-Hupkes, J Kind, J-B Beaudry, L Pagie, M Kellis, M Reinders, L Wessels, and B van Steensel. 2013a. "Constitutive Nuclear Lamina-Genome Interactions Are Highly Conserved and Associated with A/T-Rich Sequence." *Genome Research* 23 (2): 270–80. doi:10.1101/gr.141028.112.
- . 2013b. "Constitutive Nuclear Lamina-Genome Interactions Are Highly Conserved and Associated with A/T-Rich Sequence." *Genome Research* 23 (2). Cold Spring Harbor Laboratory Press: 270–80. doi:10.1101/gr.141028.112.
- Meune, C, J H Van Berlo, F Anselme, G Bonne, Y M Pinto, and D Duboc. 2006. "Primary Prevention of Sudden Death in Patients with Lamin A/C Gene Mutations." *New England Journal of Medicine* 354 (2). Massachusetts Medical Society: 209–10. doi:10.1056/NEJMc052632.
- Micallef, J, S Attarian, O Dubourg, P-M Gonnard, J-Y Hogrel, T Stojkovic, R Bernard, et al. 2009. "Effect of Ascorbic Acid in Patients with Charcot-Marie-Tooth Disease Type 1A: A Multicentre, Randomised, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial." *The Lancet. Neurology* 8 (12): 1103–10. doi:10.1016/S1474-4422(09)70260-1.
- Middeldorp, J, and E M Hol. 2011. "GFAP in Health and Disease." *Progress in Neurobiology* 93 (3): 421–43. doi:10.1016/j.pneurobio.2011.01.005.
- Milon, B C, H Cheng, M V Tselebrovsky, S A Lavrov, V V Nenasheva, E A Mikhaleva, Y Y Shevelyov, and D I Nurminsky. 2012. "Role of Histone Deacetylases in Gene Regulation at Nuclear Lamina." Edited by Keqiang Wu. *PLoS ONE* 7 (11). Public Library of Science: e49692. doi:10.1371/journal.pone.0049692.
- Mínguez, A, and S Moreno Díaz de la Espina. 1993. "Immunological Characterization of Lamins in the Nuclear Matrix of Onion Cells." *Journal of Cell Science* 106 (Pt 1 (September): 431–39.
- Mislow, J M K, J M Holaska, M S Kim, K K Lee, M Segura-Totten, K L Wilson, and E M McNally. 2002. "Nesprin-1alpha Self-Associates and Binds Directly to Emerin and Lamin A in Vitro." *FEBS Letters* 525 (1–3): 135–40.
- Mitsui, Y, and E L Schneider. 1976. "Increased Nuclear Sizes in Senescent Human Diploid Fibroblast Cultures." *Experimental Cell Research* 100 (1): 147–52. doi:10.1016/0014-4827(76)90336-0.
- Moir, R D, M Yoon, S Khuon, and R D Goldman. 2000. "Nuclear Lamins A and B1: Different Pathways of Assembly during Nuclear Envelope Formation in Living Cells." *The Journal of Cell Biology* 151 (6): 1155–68.
- Molloy, S, and M Little. 1992. "p34cdc2 Kinase-Mediated Release of Lamins from Nuclear Ghosts Is Inhibited by cAMP-Dependent Protein Kinase." *Experimental Cell Research* 201 (2): 494–99.
- Mostowy, S, and P Cossart. 2012. "Septins: The Fourth Component of the Cytoskeleton." *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 13 (3): 183–94. doi:10.1038/nrm3284.

- Mounkes, L C, S Kozlov, L Hernandez, T Sullivan, and C L Stewart. 2003. "A Progeroid Syndrome in Mice Is Caused by Defects in A-Type Lamins." *Nature* 423 (6937). Nature Publishing Group: 298–301. doi:10.1038/nature01631.
- Mounkes, L C, S V Kozlov, J N Rottman, and C L Stewart. 2005. "Expression of an LMNA-N195K Variant of A-Type Lamins Results in Cardiac Conduction Defects and Death in Mice." *Human Molecular Genetics* 14 (15): 2167–80. doi:10.1093/hmg/ddi221.
- Muchir, A, G Bonne, A J van der Kooi, M van Meegen, F Baas, P A Bolhuis, M de Visser, and K Schwartz. 2000. "Identification of Mutations in the Gene Encoding Lamins A/C in Autosomal Dominant Limb Girdle Muscular Dystrophy with Atrioventricular Conduction Disturbances (LGMD1B)." *Human Molecular Genetics* 9 (9): 1453–59.
- Muchir, A, J Medioni, M Laluc, C Massart, T Arimura, A J van der Kooi, I Desguerre, 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 (4): 444–50. doi:10.1002/mus.20122.
- Muchir, A, P Pavlidis, G Bonne, Y K Hayashi, and H J Worman. 2007. "Activation of MAPK in Hearts of EMD Null Mice: Similarities between Mouse Models of X-Linked and Autosomal Dominant Emery Dreifuss Muscular Dystrophy." *Human Molecular Genetics* 16 (15). Oxford University Press: 1884–95. doi:10.1093/hmg/ddm137.
- Muchir, A, P Pavlidis, V Decostre, A J Herron, T Arimura, G Bonne, and H J Worman. 2007. "Activation of MAPK Pathways Links LMNA Mutations to Cardiomyopathy in Emery-Dreifuss Muscular Dystrophy." *The Journal of Clinical Investigation* 117 (5). American Society for Clinical Investigation: 1282–93. doi:10.1172/JCI29042.
- Muchir, A, S A Reilly, W Wu, S Iwata, S Homma, G Bonne, and H J Worman. 2012. "Treatment with Selumetinib Preserves Cardiac Function and Improves Survival in Cardiomyopathy Caused by Mutation in the Lamin A/C Gene." *Cardiovascular Research* 93 (2): 311–19. doi:10.1093/cvr/cvr301.
- Muchir, A, B G van Engelen, M Lammens, J M Mislow, E McNally, K Schwartz, and G Bonne. 2003. "Nuclear Envelope Alterations in Fibroblasts from LGMD1B Patients Carrying Nonsense Y259X Heterozygous or Homozygous Mutation in Lamin A/C Gene." *Experimental Cell Research* 291 (2): 352–62. doi:10.1016/j.yexcr.2003.07.002.
- Muchir, A, W Wu, J C Choi, S Iwata, J Morrow, S Homma, and H J Worman. 2012. "Abnormal p38 α Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling in Dilated Cardiomyopathy Caused by Lamin A/C Gene Mutation." *Human Molecular Genetics* 21 (19): 4325–33. doi:10.1093/hmg/dds265.
- Muralikrishna, B, P Chaturvedi, K Sinha, and V K Parnaik. 2012. "Lamin Misexpression Upregulates Three Distinct Ubiquitin Ligase Systems That Degrade ATR Kinase in HeLa Cells." *Molecular and Cellular Biochemistry* 365 (1–2): 323–32. doi:10.1007/s11010-012-1272-4.
- Musarò, A, C Giacinti, G Borsellino, G Dobrowolny, L Pelosi, L Cairns, S Ottolenghi, et al. 2004. "Stem Cell-Mediated Muscle Regeneration Is Enhanced by Local Isoform of Insulin-like Growth Factor 1." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (5): 1206–10. doi:10.1073/pnas.0303792101.
- Musarò, A, K McCullagh, A Paul, L Houghton, G Dobrowolny, M Molinaro, E R Barton, H L Sweeney, and N Rosenthal. 2001. "Localized Igf-1 Transgene Expression Sustains Hypertrophy and Regeneration in Senescent Skeletal Muscle." *Nature Genetics* 27 (2): 195–200. doi:10.1038/84839.
- Musich, P R, and Y Zou. 2011. "DNA-Damage Accumulation and Replicative Arrest in Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome." *Biochemical Society Transactions* 39 (6): 1764–69. doi:10.1042/BST20110687.
- Naetar, N, and R Foisner. 2014. "Lamin Complexes in the Nuclear Interior Control Progenitor Cell Proliferation and Tissue Homeostasis." *Cell Cycle* 8 (10). Taylor & Francis: 1488–93. doi:10.4161/cc.8.10.8499.
- Naetar, N, B Korbei, S Kozlov, M A Kerenyi, D Dorner, R Kral, I Gotic, et al. 2008. "Loss of Nucleoplasmic LAP2 α -Lamin A Complexes Causes Erythroid and Epidermal Progenitor Hyperproliferation." *Nature Cell Biology* 10 (11). Nature Publishing Group: 1341–48. doi:10.1038/ncb1793.
- Navakauskienė, R, G Treigyte, V-V Borutinskaitė, D Matuzevičius, D Navakauskas, and K-E Magnusson. 2012. "Alpha-Dystrobrevin and Its Associated Proteins in Human Promyelocytic Leukemia Cells Induced to Apoptosis." *Journal of Proteomics* 75 (11): 3291–3303. doi:10.1016/j.jprot.2012.03.041.
- Newey, S E, E V Howman, C P Ponting, M A Benson, R Nawrotzki, N Y Loh, K E Davies, and D J Blake. 2001. "Syncoilin, a Novel Member of the Intermediate Filament Superfamily That Interacts with Alpha-Dystrobrevin in Skeletal Muscle." *The Journal of Biological Chemistry* 276 (9): 6645–55. doi:10.1074/jbc.M008305200.
- Nikolova, V, C Leimena, A C McMahon, J C Tan, S Chandar, D Jogia, S H Kesteven, et al. 2004. "Defects in Nuclear Structure and Function Promote Dilated Cardiomyopathy in Lamin A/C-Deficient Mice." *The Journal of Clinical Investigation* 113 (3): 357–69. doi:10.1172/JCI19448.
- Novelli, G, A Muchir, F Sangiuolo, A Helbling-Leclerc, M R D'Apice, C Massart, F Capon, et al. 2002. "Mandibuloacral Dysplasia Is Caused by a Mutation in LMNA-Encoding Lamin A/C." *American Journal of Human Genetics* 71 (2): 426–31. doi:10.1086/341908.

- Ognibene, A, P Sabatelli, S Petrini, S Squarzone, M Riccio, S Santi, M Villanova, S Palmeri, L Merlini, and N M Maraldi. 1999. "Nuclear Changes in a Case of X-Linked Emery-Dreifuss Muscular Dystrophy." *Muscle & Nerve* 22 (7): 864–69.
- Oldenburg, A R, E Delbarre, B Thiede, C Vigouroux, and P Collas. 2014. "Deregulation of Fragile X-Related Protein 1 by the Lipodystrophic Lamin A p.R482W Mutation Elicits a Myogenic Gene Expression Program in Preadipocytes." *Human Molecular Genetics* 23 (5). Oxford University Press: 1151–62. doi:10.1093/hmg/ddt509.
- Oliner, J D, J M Andresen, S K Hansen, S Zhou, and R Tjian. 1996. "SREBP Transcriptional Activity Is Mediated through an Interaction with the CREB-Binding Protein." *Genes & Development* 10 (22): 2903–11.
- Osorio, F G, C Bárcena, C Soria-Valles, A J Ramsay, F de Carlos, J Cobo, A Fueyo, J M P Freije, and C López-Otín. 2012. "Nuclear Lamina Defects Cause ATM-Dependent NF- κ B Activation and Link Accelerated Aging to a Systemic Inflammatory Response." *Genes & Development* 26 (20): 2311–24. doi:10.1101/gad.197954.112.
- Ostlund, C, G Bonne, K Schwartz, and H J Worman. 2001. "Properties of Lamin A Mutants Found in Emery-Dreifuss Muscular Dystrophy, Cardiomyopathy and Dunnigan-Type Partial Lipodystrophy." *Journal of Cell Science* 114 (Pt 24): 4435–45.
- Ozawa, R, Y K Hayashi, M Ogawa, R Kurokawa, H Matsumoto, S Noguchi, I Nonaka, and I Nishino. 2006. "Emerin-Lacking Mice Show Minimal Motor and Cardiac Dysfunctions with Nuclear-Associated Vacuoles." *The American Journal of Pathology* 168 (3): 907–17. doi:10.2353/ajpath.2006.050564.
- Padmakumar, V C, T Libotte, W Lu, H Zaim, S Abraham, A A Noegel, J Gotzmann, R Foisner, and I Karakesisoglou. 2005. "The Inner Nuclear Membrane Protein Sun1 Mediates the Anchorage of Nesprin-2 to the Nuclear Envelope." *Journal of Cell Science* 118 (Pt 15): 3419–30. doi:10.1242/jcs.02471.
- Pajeroski, J D, K N Dahl, F L Zhong, P J Sammak, and D E Discher. 2007. "Physical Plasticity of the Nucleus in Stem Cell Differentiation." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (40): 15619–24. doi:10.1073/pnas.0702576104.
- Pan, D, L D Estévez-Salmerón, S L Stroschein, X Zhu, J He, S Zhou, and K Luo. 2005. "The Integral Inner Nuclear Membrane Protein MAN1 Physically Interacts with the R-Smad Proteins to Repress Signaling by the Transforming Growth Factor- β Superfamily of Cytokines." *The Journal of Biological Chemistry* 280 (16): 15992–1. doi:10.1074/jbc.M411234200.
- Pappas, G D. 1956. "The Fine Structure of the Nuclear Envelope of Amoeba Proteus." *The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology* 2 (4 Suppl): 431–34.
- Paramio, J M, and D Ph. 2015. "Intermediate Filaments." Sinauer Associates, 1–15.
- Park, J Y, E D Javor, E K Cochran, A M DePaoli, and P Gorden. 2007. "Long-Term Efficacy of Leptin Replacement in Patients with Dunnigan-Type Familial Partial Lipodystrophy." *Metabolism: Clinical and Experimental* 56 (4): 508–16. doi:10.1016/j.metabol.2006.11.010.
- Parks, Sharie B, Jessica D Kushner, Deirdre Nauman, Donna Burgess, Susan Ludwigsen, Amanda Peterson, Duanxiang Li, et al. 2008. "Lamin A/C Mutation Analysis in a Cohort of 324 Unrelated Patients with Idiopathic or Familial Dilated Cardiomyopathy." *American Heart Journal* 156 (1): 161–69. doi:10.1016/j.ahj.2008.01.026.
- Parry, D A D, S V Strelkov, P Burkhard, U Aebi, and H Herrmann. 2007. "Towards a Molecular Description of Intermediate Filament Structure and Assembly." *Experimental Cell Research* 313 (10): 2204–16. doi:10.1016/j.yexcr.2007.04.009.
- Passage, E, J C Norreel, P Noack-Fraissignes, V Sanguedolce, J Pizant, X Thirion, A Robaglia-Schlupp, J F Pellissier, and M Fontés. 2004. "Ascorbic Acid Treatment Corrects the Phenotype of a Mouse Model of Charcot-Marie-Tooth Disease." *Nature Medicine* 10 (4): 396–401. doi:10.1038/nm1023.
- Pekovic, V, I Gibbs-Seymour, E Markiewicz, F Alzoghbi, A M Benham, R Edwards, M Wenhert, T von Zglinicki, and C J Hutchison. 2011. "Conserved Cysteine Residues in the Mammalian Lamin A Tail Are Essential for Cellular Responses to ROS Generation." *Aging Cell* 10 (6): 1067–79. doi:10.1111/j.1474-9726.2011.00750.x.
- Pekovic, V, J Harborth, J L V Broers, F C S Ramaekers, B van Engelen, M Lammens, T von Zglinicki, R Foisner, C Hutchison, and E Markiewicz. 2007. "Nucleoplasmic LAP2 α -Lamin A Complexes Are Required to Maintain a Proliferative State in Human Fibroblasts." *The Journal of Cell Biology* 176 (2): 163–72. doi:10.1083/jcb.200606139.
- Peric-Hupkes, D, W Meuleman, L Pagie, S W M Bruggeman, I Solovei, W Brugman, S Gräf, et al. 2010. "Molecular Maps of the Reorganization of Genome-Nuclear Lamina Interactions during Differentiation." *Molecular Cell* 38 (4): 603–13. doi:10.1016/j.molcel.2010.03.016.
- Perrone, S V, and E J Kaplinsky. 2005. "Calcium Sensitizer Agents: A New Class of Inotropic Agents in the Treatment of Decompensated Heart Failure." *International Journal of Cardiology* 103 (3): 248–55. doi:10.1016/j.ijcard.2004.12.012.
- Peter, A, and R Stick. 2012. "Evolution of the Lamin Protein Family: What Introns Can Tell." *Nucleus (Austin, Tex.)* 3 (1): 44–59.

- . 2015. "Evolutionary Aspects in Intermediate Filament Proteins." *Current Opinion in Cell Biology* 32: 48–55. doi:10.1016/j.ceb.2014.12.009.
- Peter, M, E Heitlinger, M Häner, U Aebi, and E A Nigg. 1991. "Disassembly of in Vitro Formed Lamin Head-to-Tail Polymers by CDC2 Kinase." *The EMBO Journal* 10 (6): 1535–44.
- Peter, M, G T Kitten, C F Lehner, K Vorbürger, S M Bailer, G Maridor, and E A Nigg. 1989. "Cloning and Sequencing of cDNA Clones Encoding Chicken Lamins A and B1 and Comparison of the Primary Structures of Vertebrate A- and B-Type Lamins." *Journal of Molecular Biology* 208 (3): 393–404. doi:10.1016/0022-2836(89)90504-4.
- Peter, M, J Nakagawa, M Dorée, J C Labbé, and E A Nigg. 1990. "In Vitro Disassembly of the Nuclear Lamina and M Phase-Specific Phosphorylation of Lamins by cdc2 Kinase." *Cell* 61 (4): 591–602.
- Petersen, K F, E A Oral, S Dufour, D Befroy, C Ariyan, C Yu, G W Cline, et al. 2002. "Leptin Reverses Insulin Resistance and Hepatic Steatosis in Patients with Severe Lipodystrophy." *The Journal of Clinical Investigation* 109 (10): 1345–50. doi:10.1172/JCI15001.
- Petrich, B G, X Gong, D L Lerner, X Wang, J H Brown, J E Saffitz, and Y Wang. 2002. "C-Jun N-Terminal Kinase Activation Mediates Downregulation of connexin43 in Cardiomyocytes." *Circulation Research* 91 (7): 640–47.
- Pette, D, and R S Staron. 2001. "Transitions of Muscle Fiber Phenotypic Profiles." *Histochemistry and Cell Biology* 115 (5): 359–72.
- Pickersgill, H, B Kalverda, E de Wit, W Talhout, M Fornerod, and B van Steensel. 2006. "Characterization of the Drosophila Melanogaster Genome at the Nuclear Lamina." *Nature Genetics* 38 (9). Nature Publishing Group: 1005–14. doi:10.1038/ng1852.
- Pilat, U, T Dechat, A T Bertrand, N Woisetschläger, I Gotic, R Spilka, K Biadasiewicz, G Bonne, and R Foisner. 2013. "The Muscle Dystrophy-Causing Δ K32 Lamin A/C Mutant Does Not Impair the Functions of the Nucleoplasmic Lamin-A/C-LAP2 α Complex in Mice." *Journal of Cell Science* 126 (Pt 8): 1753–62. doi:10.1242/jcs.115246.
- Poitelon, Y, S Kozlov, J Devaux, J-M Vallat, M Jamon, P Roubertoux, S Rabarimerarijaona, et al. 2012. "Behavioral and Molecular Exploration of the AR-CMT2A Mouse Model Lmna (R298C/R298C)." *Neuromolecular Medicine* 14 (1): 40–52. doi:10.1007/s12017-012-8168-z.
- Ponugoti, B, D-H Kim, Z Xiao, Z Smith, J Miao, M Zang, S-Y Wu, C-M Chiang, T D Veenstra, and J K Kemper. 2010. "SIRT1 Deacetylates and Inhibits SREBP-1C Activity in Regulation of Hepatic Lipid Metabolism." *The Journal of Biological Chemistry* 285 (44): 33959–70. doi:10.1074/jbc.M110.122978.
- Pratt, C H, M Curtain, L R Donahue, and L S Shopland. 2011. "Mitotic Defects Lead to Pervasive Aneuploidy and Accompany Loss of RB1 Activity in Mouse LmnaDhe Dermal Fibroblasts." *PLoS One* 6 (3): e18065. doi:10.1371/journal.pone.0018065.
- Quijano-Roy, S, B Mbieleu, C G Bönnemann, P-Y Jeannot, J Colomer, N F Clarke, J-M Cuisset, et al. 2008. "De Novo LMNA Mutations Cause a New Form of Congenital Muscular Dystrophy." *Annals of Neurology* 64 (2): 177–86. doi:10.1002/ana.21417.
- Raichur, S, S Hooi Teh, K Ohwaki, V Gaur, Y Chau Long, M Hargreaves, S L McGee, and J Kusunoki. 2012. "Histone Deacetylase 5 Regulates Glucose Uptake and Insulin Action in Muscle Cells." *Journal of Molecular Endocrinology* 49 (3). BioScientifica: 203–11. doi:10.1530/JME-12-0095.
- Rajan, S, H Chu Pham Dang, H Djambazian, H Zuzan, Y Fedyshyn, T Ketela, J Moffat, T J Hudson, and R Sladek. 2012. "Analysis of Early C2C12 Myogenesis Identifies Stably and Differentially Expressed Transcriptional Regulators Whose Knock-down Inhibits Myoblast Differentiation." *Physiological Genomics* 44 (2). American Physiological Society: 183–97. doi:10.1152/physiolgenomics.00093.2011.
- Ramos, F J, S C Chen, M G Garelick, D-F Dai, C-Y Liao, K H Schreiber, V L MacKay, et al. 2012. "Rapamycin Reverses Elevated mTORC1 Signaling in Lamin A/C-Deficient Mice, Rescues Cardiac and Skeletal Muscle Function, and Extends Survival." *Science Translational Medicine* 4 (144): 144ra103. doi:10.1126/scitranslmed.3003802.
- Reddy, K L, J M Zullo, E Bertolino, and H Singh. 2008. "Transcriptional Repression Mediated by Repositioning of Genes to the Nuclear Lamina." *Nature* 452 (7184): 243–47. doi:10.1038/nature06727.
- Redwood, A B, S M Perkins, R P Vanderwaal, Z Feng, K J Biehler, I Gonzalez-Suarez, L Morgado-Palacin, et al. 2011. "A Dual Role for A-Type Lamins in DNA Double-Strand Break Repair." *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)* 10 (15): 2549–60.
- Reinsch, S, and P Gönczy. 1998. "Mechanisms of Nuclear Positioning." *Journal of Cell Science* 111 (Pt 1 (August)): 2283–95.
- Reinsch, S, and E Karsenti. 1997. "Movement of Nuclei along Microtubules in Xenopus Egg Extracts." *Current Biology : CB* 7 (3): 211–14.
- Rivera-Torres, J, R Acín-Perez, P Cabezas-Sánchez, F G Osorio, C Gonzalez-Gómez, D Megias, C Cámara, et al. 2013. "Identification of Mitochondrial Dysfunction in Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome through Use of Stable Isotope

- Labeling with Amino Acids in Cell Culture." *Journal of Proteomics* 91 (October): 466–77. doi:10.1016/j.jprot.2013.08.008.
- Röber, R A, K Weber, and M Osborn. 1989. "Differential Timing of Nuclear Lamin A/C Expression in the Various Organs of the Mouse Embryo and the Young Animal: A Developmental Study." *Development (Cambridge, England)* 105 (2): 365–78.
- Rome, S, V Lecomte, E Meugnier, J Rieusset, C Debard, V Euthine, H Vidal, and E Lefai. 2008. "Microarray Analyses of SREBP-1a and SREBP-1c Target Genes Identify New Regulatory Pathways in Muscle." *Physiological Genomics* 34 (3): 327–37. doi:10.1152/physiolgenomics.90211.2008.
- Roux, K J, D I Kim, M Raida, and B Burke. 2012. "A Promiscuous Biotin Ligase Fusion Protein Identifies Proximal and Interacting Proteins in Mammalian Cells." *The Journal of Cell Biology* 196 (6): 801–10. doi:10.1083/jcb.201112098.
- Rudnicki, M A, P N Schnegelsberg, R H Stead, T Braun, H H Arnold, and R Jaenisch. 1993. "MyoD or Myf-5 Is Required for the Formation of Skeletal Muscle." *Cell* 75 (7): 1351–59.
- Sakaki, M, H Koike, N Takahashi, N Sasagawa, S Tomioka, K Arahata, and S Ishiura. 2001. "Interaction between Emerin and Nuclear Lamins." *Journal of Biochemistry* 129 (2): 321–27.
- Saksena, S, M D Summers, J K Burks, A E Johnson, and S C Braunagel. 2006. "Importin-Alpha-16 Is a Translocon-Associated Protein Involved in Sorting Membrane Proteins to the Nuclear Envelope." *Nature Structural & Molecular Biology* 13 (6): 500–508. doi:10.1038/nsmb1098.
- Salas, P J, M L Rodriguez, A L Vician, D E Vega-Salas, and H P Hauri. 1997. "The Apical Submembrane Cytoskeleton Participates in the Organization of the Apical Pole in Epithelial Cells." *The Journal of Cell Biology* 137 (2): 359–75.
- Sanchez, H B, L Yieh, and T F Osborne. 1995. "Cooperation by Sterol Regulatory Element-Binding Protein and Sp1 in Sterol Regulation of Low Density Lipoprotein Receptor Gene." *The Journal of Biological Chemistry* 270 (3): 1161–69.
- Scaffidi, P, and T Misteli. 2005. "Reversal of the Cellular Phenotype in the Premature Aging Disease Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome." *Nature Medicine* 11 (4): 440–45. doi:10.1038/nm1204.
- . 2006. "Lamin A-Dependent Nuclear Defects in Human Aging." *Science (New York, N.Y.)* 312 (5776): 1059–63. doi:10.1126/science.1127168.
- . 2008. "Lamin A-Dependent Misregulation of Adult Stem Cells Associated with Accelerated Ageing." *Nature Cell Biology* 10 (4): 452–59. doi:10.1038/ncb1708.
- Schreiner, S M, P K Koo, Y Zhao, S G J Mochrie, and M C King. 2015. "The Tethering of Chromatin to the Nuclear Envelope Supports Nuclear Mechanics." *Nature Communications* 6 (January). Nature Publishing Group: 7159. doi:10.1038/ncomms8159.
- Schweizer, J, P E Bowden, P A Coulombe, L Langbein, E B Lane, T M Magin, L Maltais, et al. 2006. "New Consensus Nomenclature for Mammalian Keratins." *The Journal of Cell Biology* 174 (2): 169–74. doi:10.1083/jcb.200603161.
- Shackleton, S, D J Lloyd, S N Jackson, R Evans, M F Niermeijer, B M Singh, H Schmidt, et al. 2000. "LMNA, Encoding Lamin A/C, Is Mutated in Partial Lipodystrophy." *Nature Genetics* 24 (2): 153–56. doi:10.1038/72807.
- Shimi, T, V Butin-Israeli, S a Adam, R B Hamanaka, A E Goldman, C a Lucas, D K Shumaker, S T Kosak, N S Chandel, and R D Goldman. 2011. "The Role of Nuclear Lamin B1 in Cell Proliferation and Senescence." *Genes & Development* 25 (24): 2579–93. doi:10.1101/gad.179515.111.
- Shimi, T, K Pflieger, S-i Kojima, C-G Pack, I Solovei, A E Goldman, S a Adam, et al. 2008. "The A- and B-Type Nuclear Lamin Networks: Microdomains Involved in Chromatin Organization and Transcription." *Genes & Development* 22 (24): 3409–21. doi:10.1101/gad.1735208.
- Shin, J-Y, I Méndez-López, Y Wang, A P Hays, K Tanji, J H Lefkowitz, P C Schulze, H J Worman, and W T Dauer. 2013. "Lamina-Associated Polypeptide-1 Interacts with the Muscular Dystrophy Protein Emerin and Is Essential for Skeletal Muscle Maintenance." *Developmental Cell* 26 (6): 591–603. doi:10.1016/j.devcel.2013.08.012.
- Shumaker, D K, L Solimando, K Sengupta, T Shimi, S A Adam, A Grunwald, S V Strelkov, U Aebi, M C Cardoso, and R D Goldman. 2008. "The Highly Conserved Nuclear Lamin Ig-Fold Binds to PCNA: Its Role in DNA Replication." *The Journal of Cell Biology* 181 (2): 269–80. doi:10.1083/jcb.200708155.
- Simha, V, S Rao, and A Garg. 2008. "Prolonged Thiazolidinedione Therapy Does Not Reverse Fat Loss in Patients with Familial Partial Lipodystrophy, Dunnigan Variety." *Diabetes, Obesity & Metabolism* 10 (12): 1275–76. doi:10.1111/j.1463-1326.2008.00978.x.
- Simon, D N, T Domaradzki, W A Hofmann, and K L Wilson. 2013. "Lamin A Tail Modification by SUMO1 Is Disrupted by Familial Partial Lipodystrophy-Causing Mutations." *Molecular Biology of the Cell* 24 (3): 342–50. doi:10.1091/mbc.E12-07-0527.

- Simon, D N, and K L Wilson. 2013. "Partners and Post-Translational Modifications of Nuclear Lamins." *Chromosoma* 122 (1–2): 13–31. doi:10.1007/s00412-013-0399-8.
- Simon, D N, M S Zastrow, and K L Wilson. 2010. "Direct Actin Binding to A- and B-Type Lamin Tails and Actin Filament Bundling by the Lamin A Tail." *Nucleus (Austin, Tex.)* 1 (3): 264–72. doi:10.4161/nucl.1.3.11799.
- Skoczyńska, A, E Budzisz, A Dana, and H Rotsztein. 2015. "New Look at the Role of Progerin in Skin Aging." *Przegląd Menopauzalny = Menopause Review* 14 (1): 53–58. doi:10.5114/pm.2015.49532.
- Smerdu, V, I Karsch-Mizrachi, M Campione, L Leinwand, and S Schiaffino. 1994. "Type IIx Myosin Heavy Chain Transcripts Are Expressed in Type IIb Fibers of Human Skeletal Muscle." *The American Journal of Physiology* 267 (6 Pt 1): C1723–8.
- Snider, N T, and M B Omary. 2014. "Post-Translational Modifications of Intermediate Filament Proteins: Mechanisms and Functions." *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 15 (3). Nature Publishing Group: 163–77. doi:10.1038/nrm3753.
- Snipes, G J, U Suter, A A Welcher, and E m Shooterm. 1992. "Characterization of a Novel Peripheral Nervous System Myelin Protein (PMP-22/SR13)." *The Journal of Cell Biology*. The Rockefeller University Press.
- Solovei, I, A S Wang, K Thanisch, C S Schmidt, S Krebs, M Zwerger, T V Cohen, et al. 2013. "LBR and Lamin A/C Sequentially Tether Peripheral Heterochromatin and Inversely Regulate Differentiation." *Cell* 152 (3). Elsevier Inc.: 584–98. doi:10.1016/j.cell.2013.01.009.
- Somech, R, S Shaklai, O Geller, N Amariglio, A J Simon, G Rechavi, and E N Gal-Yam. 2005. "The Nuclear-Envelope Protein and Transcriptional Repressor LAP2beta Interacts with HDAC3 at the Nuclear Periphery, and Induces Histone H4 Deacetylation." *Journal of Cell Science* 118 (Pt 17): 4017–25. doi:10.1242/jcs.02521.
- Song, S, A Landsbury, R Dahm, Y Liu, Q Zhang, and R A Quinlan. 2009. "Functions of the Intermediate Filament Cytoskeleton in the Eye Lens." *The Journal of Clinical Investigation* 119 (7): 1837–48. doi:10.1172/JCI38277.
- Sosa, B A, A Rothballer, U Kutay, and T U Schwartz. 2012. "LINC Complexes Form by Binding of Three KASH Peptides to Domain Interfaces of Trimeric SUN Proteins." *Cell* 149 (5): 1035–47. doi:10.1016/j.cell.2012.03.046.
- Speckman, R A, A Garg, F Du, L Bennett, R Veile, E Arioglu, S I Taylor, M Lovett, and A M Bowcock. 2000. "Mutational and Haplotype Analyses of Families with Familial Partial Lipodystrophy (Dunnigan Variety) Reveal Recurrent Missense Mutations in the Globular C-Terminal Domain of Lamin A/C." *American Journal of Human Genetics* 66 (4): 1192–98. doi:10.1086/302836.
- Spreyer, P, G Kuhn, C O Hanemann, C Gillen, H Schaal, R Kuhn, G Lemke, and H W Müller. 1991. "Axon-Regulated Expression of a Schwann Cell Transcript That Is Homologous to a 'Growth Arrest-Specific' Gene." *The EMBO Journal* 10 (12): 3661–68.
- Starr, D A, and M Han. 2003. "ANCHors Away: An Actin Based Mechanism of Nuclear Positioning." *Journal of Cell Science* 116 (Pt 2): 211–16.
- Strelkov, S V, J Schumacher, P Burkhard, U Aebi, and H Herrmann. 2004. "Crystal Structure of the Human Lamin A Coil 2B Dimer: Implications for the Head-to-Tail Association of Nuclear Lamins." *Journal of Molecular Biology* 343 (4): 1067–80. doi:10.1016/j.jmb.2004.08.093.
- Stuurman, N, S Heins, and U Aebi. 1998. "Nuclear Lamins: Their Structure, Assembly, and Interactions." *Journal of Structural Biology* 122 (1–2): 42–66. doi:10.1006/jsbi.1998.3987.
- Sullivan, T, D Escalante-Alcalde, H Bhatt, M Anver, N Bhat, K Nagashima, C L Stewart, and B Burke. 1999. "Loss of A-Type Lamin Expression Compromises Nuclear Envelope Integrity Leading to Muscular Dystrophy." *The Journal of Cell Biology* 147 (5): 913–20.
- Suzuki, Y, H Yang, and R Craigie. 2004. "LAP2alpha and BAF Collaborate to Organize the Moloney Murine Leukemia Virus Preintegration Complex." *The EMBO Journal* 23 (23): 4670–78. doi:10.1038/sj.emboj.7600452.
- Swift, J, I L Ivanovska, A Buxboim, T Harada, P C D P Dingal, J Pinter, J D Pajerowski, et al. 2013. "Nuclear Lamin-A Scales with Tissue Stiffness and Enhances Matrix-Directed Differentiation." *Science (New York, N.Y.)* 341 (6149): 1240104. doi:10.1126/science.1240104.
- Tadano, N, S Morimoto, A Yoshimura, M Miura, K Yoshioka, M Sakato, I Ohtsuki, Y Miwa, F Takahashi-Yanaga, and T Sasaguri. 2005. "SCH00013, a Novel Ca(2+) Sensitizer with Positive Inotropic and No Chronotropic Action in Heart Failure." *Journal of Pharmacological Sciences* 97 (1): 53–60.
- Taimen, P, K Pflieger, T Shimi, D Möller, K Ben-Harush, M R Erdos, S a Adam, et al. 2009. "A Progeria Mutation Reveals Functions for Lamin A in Nuclear Assembly, Architecture, and Chromosome Organization." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (49): 20788–93. doi:10.1073/pnas.0911895106.
- Takahashi, A, E S Alnemri, Y A Lazebnik, T Fernandes-Alnemri, G Litwack, R D Moir, R D Goldman, G G Poirier, S H Kaufmann, and W C Earnshaw. 1996. "Cleavage of Lamin A by Mch2 Alpha but Not CPP32: Multiple Interleukin 1 Beta-

- Converting Enzyme-Related Proteases with Distinct Substrate Recognition Properties Are Active in Apoptosis." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 (16): 8395–8400.
- Talbot, J, and L Maves. 2016. "Skeletal Muscle Fiber Type: Using Insights from Muscle Developmental Biology to Dissect Targets for Susceptibility and Resistance to Muscle Disease." *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology* 5 (4). John Wiley & Sons, Inc.: 518–34. doi:10.1002/wdev.230.
- Taniura, H, C Glass, and L Gerace. 1995. "A Chromatin Binding Site in the Tail Domain of Nuclear Lamins That Interacts with Core Histones." *The Journal of Cell Biology* 131 (1): 33–44.
- Tapley, E C, and D A Starr. 2013. "Connecting the Nucleus to the Cytoskeleton by SUN-KASH Bridges across the Nuclear Envelope." *Current Opinion in Cell Biology* 25 (1): 57–62. doi:10.1016/j.ceb.2012.10.014.
- Taylor, M R G, D Slavov, A Gajewski, S Vlcek, L Ku, P R Fain, E Carniel, et al. 2005. "Thymopoietin (Lamina-Associated Polypeptide 2) Gene Mutation Associated with Dilated Cardiomyopathy." *Human Mutation* 26 (6): 566–74. doi:10.1002/humu.20250.
- Tilgner, K, K Wojciechowicz, C Jahoda, C Hutchison, and E Markiewicz. 2009. "Dynamic Complexes of A-Type Lamins and Emerin Influence Adipogenic Capacity of the Cell via Nucleocytoplasmic Distribution of Beta-Catenin." *Journal of Cell Science* 122 (Pt 3): 401–13. doi:10.1242/jcs.026179.
- Tilstra, J S, A R Robinson, J Wang, S Q Gregg, C L Clauson, D P Reay, L A Nasto, et al. 2012. "NF- κ B Inhibition Delays DNA Damage-Induced Senescence and Aging in Mice." *The Journal of Clinical Investigation* 122 (7): 2601–12. doi:10.1172/JCI45785.
- Toth, J I, S H Yang, X Qiao, A P Beigneux, M H Gelb, C L Moulson, J H Miner, S G Young, and L G Fong. 2005. "Blocking Protein Farnesyltransferase Improves Nuclear Shape in Fibroblasts from Humans with Progeroid Syndromes." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (36): 12873–78. doi:10.1073/pnas.0505767102.
- Towbin, B D, C González-Aguilera, R Sack, D Gaidatzis, V Kalck, P Meister, P Askjaer, and S M Gasser. 2012. "Step-Wise Methylation of Histone H3K9 Positions Heterochromatin at the Nuclear Periphery." *Cell* 150 (5): 934–47. doi:10.1016/j.cell.2012.06.051.
- Tskhovrebova, L, and J Trinick. 2003. "Titin: Properties and Family Relationships." *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 4 (9): 679–89. doi:10.1038/nrm1198.
- Ulbert, S, W Antonin, M Platani, and I W Mattaj. 2006. "The Inner Nuclear Membrane Protein Lem2 Is Critical for Normal Nuclear Envelope Morphology." *FEBS Letters* 580 (27): 6435–41. doi:10.1016/j.febslet.2006.10.060.
- Vadrot, N, I Duband-Goulet, E Cabet, W Attanda, A Barateau, P Vicart, F Gerbal, et al. 2014. "The p.R482W Substitution in A-Type Lamins Deregulates SREBP1 Activity in Dunnigan-Type Familial Partial Lipodystrophy." *Human Molecular Genetics*, December, ddu728-. doi:10.1093/hmg/ddu728.
- Van Berlo, J H, J W Voncken, N Kubben, J L V Broers, R Duisters, R E W van Leeuwen, H J G M Crijns, F C S Ramaekers, C J Hutchison, and Y M Pinto. 2005. "A-Type Lamins Are Essential for TGF-beta1 Induced PP2A to Dephosphorylate Transcription Factors." *Human Molecular Genetics* 14 (19): 2839–49. doi:10.1093/hmg/ddi316.
- Varela, I, J Cadiñanos, A M Pendás, A Gutiérrez-Fernández, A R Folgueras, L M Sánchez, Z Zhou, et al. 2005. "Accelerated Ageing in Mice Deficient in Zmpste24 Protease Is Linked to p53 Signalling Activation." *Nature* 437 (7058): 564–68. doi:10.1038/nature04019.
- Varela, I, S Pereira, A P Ugalde, C L Navarro, M F Suárez, P Cau, J Cadiñanos, et al. 2008. "Combined Treatment with Statins and Aminobisphosphonates Extends Longevity in a Mouse Model of Human Premature Aging." *Nature Medicine* 14 (7): 767–72. doi:10.1038/nm1786.
- Verstraeten, V L R M, J L V Broers, M A M van Steensel, S Zinn-Justin, F C S Ramaekers, P M Steijlen, M Kamps, et al. 2006. "Compound Heterozygosity for Mutations in LMNA Causes a Progeria Syndrome without Prelamin A Accumulation." *Human Molecular Genetics* 15 (16): 2509–22. doi:10.1093/hmg/ddl172.
- Verstraeten, V L R M, S Caputo, M A M van Steensel, I Duband-Goulet, S Zinn-Justin, M Kamps, H J H Kuijpers, et al. 2009. "The R439C Mutation in LMNA Causes Lamin Oligomerization and Susceptibility to Oxidative Stress." *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 13 (5). Wiley-Blackwell: 959–71. doi:10.1111/j.1582-4934.2009.00690.x.
- Verstraeten, V L R M, J Y Ji, K S Cummings, R T Lee, and J Lammerding. 2008. "Increased Mechanosensitivity and Nuclear Stiffness in Hutchinson-Gilford Progeria Cells: Effects of Farnesyltransferase Inhibitors." *Aging Cell* 7 (3): 383–93. doi:10.1111/j.1474-9726.2008.00382.x.
- Vigouroux, C, M Auclair, E Dubosclard, M Pouchet, J Capeau, J C Courvalin, and B Buendia. 2001. "Nuclear Envelope Disorganization in Fibroblasts from Lipodystrophic Patients with Heterozygous R482Q/W Mutations in the Lamin A/C Gene." *Journal of Cell Science* 114 (Pt 24): 4459–68.

- Viteri, G, Y W Chung, and E R Stadtman. 2010. "Effect of Progerin on the Accumulation of Oxidized Proteins in Fibroblasts from Hutchinson Gilford Progeria Patients." *Mechanisms of Ageing and Development* 131 (1): 2–8. doi:10.1016/j.mad.2009.11.006.
- Vlcek, S, H Just, T Dechat, and R Foisner. 1999. "Functional Diversity of LAP2 α and LAP2 β in Postmitotic Chromosome Association Is Caused by an α -Specific Nuclear Targeting Domain." *The EMBO Journal* 18 (22). EMBO Press: 6370–84. doi:10.1093/emboj/18.22.6370.
- Walter, M C, T N Witt, B S Weigel, P Reilich, P Richard, D Pongratz, G Bonne, M S Wehnert, and H Lochmüller. 2005. "Deletion of the LMNA Initiator Codon Leading to a Neurogenic Variant of Autosomal Dominant Emery-Dreifuss Muscular Dystrophy." *Neuromuscular Disorders : NMD* 15 (1): 40–44. doi:10.1016/j.nmd.2004.09.007.
- Wang, Y, A J Herron, and H J Worman. 2006. "Pathology and Nuclear Abnormalities in Hearts of Transgenic Mice Expressing M371K Lamin A Encoded by an LMNA Mutation Causing Emery-Dreifuss Muscular Dystrophy." *Human Molecular Genetics* 15 (16): 2479–89. doi:10.1093/hmg/ddl170.
- Wang, Y, A A Panteleyev, D M Owens, K Djabali, C L Stewart, and H J Worman. 2008. "Epidermal Expression of the Truncated Prelamin A Causing Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome: Effects on Keratinocytes, Hair and Skin." *Human Molecular Genetics* 17 (15): 2357–69. doi:10.1093/hmg/ddn136.
- Wang, Z, N D Udeshi, C Slawson, P D Compton, K Sakabe, W D Cheung, J Shabanowitz, D F Hunt, and G W Hart. 2010. "Extensive Crosstalk between O-GlcNAcylation and Phosphorylation Regulates Cytokinesis." *Science Signaling* 3 (104): ra2. doi:10.1126/scisignal.2000526.
- Ward, G E, and M W Kirschner. 1990. "Identification of Cell Cycle-Regulated Phosphorylation Sites on Nuclear Lamin C." *Cell* 61 (4): 561–77.
- Wheeler, M A, and J A Ellis. 2008. "Molecular Signatures of Emery-Dreifuss Muscular Dystrophy." *Biochemical Society Transactions* 36 (Pt 6): 1354–58. doi:10.1042/BST0361354.
- Wheeler, M A, A Warley, R G Roberts, E Ehler, and J A Ellis. 2010. "Identification of an Emerin-Beta-Catenin Complex in the Heart Important for Intercalated Disc Architecture and Beta-Catenin Localisation." *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS* 67 (5): 781–96. doi:10.1007/s00018-009-0219-8.
- Wolin, S L, G Krohne, and M W Kirschner. 1987. "A New Lamin in Xenopus Somatic Tissues Displays Strong Homology to Human Lamin A." *The EMBO Journal* 6 (12): 3809–18.
- Worman, H J. 2012. "Nuclear Lamins and Laminopathies." *The Journal of Pathology* 226 (2): 316–25. doi:10.1002/path.2999.
- Worman, H J, and G Bonne. 2007. "'Laminopathies': A Wide Spectrum of Human Diseases." *Experimental Cell Research* 313 (10): 2121–33. doi:10.1016/j.yexcr.2007.03.028.
- Worman, H J, C Ostlund, and Y Wang. 2010. "Diseases of the Nuclear Envelope." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2 (2): a000760. doi:10.1101/cshperspect.a000760.
- Wu, D, A R Flannery, H Cai, E Ko, and K Cao. 2014. "Nuclear Localization Signal Deletion Mutants of Lamin A and Progerin Reveal Insights into Lamin A Processing and Emerin Targeting." *Nucleus (Austin, Tex.)* 5 (1). Landes Bioscience: 66–74. doi:10.4161/nucl.28068.
- Wu, W, A Muchir, J Shan, G Bonne, and H J Worman. 2011. "Mitogen-Activated Protein Kinase Inhibitors Improve Heart Function and Prevent Fibrosis in Cardiomyopathy Caused by Mutation in Lamin A/C Gene." *Circulation* 123 (1): 53–61. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.110.970673.
- Wu, W, J Shan, G Bonne, H J Worman, and A Muchir. 2010. "Pharmacological Inhibition of c-Jun N-Terminal Kinase Signaling Prevents Cardiomyopathy Caused by Mutation in LMNA Gene." *Biochimica et Biophysica Acta* 1802 (7–8): 632–38. doi:10.1016/j.bbadis.2010.04.001.
- Yang, L, M Munck, K Swaminathan, L E Kapinos, A A Noegel, and S Neumann. 2013. "Mutations in LMNA Modulate the Lamin A - Nesprin-2 Interaction and Cause LINC Complex Alterations." Edited by Alfred Lewin. *PLoS ONE* 8 (8). Public Library of Science: e71850. doi:10.1371/journal.pone.0071850.
- Yang, S H, M O Bergo, J I Toth, X Qiao, Y Hu, S Sandoval, M Meta, et al. 2005. "Blocking Protein Farnesyltransferase Improves Nuclear Blebbing in Mouse Fibroblasts with a Targeted Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome Mutation." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (29). National Academy of Sciences: 10291–96. doi:10.1073/pnas.0504641102.
- Zaremba-Czogalla, M, K Piekawicz, K Wachowicz, K Koziół, M Dubińska-Magiera, and R Rzepecki. 2012. "The Different Function of Single Phosphorylation Sites of Drosophila Melanogaster Lamin Dm and Lamin C." *PLoS One* 7 (2): e32649. doi:10.1371/journal.pone.0032649.
- Zastrow, M S, D B Flaherty, G M Benian, and K L Wilson. 2006. "Nuclear Titin Interacts with A- and B-Type Lamins in Vitro and in Vivo." *Journal of Cell Science* 119 (Pt 2). Company of Biologists: 239–49. doi:10.1242/jcs.02728.

- Zhang, D, P J Beresford, A H Greenberg, and J Lieberman. 2001. "Granzymes A and B Directly Cleave Lamins and Disrupt the Nuclear Lamina during Granule-Mediated Cytolysis." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (10): 5746–51. doi:10.1073/pnas.101329598.
- Zhang, Y-Q, and K D Sarge. 2008. "Sumoylation Regulates Lamin A Function and Is Lost in Lamin A Mutants Associated with Familial Cardiomyopathies." *The Journal of Cell Biology* 182 (1): 35–39. doi:10.1083/jcb.200712124.
- Zullo, J M, I A Demarco, R Piqué-Regi, D J Gaffney, C B Epstein, C J Spooner, T R Luperchio, et al. 2012. "DNA Sequence-Dependent Compartmentalization and Silencing of Chromatin at the Nuclear Lamina." *Cell* 149 (7): 1474–87. doi:10.1016/j.cell.2012.04.035.
- Zwenger, M, D E Jaalouk, M L Lombardi, P Isermann, M Mauermann, G Dialynas, H Herrmann, L L Wallrath, and J Lammerding. 2013. "Myopathic Lamin Mutations Impair Nuclear Stability in Cells and Tissue and Disrupt Nucleo-Cytoskeletal Coupling." *Human Molecular Genetics* 22 (12): 2335–49. doi:10.1093/hmg/ddt079.

Annexes

Annexe 1 : In Situ Detection of Interactions between Nuclear Envelope Proteins and Partners¹

Alice Barateau and Brigitte Buendia

Summary

Proximity Ligation Assay (PLA) appears as a quick and easy technique to visualize within fixed cells the occurrence and in situ distribution of protein complexes. PLA has been validated to detect protein-protein interactions within the nuclear compartment. Here, we describe a protocol which allows the detection of interactions between A-type nuclear lamins and either LEM-domain proteins (such as emerin, integrated within the inner nuclear membrane, and LAP2 α which accumulates within the nucleoplasm) or gene regulatory factors (e.g. the transcription factor SREBP1). The distinct amounts and patterns of PLA signals obtained for various complexes highlight the pertinence of using PLA to reveal *in situ* where and to which extent nuclear envelope proteins bind specific partners.

Key words : Proximity ligation assay, Nuclear proteins, Lamins.

¹ Article publié dans *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.) en 2016
DOI : 10.1007/978-1-4939-3530-7_9

1. Introduction

Pull down and blot overlay assays using purified recombinant proteins produced in bacteria, rabbit reticulocyte or wheat germ lysates routinely allow the detection of direct protein-protein interactions. In the case of A-type nuclear lamins, nuclear proteins that belong to the intermediate filament protein family, such methods have led to the identification of ~30 direct binding partners (*1-4*). Still, *in vitro* interactions need to be validated in cells. Moreover, expression level, post-translational modifications and subcellular distribution of two partners of interest are expected to vary in different cell types or in particular extracellular environments, affecting the efficiency of their association to each other. Biochemical approaches such as co-immunoprecipitation (co-IP) are often used to detect interactions. Co-IP requires a significant amount of cellular material and a determination of cell lysis conditions enabling solubilization of the two partners without affecting their interaction. The latter is particularly tricky in the case of nuclear lamins which, as components of the nuclear matrix, are largely resistant to biochemical extraction (*5*). Lastly, although pull-down and co-IP assays are complementary, they are incomplete regarding knowledge of the subcellular site where the protein-protein interactions takes place. To palliate to this limitation, fluorescence resonance energy transfer (FRET) and proximity ligation assays (PLA) can be used. In comparison to FRET which requires overexpression of two ectopic proteins with distinct fluorescent tags, e.g. [GFP-emerin – RFP-lamin A] or [GFP-emerin – RFP-LAP1] (*6*), [GFP-lamin A - DsRed-lamin B1] (*7*), or [CFP-lamin A – YFP-cfos] (*8*), PLA has the advantage to detect complexes composed of either ectopic proteins, such as [FLAG-lamin A – HA-SREBP1] (*9*) or endogenous proteins, such as [lamin A/C – SREBP1] (*9*), [lamin A/C – phosphorylated H2AX] (*10*), or [lamin B1 – activated p38 MAPK] (*11*).

The PLA methodology was initially reported more than 10 years ago (*12*). PLA consists in an adaptation of the proximity ligation technique for highly specific *in situ* detection coupled to a localized amplification reaction (*13, 14*). A representation of the different steps leading to *in situ* detection of protein-protein complexes is shown in **Figure 1**. PLA necessitates cell fixation, permeabilization and incubation with a mix of two primary antibodies of different species, as for conventional immunofluorescence. In contrast to immunofluorescence however, fluorescently labeled secondary antibodies are replaced by two PLA probes. These consist of specific secondary antibodies, each with a unique short DNA strand (oligonucleotide) attached to it. When the two proteins of interest are in the same complex, proximity between the PLA probes (< 40 nm) is sufficiently close to enable interaction between the oligonucleotide after addition and hybridization of two connector oligonucleotides. The latter are guided to form a circular structure covalently joined by enzymatic DNA ligation. Upon addition of the specific Phi29 DNA polymerase, one of the oligonucleotides serves as a primer for rolling circle amplification (RCA). The RCA product is a randomly coiled, single-stranded chain composed of up to several hundreds of complements of the DNA circle, subsequently detected by hybridizing complementary fluorophore-labeled oligonucleotides.

Here, we describe a PLA protocol that enables in our hands successful detection of interactions between A-type lamins and either “lamin/emerin/MAN1” (LEM)-domain proteins such as emerlin which is integrated within the inner nuclear membrane, LAP2 α which accumulates in the nucleoplasm (*15*), or gene regulatory factors such as the transcription factor SREBP1 (*9*).

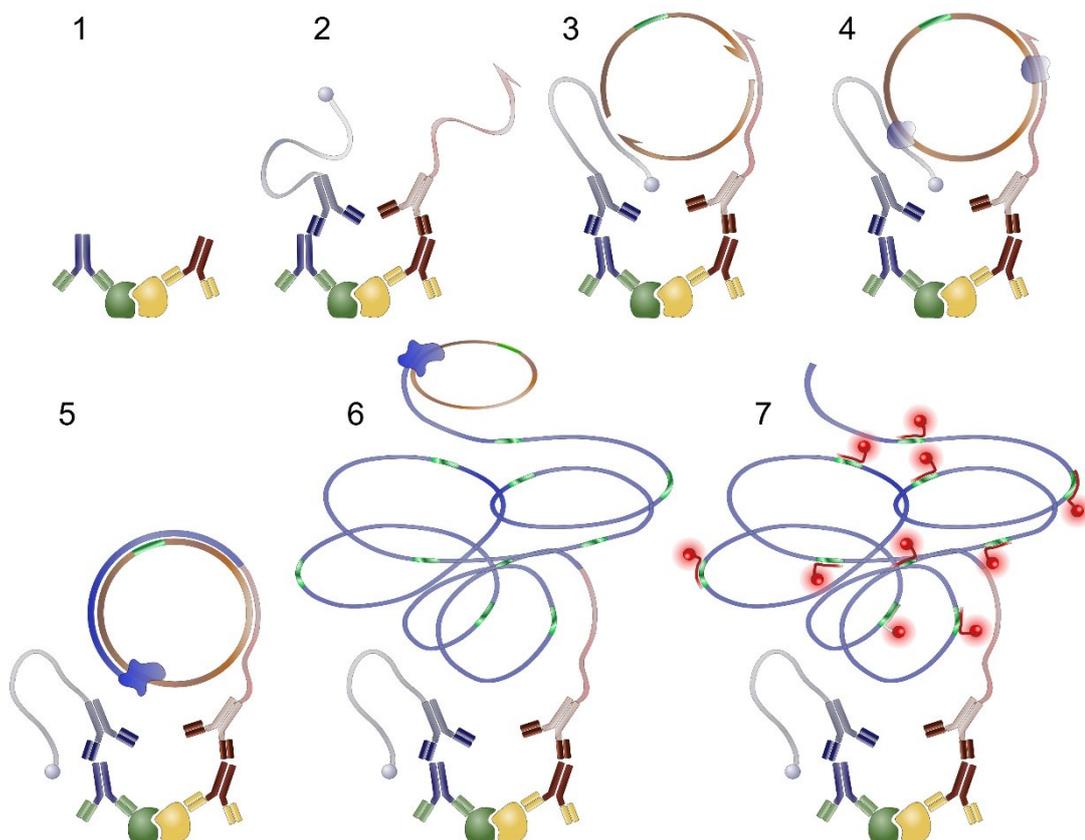


Fig. 1. Steps of the proximity ligation assay, leading to detection of proximities between protein partners in cells. 1) Two primary antibodies bind their specific targets. 2) Two PLA probes (secondary antibodies, each with a unique short oligonucleotide attached to it) bind to primary antibodies. 3) Two connector oligonucleotides allow interaction between the short DNA strands when they are in close proximity (< 40 nm). 4) Action of a DNA ligase allows circularization of the connector oligonucleotides. 5) One of the oligonucleotides serves as primer for rolling circle amplification (RCA) by the phi29 DNA polymerase. 6) RCA produces a randomly coiled, single-stranded chain composed of up to several hundreds of complements of the DNA circle. 7) The RCA product is detected by hybridizing complementary fluorophore-labeled oligonucleotides.

2. Materials

2.1. Laboratory Equipment

1. Sterile chamber slides for cell culture: MilliCell EZ 8-well glass slides (0.7 cm²/well; 0.2-0.7 mL/well), or Ibidi 15-well μ -slides (0.125 cm²/well, 10-50 μ L/well).
2. Heat transfer block, e.g. Thermomixer or equivalent.
3. Shaker.
4. Staining jars.
5. Vacuum pump.
6. Freeze block for enzymes.
7. Grease pen.
8. Glass coverslips (24 x 50 mm, 0.13-0.17 mm thick).
9. Nail varnish.

2.2. Reagents

1. High purity water.
2. Phosphate buffered saline (PBS).

3. Triton X-100.
4. PBS containing 0.5% Triton X-100.
5. PBS containing 0.1% Triton X-100.
6. PBS containing 0.05% Triton X-100.
7. Bovine serum albumin (BSA), IgG- and protease-free.
8. Paraformaldehyde solution at 4% in PBS.
9. 3% fixative solution in PBS. Prepare freshly and keep at room temperature.
10. Blocking solution for immunofluorescence: 2% BSA in PBS containing 0.1% Triton X-100. Dissolve 0.1 g BSA in 5 mL PBS containing 0.1% Triton X-100. This can be stored for a few days at 4°C.
11. Antibody dilution solution: mix 1 mL blocking solution with 1 mL PBS containing 0.1% Triton X-100. This can be stored for a few days at 4°C.
12. DuoLink II Wash buffer A (no. 82047, Sigma; *see Note 1*). Keep at 4°C for storage and bring to room temperature (RT) before use.
13. DuoLink II Wash buffer B (no. 82048, Sigma; *see Note 2*). Keep at 4°C for storage and bring to RT before use.
14. Mounting medium with DAPI. Keep at 4°C.

2.3. Antibodies

1. Rabbit anti-lamin A/C (16).
2. Mouse anti-emerin (NCL, Leica).
3. Rabbit anti-LAP2 α (IQ175, ImmuQuest)
4. Mouse anti-lamin A/C (clone 636, Novocastra).

2.4. PLA Probes and Detection Reagents

1. DuoLink II in situ PLA probe anti-Rabbit PLUS (ref DUO92002, Sigma), containing a 5X stock of donkey anti rabbit IgG conjugated with an oligonucleotide PLUS. Keep at 4°C.
2. DuoLink II in situ PLA probe anti-Mouse MINUS (ref DUO92004, Sigma), containing a 5X stock of donkey anti mouse conjugated with an oligonucleotide Minus. Keep at 4°C.
3. DuoLink II Detection Reagents Orange (ref DUO92007, Sigma). This kit contains i) the ligase and the 5X ligation reagent (including two connector oligonucleotides that hybridize the PLA probes) required to prepare the ligation mix and ii) the DNA polymerase and the 5X rolling circle amplification reagent (including nucleotides and fluorescently labeled oligonucleotide probes that hybridize the RCA product) required to prepare the amplification mix. Keep at -20°C.

2.5. Fluorescently-labeled Secondary Antibodies

Fluorescently-labeled secondary antibodies are used to localize proteins by immunofluorescence (*see Note 3*).

1. Cy3-conjugated affinipure goat anti-mouse IgG (used at 1:400; 115-165-146, Jackson ImmunoResearch)
2. Cy2-conjugated affinipure Goat anti-rabbit IgG (used at 1:60; 111-225-144, Jackson ImmunoResearch)

3. Methods

The methods described here are for the MilliCell EZ slide (8-well glass). Throughout the protocol, media and buffers are removed gently from the wells and from the reaction areas on the microscopic slides by aspiration using a pipette tip connected to a vacuum pump system. Special care is required at all steps to prevent slides from drying out. For incubations with blocking solution, antibodies or PLA reagents, use open droplet reactions in a humid environment to prevent excessive evaporation. The entire protocol from cell fixation to mounting of slides with medium takes more than 6 h (Fig. 2).

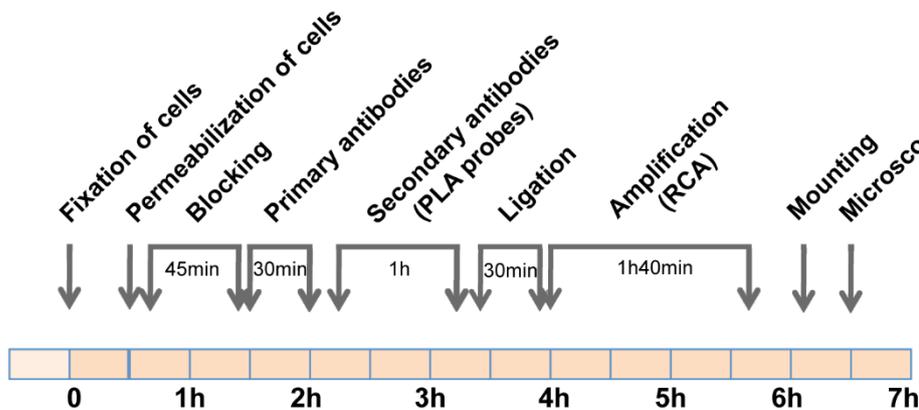


Fig. 2. Time course of the PLA protocol.

3.1. Antibody Preparation

Antibodies are prepared just before use with the antibody dilution solution.

1. For detection of lamin A/C-emerin complexes: prepare a mix of rabbit anti-lamin A/C (use at 1:500) and mouse anti-emerin (use at 1:30).
2. Negative control for lamin A/C-emerin complexes detected by PLA: prepare rabbit anti-lamin A/C (use at 1:500).
3. *In situ* detection of lamin A/C-LAP2 α complexes: prepare a mix of rabbit anti-LAP2 α (use at 1:250) and mouse anti-lamin A/C (use at 1:150).
4. Negative control for lamin A/C-LAP2 α complexes detected by PLA: prepare mouse anti-lamin A/C (use at 1:150).

3.2. Cell Preparation

1. Remove cell culture media from each well of the chamber slide.
2. Quickly wash cells in PBS (0.5 mL / well).
3. Add fixative solution (0.5 mL / well) and incubate for 12 min at RT (*see Note 4*).
4. Remove fixative solution and wash in PBS (0.5 mL / well) for 5 min at RT.
5. Permeabilize cells with PBS/0.5% Triton X100 (0.5 mL / well) for 5 min at RT.
6. Remove permeabilization solution and add PBS (0.5 mL / well).
7. Disassemble the MilliCell EZ slide unit to access the microscope slide (*see Note 5; Fig. 3*).
8. Remove PBS and delimitate 8 reaction areas with the hydrophobic barrier pen.
9. Fill each reaction area with 100 μ L PBS.

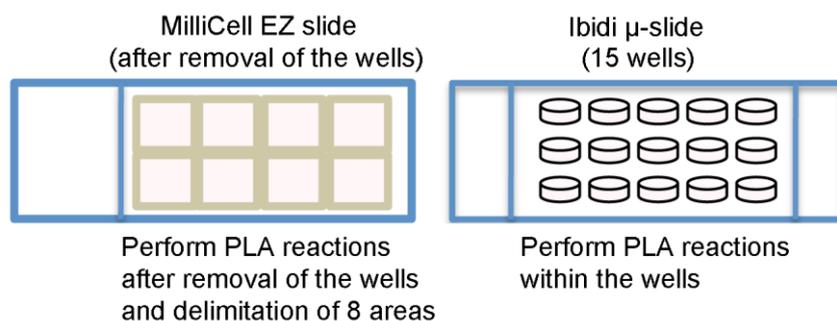


Fig. 3. The two models of slides used for PLA.

3.3. Blocking

1. Remove PBS and add blocking solution for immunofluorescence (100 μL / reaction area). Incubate 45 min at RT.

3.4. Primary Antibody Incubation

1. Prepare a fresh cocktail of primary antibodies (see **Section 3,1**), 50 μL / reaction area.
2. Remove blocking solution.
3. Add primary antibodies solution within the reaction areas. Incubate 30 min at RT (**Fig. 1**, step 1).
4. In the last 5 min of incubation, prepare the mix of the two PLA probes: dilute the stocks 1:5 in antibody dilution solution (30 μL / reaction area: 6 μL PLA probe anti Mouse MINUS + 6 μL probe anti Rabbit PLUS + 18 μL of antibody dilution solution). Keep 20 min at RT before use.
5. Remove primary antibodies from slide.
6. Wash slide in a stain jar containing ~ 70 mL PBS/0.05% Triton, 3 times 5 min at RT with gentle agitation.

3.5. Secondary Antibody Incubation

1. Drain off residual PBS from the slide.
2. Add the mix of PLA probes from **Section 2.4** (30 μL / reaction area). Incubate 1 h at 37°C (**Fig. 1**, step 2) (*see Note 6; Fig. 4*).
3. Thaw the 5X ligation reagent at RT.
4. Prepare the ligation buffer (29.25 μL / reaction area: 6 μL 5X ligation reagent + 23.25 μL high purity water).
5. Remove PLA probes from the slide.
6. Wash the slide in a stain jar with ~ 70 mL of wash buffer A twice 5 min at RT with gentle agitation.

3.6. PLA: Ligation

1. Just before use, prepare the ligation mix from **Section 2.4**: remove the ligase from the freezer using a freezing block and dilute 1:40 in ligation buffer (30 μL / reaction area: 0,75 μL ligase + 29.25 μL ligation buffer). Vortex.
2. Drain off the residual PBS buffer from the slide.
3. Add the ligation mix (30 μL / reaction area). Incubate 30 min at 37°C (**Fig. 1**, steps 3 and 4).
4. Thaw the 5X amplification reagent at RT.
5. Prepare the amplification buffer (29.62 μL / reaction area: 6 μL of 5X amplification reagent + 23.62 μL of high purity water).

6. Remove the ligation mix from the slide.
7. Wash slides in a stain jar with ~70 mL wash buffer A, twice 2 min at RT with gentle agitation.

3.7. PLA: Rolling Circle Amplification

1. Just before use, prepare the amplification mix: remove DNA polymerase from freezer using a freezing block and dilute 1:80 in amplification buffer (30 μ L / reaction area: 0.38 μ L DNA polymerase + 29.62 μ L amplification buffer). Vortex.
2. Drain off residual PBS buffer from the slide.
3. Add the amplification mix (30 μ L / reaction area). Incubate for 1 h 40 min at 37°C (**Fig. 1**, steps 5-7) (*see Note 6*).

3.8. PLA: Final Washes and Mounting

1. Remove the amplification mix from slide.
2. Wash slide in a stain jar with ~70 mL wash buffer B, twice 10 min at RT with gentle agitation.
3. Wash slide in a stain jar with ~70 mL wash buffer B diluted 1 :100 in high purity water, for 1 min at RT with gentle agitation.
4. Let slides dry at RT in the dark.
5. Mount slides in the dark with a coverslip using mounting medium (*see Note 7; Fig. 5*)
6. Wait at least 15 min before observation in the microscope. Keep slides at -20°C in the dark for several months if needed.

3.9. Microscope Observation and Image Analysis

1. Observe slides in a confocal microscope (*see Note 7*).
2. Analyze PLA signals using suitable software packages (*see Note 8*).

4. Notes

1. Wash buffer A can also be prepared by dissolving 1.2 g Tris base, 8.8 g NaCl and 0.5 mL Tween 20 in 800 mL high purity water, adjusting pH to 7.4 using HCl, and bringing the volume to 1 L with high purity water (final concentrations are 0.01 M Tris, 0.15 M NaCl and 0.05% Tween 20). Filter the solution through a 0.22 μ m filter and store at 4°C.
2. Wash buffer B can also be prepared by dissolving 4.24 g Tris base, 26.0 g Tris-HCl and 5.84 g NaCl in 500 mL high purity water, adjusting pH to 7.5 using HCl, and bringing volume to 1 L with high purity water (final concentrations are 0.2 M Tris and 0.1 M NaCl). Filter the solution through a 0.22 μ m filter and store at 4°C.
3. To validate the first steps of PLA, i.e. cell fixation, cell permeabilization and recognition of proteins of interest by the primary antibodies, it is necessary to analyze the samples of interest in parallel on a second slide by conventional immunofluorescence, using secondary antibodies tagged with a fluorophore, as indicated in **Section 2.5**.
4. In the 15-well microscope slides, the volume of fixative solution to add is 70 μ L / well, whereas the minimal volume to add for primary antibodies, PLA probes and PLA reagent solutions is 10 μ L / well.

- Before incubations with antibodies and PLA reagents, wells are removed from the MilliCell EZ slides. In order to reinforce the delimitation of the PLA reaction areas, a hydrophobic barrier is created with a grease pen. In comparison, it is not possible to detach the bottom from the upper part of the Ibidi 15-well μ -slides (**Fig. 3**). The main advantages of working with the Ibidi slides are 1) reduction of the amount of cells and materials used for PLA and 2) possibility to do more assays in parallel per slide. Ibidi slides also have an "ibiTreat" surface that optimizes adhesion of most cell types. However, in our hands they gave a slightly higher background than MilliCell EZ slides for the PLA signals.
- It is very important to prevent evaporation from the slides at all steps to limit unspecific PLA signals. A humid environment must be maintained within a heat transfer block (**Fig. 4**). In addition, the cover of the heat transfer block protects the fluorescently labeled oligonucleotide probes in the amplification mix from light (**Section 3.7**).

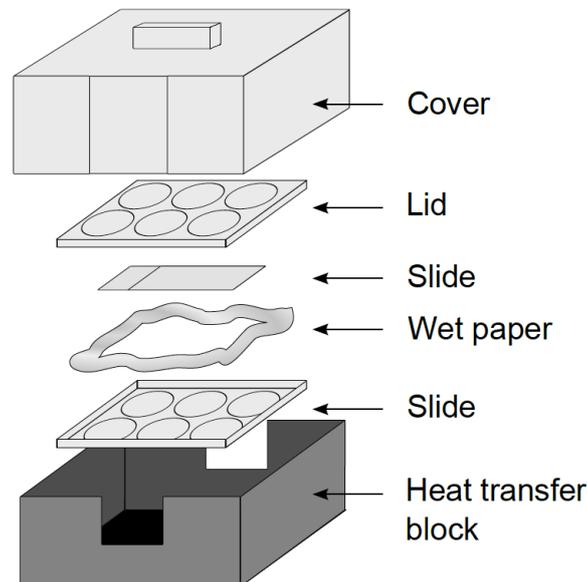


Fig. 4. Control of a humid environment within a heat transfer block. The microscope slide is transferred within a box (e.g. two lids of a 6-12 well plates positioned one on the other, enclosing wet paper) pre-heated at 37°C by placing it in a heat transfer block.

- Mounting of slides and the way to observe samples in the confocal microscope depend on the format of the slides used for the PLA experiment (**Fig. 5**).

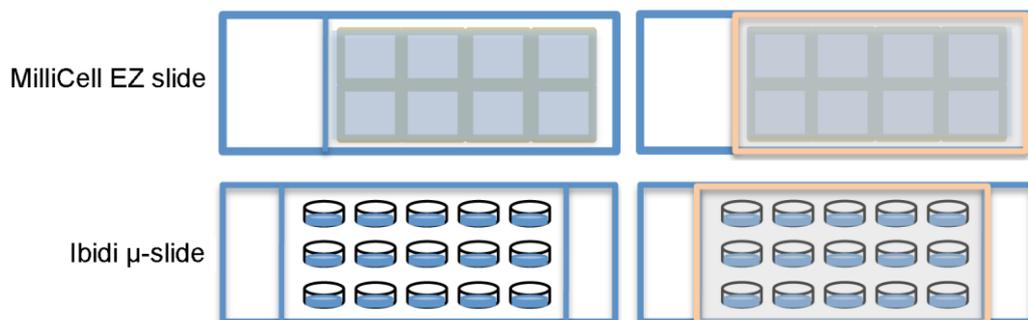


Fig. 5. Mounting of slides. Mounting medium is distributed homogeneously between the MilliCell slide and the coverslip, before sealing with nail varnish (upper panels). For the 15-well Ibidi slides, mounting medium is

added to each well and a coverslip is placed on top of the wells to protect samples (lower panels). Observation in an inverted microscope will occur through the top of the coverslip or through the bottom of the slide for the Millicell glass slide and the 15 well Ibidi μ -slide, respectively.

8. Several imaging software can be used to analyze PLA data, such as the DuoLink Image tool in Image J. Depending on the amount of signal, it is possible to quantify the number of individual signals (which appear as dots) (10, 11); however, when the density of PLA signals is so high that one cannot distinguish individual spots, data are analyzed by fluorescence intensity measurement. In our recent study on [SREBP1 - lamin A/C] protein complexes, PLA data were compiled as numbers of recognized pixels and as a function of their distance to the closest point of the nuclear periphery; this was done on images using a custom image recognition Image J plugin (9).

5. Conclusion

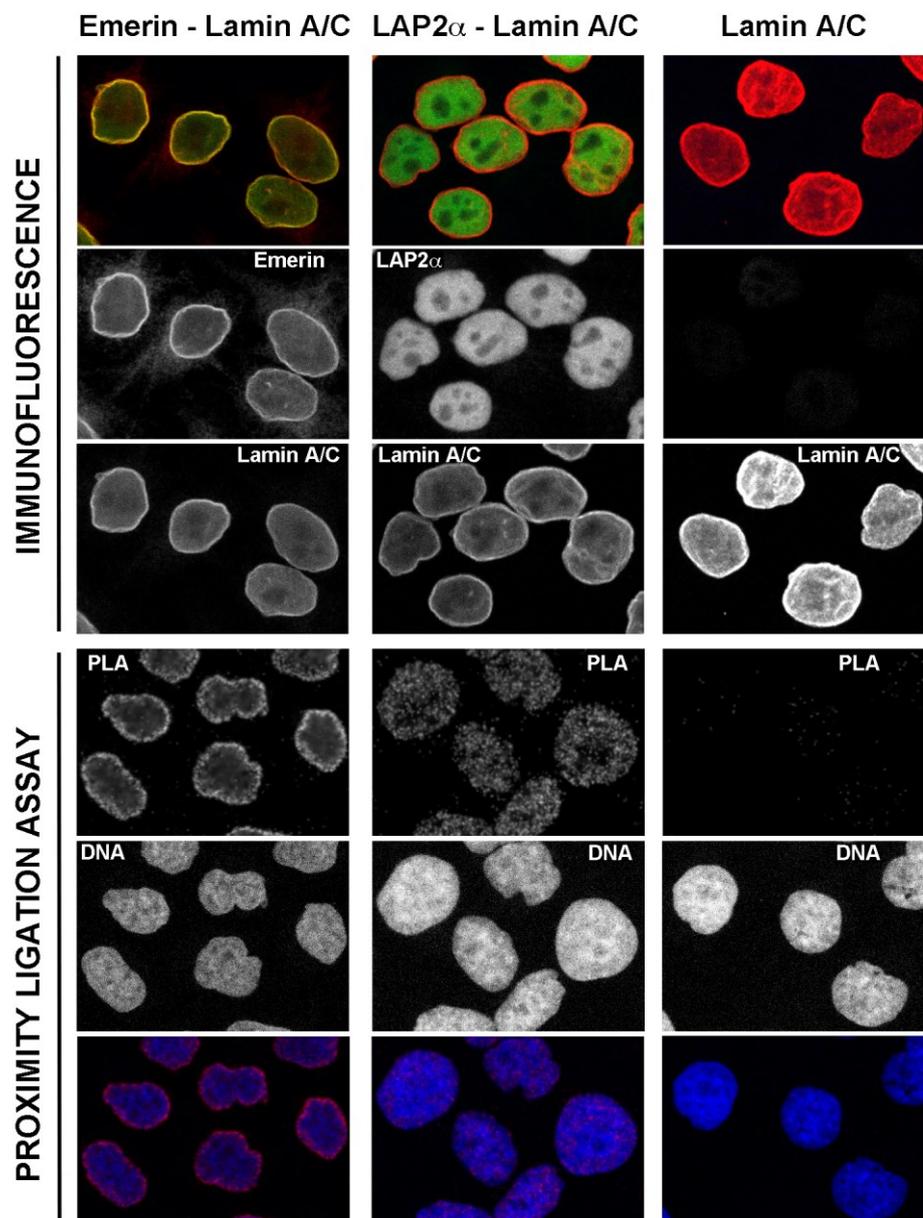


Fig. 6. Intranuclear distribution of lamin A/C, emerin and LAP2 α , with detection of their close proximities assessed by PLA in HeLa cells. Upper part shows the subnuclear location of lamin A/C and its two partners as revealed by conventional immunofluorescence (left panel, emerin in red and lamin A/C in green; middle and right panel, LAP2 α in green and lamin A/C in red). Lower part shows

detection of [lamin A/C – emerin] (left) and [lamin A/C - LAP2 α] complexes (middle) PLA. Right panel, negative control experiment using one single primary antibody (here, mouse anti-lamin A/C). Merged images show DNA (blue) and PLA signals (red). Bars, 10 μ m (confocal microscopy).

As shown in **Figure 6**, the PLA protocol has allowed us to reveal distinct patterns of *in situ* subnuclear distribution for the protein-protein complexes [lamin A/C – emerin] and [lamin A/C – LAP2 α]. While [lamin A/C – emerin] complexes appear concentrated at the nuclear periphery, [lamin A/C – LAP2 α] complexes are detected throughout the nuclear interior. These observations are in accord with the dual location of lamin A/C at nuclear envelope and in the nucleoplasm, and with the restricted location of emerin and LAP2 α at the nuclear envelope and in the nucleoplasm, respectively (15). These observations highlight the pertinence of using PLA to reveal where and to which extent nuclear envelope proteins form complexes with specific partners.

Acknowledgement.

This work was supported by CNRS, University Paris Diderot Paris 7 and the Association Française contre les Myopathies.

References

1. Simon, D.N. and Wilson, K.L. (2013) Partners and post-translational modifications of nuclear lamins. *Chromosoma* 122, 13-31.
2. Oldenburg, A.R., Delbarre, E., Thiede, B., Vigouroux, C. and Collas, P. (2014) Deregulation of Fragile X-related protein 1 by the lipodystrophic lamin A p.R482W mutation elicits a myogenic gene expression program in preadipocytes. *Hum Mol Genet* 23, 1151-1162.
3. Liu, B., Ghosh, S., Yang, X., Zheng, H., Liu, X., Wang, Z., Jin, G., Zheng, B., Kennedy, B.K., Suh, Y., Kaeberlein, M., Tryggvason, K. and Zhou, Z. (2012) Resveratrol rescues SIRT1-dependent adult stem cell decline and alleviates progeroid features in laminopathy-based progeria. *Cell Metab* 16, 738-750.
4. Liu, B., Wang, Z., Zhang, L., Ghosh, S., Zheng, H. and Zhou, Z. (2013) Depleting the methyltransferase Suv39h1 improves DNA repair and extends lifespan in a progeria mouse model. *Nat Commun* 4:1868, 1-12.
5. Krohne, G. (2004) Lamins. *Methods Cell Biol* 78, 573-596.
6. Shin, J.Y., Mendez-Lopez, I., Wang, Y., Hays, A.P., Tanji, K., Lefkowitz, J.H., Schulze, P.C., Worman, H.J. and Dauer, W.T. (2013) Lamina-associated polypeptide-1 interacts with the muscular dystrophy protein emerin and is essential for skeletal muscle maintenance. *Dev Cell* 26, 591-603.
7. 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.
8. Ivorra, C., Kubicek, M., Gonzalez, J.M., Sanz-Gonzalez, S.M., Alvarez-Barrientos, A., O'Connor, J.E., Burke, B. and Andres, V. (2006) A mechanism of AP-1 suppression through interaction of c-Fos with lamin A/C. *Genes Dev* 20, 307-320.
9. Vadrot, N., Duband-Goulet, I., Cabet, E., Attanda, W., Barateau, A., Vicart, P., Gerbal, F., Briand, N., Vigouroux, C., Oldenburg, A.R., Lund, E.G., Collas, P. and Buendia, B. (2015) The p.R482W substitution in A-type lamins deregulates SREBP1 activity in Dunnigan-type familial partial lipodystrophy. *Hum Mol Genet* 24, 2096-2109.
10. 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.
11. Barascu, A., Le Chalony, C., Pennarun, G., Genet, D., Imam, N., Lopez, B. and Bertrand, P. (2012) Oxidative stress induces an ATM-independent senescence pathway through p38 MAPK-mediated lamin B1 accumulation. *EMBO J* 31, 1080-1094.
 12. Fredriksson, S., Gullberg, M., Jarvius, J., Olsson, C., Pietras, K., Gustafsdottir, S.M., Ostman, A. and Landegren, U. (2002) Protein detection using proximity-dependent DNA ligation assays. *Nat Biotechnol* 20, 473-477.
 13. Söderberg, O., Gullberg, M., Jarvius, M., Ridderstrale, K., Leuchowius, K.J., Jarvius, J., Wester, K., Hydbring, P., Bahram, F., Larsson, L.G. and Landegren, U. (2006) Direct observation of individual endogenous protein complexes in situ by proximity ligation. *Nat Methods* 3, 995-1000.
 14. Lievens, S. and Tavernier, J. (2006) Single protein complex visualization: seeing is believing. *Nat Methods* 3, 971-972.
 15. Wilson, K.L. and Foisner, R. (2010) Lamin-binding Proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2, a000554.
 16. Duband-Goulet, I., Woerner, S., Gasparini, S., Attanda, W., Konde, E., Tellier-Lebegue, C., Craescu, C.T., Gombault, A., Roussel, P., Vadrot, N., Vicart, P., Östlund, C., Worman, H.J., Zinn-Justin, S. and Buendia, B. (2011) Subcellular localization of SREBP1 depends on its interaction with the C-terminal region of wild-type and disease related A-type lamins. *Exp Cell Res* 317, 2800-2813.

Annexe 2 : A novel lamin A mutant responsible for congenital muscular dystrophy causes several abnormalities of the cell nucleus. ²

Alice Barateau¹, Nathalie Vadrot¹, Patrick Vicart¹, Ana Ferreiro¹, Michèle Mayer², Delphine Héron³, Corinne Vigouroux^{4,5}, Brigitte Buendia¹

¹ Unité de Biologie Fonctionnelle et Adaptative (BFA), CNRS UMR 8251, Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, 75013 Paris, France

² Centre de référence de diagnostic et de suivi des maladies neuromusculaires de l'Est Parisien – secteur pédiatrique. Hôpital d'Enfants Armand Trousseau, 75571 Paris, France.

³ Delphine Héron, Centre de référence Déficiences intellectuelles, Département de Génétique et INSERM U 975, Groupe hospitalier Pitié-Salpêtrière, 75013 Paris, France.

⁴ Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 6, Inserm UMR_ S938, Centre de Recherche Saint-Antoine, ICAN, Institute of Cardiometabolism and Nutrition, Paris F-75012, France

⁵ AP-HP, Hôpital Saint-Antoine, Laboratoire Commun de Biologie et Génétique Moléculaires, Paris F-75012, France

Corresponding author : Brigitte Buendia, (33)1 57 27 79 58. brigitte.buendia@univ-paris-diderot.fr

KEY WORDS :

Lamin A, Congenital Muscular Dystrophy, nuclear dysmorphism, H3 acetylation

RUNNING TITLE:

LMNA mutations and nuclear defects

SUMMARY STATEMENT

A new lamin A mutant responsible for congenital muscular dystrophy alters lamin assembly, protein interactions at the nuclear envelope, histone acetylation and nuclear shape in myoblasts.

ABSTRACT

Congenital muscular dystrophy (CMD), a devastating disorder, is caused by mutations in multiple genes. Here, we identified a novel heterozygous *LMNA* p.R388P mutation in a patient with a non-previously described phenotype associating CMD and lipodystrophy. Skin fibroblasts from the patient entered prematurely into senescence and some nuclei showed a lamina honeycomb pattern with local depletion of lamin B1. In transfected C2C12 myoblasts, R388P-lamin A did not integrate properly within the nuclear envelope but accumulated within the nucleoplasm, altering the nuclear anchorage of emerin and LAP2 α . The mutant lamin A triggered a frequent and severe nuclear dysmorphism which occurs independently of prelamin A processing. Nuclear dysmorphism was not significantly improved by releasing the forces exerted at the nuclear envelope by microtubules or actin filaments. In addition, R388P-lamin A increased histone acetylation (H3K9/K27). However, exposure of the cells to anacardic acid which decreases histone acetylation did not rescue their nuclear shape. Altogether, our results show that the *LMNA* p.R388P mutation induces a series of distinct nucleus abnormalities in myoblasts and leads to a severe clinical phenotype.

INTRODUCTION

The *LMNA* gene encodes A-type lamins, lamins A and C (LA/C) being the 2 major isoforms. Expression of these intermediate filament proteins is regulated during development and cell differentiation. Prelamin A (664 a.a) and lamin C (572 a.a) are produced by alternative splicing. Mature lamin A (646 a.a) is generated after posttranslational modifications of prelamins A, a process which includes farnesylation and carboxylmethylation of Cysteine 661 followed by proteolysis of the last 18 a.a by the metalloproteinase Zmpste24 (Dechat et al., 2008). In cells, A-type lamins form a lamina network at the nuclear envelope (NE) while another pool assembles in the nuclear interior. By binding numerous partners (integral proteins of the inner nuclear membrane, factors involved in gene expression regulation and DNA), A-type lamins modulate nuclear mechanics, genome integrity, transcriptional events and signal transduction (Simon and Wilson, 2013).

In the last 15 years, ~400 mutations have been identified throughout the *LMNA* gene as responsible for laminopathies, expressed as different types of tissue-specific dystrophies affecting either cardiac, cartilage, bone, skin, neuro-muscular and/or adipose tissues, and including syndromes of premature ageing (Hutchinson-Gilford progeria, mandibulo-acral dysplasia, restrictive dermopathy) (Worman and Bonne, 2007; Dittmer and Misteli, 2011). **Here we identified** a novel heterozygous *LMNA* missense mutation (p.R388P) located between the coil-coil domain and the carboxyl-terminal domain of A-type lamins, in a patient with congenital muscular dystrophy (L-CMD). The few *LMNA* mutations (~23) previously reported as responsible for L-CMD are located all along the different regions of A-type lamins (N-ter, coil 1a, coil2 and C-ter). Only one mutation of the 388th amino acid of lamin A was previously shown to be pathogenic, and was associated with L-CMD (R388C, one case) (Benedetti et al., 2007). For each *LMNA* mutation identified, the challenge to take up is to decipher at the cellular level which functions of lamins are specifically altered in order to propose pertinent therapeutic protocols.

Our analysis of the patient skin fibroblasts bearing the heterozygous p.R388P *LMNA* mutation reveal defects in the lamina integrity and in the cell proliferation capacities. We further show that in the context of myoblasts, the overexpression of R388P lamins A induces severe alteration in lamina assembly and nuclear morphology. Nuclear dysmorphism has been previously associated to laminopathies where unprocessed lamin A accumulates abnormally, as in progeroid syndromes. Nuclear shape alteration was thus proposed to be caused by the insertion of farnesylated prelamins A to the lipid bilayer of the inner nuclear membrane (Polychronidou and Großhans, 2011). Instead, our study shows that nuclear dysmorphism associated with the R388P lamin A mutation responsible for L-CMD does not rely on a defect of prelamins A processing, revealing distinct nuclear abnormalities.

RESULTS

Identification of a novel *LMNA* p.R388P heterozygous mutation in a patient with congenital muscular dystrophy (L-CMD).

A female patient born from healthy unrelated Caucasian parents presented with unstable gait and frequent falls since gait acquisition at age 12 months, later associated with difficulties climbing stairs, inability to run and limited walking distance. Examination at age 3 years showed waddling gait with marked hyperlordosis, limb girdle muscle weakness predominating in pelvic girdle, calf hypertrophy and areflexia. CPK level was elevated (up to 1951 UI/l), electromyography was myopathic, brain magnetic resonance imaging and FKRP sequencing were normal and a muscle biopsy showed dystrophic changes [with normal expression of sarcolemmal proteins, calpain and dysferlin]. The course of disease was steadily progressive, leading to loss of independent ambulation outdoors at 5 years, joint contractures (spine, right equinovarus foot) from age 6.5 years which initially coexisted with knee hyperextension (*genu recurvatum*) requiring casts and/or braces, and subsequently total loss of ambulation and generalized joint contractures (rigid spine, elbow, knee, hips, ankles) from 11 years. Dorsal hyperlordosis was associated with restrictive respiratory insufficiency which appeared at 9 years and was slowly progressive (FVC=49% of the predicted value and moderate polysomnography abnormalities at 18 years). Holter studies revealed symptomatic supraventricular hyperexcitability at age 10 years and mixed (supra- and ventricular) symptomatic hyperexcitability from 12 years with ventricular doublets and extrasystoles which were improved by treatment with bisoprolol. Systolic function was normal. In addition, a lipodystrophic morphotype developed progressively since early puberty (age 10), with a striking accumulation of adipose tissue in the cervicofacial and subclavicular regions, and a subcutaneous lipoatrophy of distal upper and lower limbs, while BMI remained in the normal range (17.1 kg/m² at age 11, 60th percentile). Glucose tolerance abnormalities, hyperinsulinemia and oligomenorrhea improved with dietary management while lipodystrophy persisted. Serum triglycerides were normal. A c.1163G>C heterozygous change in *LMNA* exon 7, predicting a p.R388P substitution, was identified in the patient but not in her parents or her healthy sister. This *de novo* mutation was absent in more than 150 unrelated control subjects. It was neither found in ExAC nor 1000G databases and was predicted to be damaging by PolyPhen-2, SIFT and Mutation Taster.

Skin fibroblasts of the patient bearing the *LMNA* p.R388P mutation enter prematurely into senescence.

Immunofluorescence analysis performed on primary cultures of control and patient skin fibroblasts showed correct lamin A/C distribution (both at the NE and in the nucleoplasm) in the vast majority of patient fibroblasts (84 % vs 81 %, Fig. 1A). However, in ~4% of the cell population, (Fig. 1A) we observed abnormalities of the lamina network consisting in honeycomb-like structures stained for lamin A/C but locally depleted of lamin B1. These defects were similar to those that we described previously in fibroblasts from patients with *LMNA*-associated familial partial lipodystrophy (FPLD) (Vigouroux et al., 2001) and autosomal dominant Emery-Dreifuss muscular dystrophy (AD-EDMD) (Favreau et al., 2003). None of the control cells showed this abnormal pattern.

By immunoblot, we detected similar levels of lamin A but reduced lamin C in patient versus control fibroblasts at all the cell passages analysed (Fig. 1B-C). The expression level of lamin B1 decreased progressively with cell passages (p10 to p14, Fig. 1B and D) specifically in patient fibroblasts, which suggested a defect in their cell growth (Freund et al., 2012). Indeed, premature senescence of patient fibroblasts was validated by their flattened and enlarged morphological aspect (Fig. 1E), their increased nuclear size (Fig. 1F) and by the increased percentage of cells positive for senescence associated- β galactosidase activity (Fig. 1G).

The *LMNA* p.R388P mutation increases the solubility of lamins A and prevents their proper integration into the lamina network of myoblasts.

The L-CMD-related p.R388P mutation is located within a basic cluster at the junction coil 2B/C-ter domain of lamin A/C, which contributes to the lamin polymer assembly (Fig. S1 ; Strelkov et al., 2004). To study the consequences of this mutation in myoblasts, C2C12 cells were transfected with pCMV plasmids encoding WT or R388P FLAG-tagged prelamin A (Fig. 2). The complex intracellular posttranslational processing of prelamin A (664 aa) (pre-LA), which comprises farnesylation and proteolytic steps, results in the synthesis of mature lamin A (646 aa) (mLA). The mix of both forms of lamins A (pre-LA + mLA) was referred to as LA. We also studied the progeroid disorders-associated mutants L647R pre-LA (Wang et al., 2016) and progerin, which cannot be processed into mature lamin A due to a point mutation or a deletion in the Zmpste24 proteolytic cleavage site (Fig. 2).

Both WT and R388P pre-LA proteins were incompletely processed in transfected cells, as assessed by western blot comparing bands stained by anti-FLAG or anti-LA/C antibodies (which recognizes both endogenous and ectopic lamins) in cells overexpressing WT, R388P or L647R pre-LA or WT mLA (Fig. 3A). The incomplete processing of ectopic pre-LA was further confirmed when revealing western blots with anti-prelamin A specific antibodies (Fig. 3A). R388P FLAG-LA was expressed at similar levels as WT FLAG-LA, likely reflecting the same stability of mutant and WT protein.

Immunofluorescence microscopy with anti-FLAG antibodies revealed the abnormal subnuclear distribution of the mutant LA, with FLAG-LA restricted to the nucleoplasm in 82% of cells expressing R388P-LA versus 13% of cells expressing WT-LA (Fig. 3B-C), or targeted to nuclear ring-like structures in 8% of cells expressing R388P-LA versus 13% of cells expressing WT-LA (Fig. 3B and C). Of note, nuclear morphology of myoblasts expressing R388P FLAG-LA was frequently abnormal (Fig. 3B and see below).

The predominant nucleoplasmic localisation of R388P lamins A prompted us to investigate whether this mutant associates properly with the nuclear matrix. As expected, cell fractionation revealed the large recovery of WT FLAG-LA in the insoluble fraction (~48% of the ectopic WT lamins; Fig. 3D-E), reflecting their strong integration in the lamina network. In contrast, R388P FLAG-LA was abundantly released into the soluble fractions (68% in S1) whereas less than 3% of R388P FLAG-LA was insoluble (Fig. 3D-E). These biochemical data show that the R388P-LA has lost the capacity to integrate properly into the nuclear lamina network. The expression of R388P FLAG-LA did not significantly alter the solubility of endogenous lamin A (Fig. 3F).

Both R388P-mutated mature lamin A and prelamin A induce nuclear dysmorphism.

We asked whether nuclear dysmorphies observed in a subpopulation of C2C12 cells expressing R388P-LA were induced by either unprocessed prelamin A and/or mature lamin A. Quantification of nuclear dysmorphism was assessed on cells stained for DNA and FLAG-LA by visual observation and by measurement of the mean nuclear circularity (Fig. 4A). Upon expression of R388P vs WT FLAG-LA, the frequency of dysmorphic nuclei showed a 3.5-fold increase (from 10 to 35%) whereas the mean nuclear circularity decreased (from 0.82 to 0.69) (Fig. 4B and Fig. S2A-B). In addition, the severity of nuclear dysmorphism was increased upon expression of mutant lamins A, as validated by a decreased nuclear circularity of the subpopulation of dysmorphic nuclei expressing WT vs R388P lamins A (0.71 vs 0.60, respectively; Fig. S2C).

We then forced the accumulation of prelamin A (aa 1-664) by incubating cells expressing R388P FLAG-preLA with mevinolin, a HMG-CoA reductase inhibitor which blocks the first step of pre-LA processing by decreasing the synthesis of farnesyl pyrophosphate, the substrate of farnesyl transferases (Fig. 4C-E). Alternatively, we overexpressed the double mutant R388P-L647R FLAG-preLA, which can undergo farnesylation but not proteolysis, due to the mutation of the Zmpste 24 protease site (Fig. 4F-H). While the treatment of cells with 10 μ M mevinolin blocked pre-LA processing (Fig. 4C), it did not modify its subnuclear distribution (Fig. 4D) or changed the frequency of nuclear dysmorphism (40% vs 32%, NS; Fig. 4E). Addition of mevinolin had no significant effect on the frequency of dysmorphic nuclei in cells expressing WT FLAG-LA (10% vs 8%; Fig. 4E). Consistently, the R388P-L647R double mutant FLAG-preLA, which remained constitutively

farnesylated (Fig. 4F) was detected at the NE (Fig. 4G) and triggered a similar frequency of dysmorphic nuclei as the R388P FLAG-LA (41% vs 34%; Fig. 4H). Additionally, the mutant mature lamin A (R388P-mLA) located exclusively within the nucleoplasm (Fig. 4I-J) and induced a similar frequency of nuclear dysmorphism as R388P-LA (25% vs 28%; Fig. 6K).

In conclusion, nuclear dysmorphism induced by R388P lamins A in myoblasts, does not rely on defective prelamin A processing.

The R388P mutant lamins A alter NE integrity in myoblasts.

The integrity of the NE in the laminopathic context was evaluated by performing double immunofluorescence with antibodies directed against FLAG and either LA/C or lamin B1. As a control, endogenous LA/C and LB1 were observed at the NE of ovoid nuclei in myoblasts overexpressing WT LA (Fig. 5). In some cells expressing R388P FLAG-tagged LA or mLA, a faint detection of endogenous WT LA/C and local depletion of LB1 was observed at the NE (Fig. 5, middle panels). In cells expressing R388P-L647R farnesylated prelamin A, located at the NE together with endogenous A-type lamins, some nuclei showed abundant NE folds with weak LB1 staining (Fig. 5). Interestingly, in our experimental conditions, progerin, the mutant prelamin A responsible for progeria, also induced NE folds but did not trigger severe nuclear dysmorphism as did the R388P-L647R prelamin A (Fig. 5). We conclude that in myoblasts, the L-CMD R388P related LA mutant induces a loss of NE integrity, and a more severe nuclear dysmorphism than does progerin.

The R388P mutant lamins A modify the nuclear anchorage of two partners, emerin and LAP2 α in myoblasts.

We hypothesized that expression of R388P lamin A, which alters intranuclear localisation of lamins and disrupts NE integrity, could modify the binding of LA to its physiological partners emerin, a transmembrane protein of the NE, and LAP2 α , located in the nucleoplasm. Immunofluorescence studies showed, as expected, the frequent nucleoplasmic accumulation of R388P ectopic LA. However, both WT and mutated nucleoplasmic LA colocalized with endogenous LAP2 α (Fig. 6A, upper panels). Of note, LAP2 \square was not detected in the small aggregates of mutant lamins A located at the NE in a minor subpopulation of cells (Fig. 6A, lower panel).

In accordance, by proximity ligation assay (PLA), signals corresponding to [LAP2 α - GFP-LA] complexes were detected throughout the nucleoplasm with only 15% to 8% of the signals located at the nuclear periphery in nuclei expressing WT or R388P GFP-LA, respectively (Fig. 6B-C). However, the total amount per nucleus of PLA signals referring to [LAP2 α - GFP-LA] complexes was similar in myoblasts expressing WT or R388P GFP-LA (Fig. 6C).

Emerin was observed at the NE in myoblasts expressing WT or R388P FLAG-LA (Fig. 6D). Quantification of PLA signals related to [LA - emerin] complexes revealed a significant decrease (from 100 to 52%) in their global amount per nucleus in cells expressing R388P FLAG-LA versus cells expressing WT FLAG-LA (Fig. 4E-F), while their subnuclear distribution was unchanged. Interestingly, within cells presenting NE associated aggregates of emerin and LA, PLA signals related to [LA - emerin] complexes were detected at their borders (Fig. 6D, lower panel). Importantly, protein detection by immunoblot showed that the total amount of endogenous LAP2 \square and emerin was not modified upon overexpression of ectopic lamins (Fig. 6G).

Therefore, taken together, our observations indicate that the reduction in the amount of complexes between R388P-LA and emerin or LAP2 \square at the nuclear periphery does not rely on a decreased intrinsic capacity of the mutant LA to bind its partners but on the paucity of the mutant LA at the nuclear periphery of myoblasts.

In order to decipher whether the increased solubility of R388P lamins A impacts the solubility properties of its partners, WT or R388P FLAG-LA were extracted in a hypotonic buffer including Triton X-100 to permeabilize cells containing various concentrations of NaCl (50, 150 and 250 mM). Western blot analysis showed that, as expected, endogenous lamins A/C and WT FLAG-LA were

resistant to extraction whatever the salt concentration (Fig. 6G, upper panel). In contrast, a pool of R388P FLAG-LA was solubilized upon the addition of NaCl (50-250 mM; Fig. 6G, upper panel). In addition, solubilized LAP2 α and emerin were slightly more abundant in the presence of R388P FLAG-LA rather than WT FLAG-LA (Fig. 6G, middle and lower panels).

Altogether, we conclude that the p.R388P *LMNA* mutation, by increasing the nucleoplasmic localisation and solubility of lamin A, decreases the nuclear anchorage of emerin and LAP2 α and induces a depletion of [LA - LAP2 α] and [LA - emerin] complexes at the nuclear periphery of myoblasts.

Alterations in cytoskeleton organization are not major contributors to nuclear dysmorphism in myoblasts expressing the R388P mutant lamins A.

Dysfunctional connections between the cytoskeleton and the nucleus, which involve the LINC complexes, have been reported in the context of *LMNA*-related diseases (Meinke and Schirmer, 2015) and were shown to perturb myoblast migration (Chang et al., 2015). We investigated whether an alteration of cytoskeletal integrity could contribute to the abnormal nuclear phenotype of *LMNA* R388P-mutated myoblasts. Although staining microtubules and centrosomes highlighted nuclear dysmorphism at different phases of the cell cycle (G1, S-G2 and cytokinesis as shown in Fig. 7A-B), the organization of the cytoskeleton was not strikingly abnormal upon R388P-LA expression. The severity of nuclear dysmorphism was increased upon stabilization of microtubules with the drug taxol (Fig. 7C). Inversely, depolymerization of microtubules with nocodazole (3h of treatment at 5 or 10 μ M), did not modify significantly the frequency of dysmorphic nuclei in myoblasts expressing R388P lamins A (Fig. 7D-E). As a control, nocodazole (10 μ M for 3h) reduced by 44% the frequency of dysmorphic nuclei induced upon overexpression of WT lamins A (Fig. 7E). We then depolymerized the actin filament network using cytochalasin D. A high concentration of the drug (2 μ M for 3h) induced the loss of cell adherence and shrinkage of nuclei, rendering measurement of nuclear dysmorphism frequency impossible (Fig. 7F). However, at 1 μ M, cytochalasin D disrupted significantly the actin network, but it did not modify the frequency of nuclear dysmorphies in myoblasts expressing R388P LA (29 vs 30% of dysmorphic nuclei; Fig. 7G). Therefore, releasing of external forces exerted on the NE by microtubules or actin did not rescue nuclear shape of myoblasts expressing R388P-LA.

At last, we detected the muscle specific intermediate filament protein desmin in 40 to 80% of C2C12 myoblasts (data not shown). The frequency of desmin positive cells was similar in cells expressing or not WT or R388P FLAG-LA (Fig. 7H-I), as well as in the subpopulation of myoblasts with dysmorphic nuclei caused by R388P lamins A expression (Fig. 7I).

Altogether, our results indicate that cytoskeleton disorganization is not a major contributor to nuclear dysmorphism in R388P-mutated myoblasts.

The R388P mutant lamins A induce an alteration of histone acetylation.

We evaluated the H3 acetylation expression using specific antibodies directed against H3K9ac or H3K27ac (Fig. 8A). Quantitative analysis revealed an increased intensity of the H3K9ac signal in nuclei of cells expressing R388P vs WT FLAG-LA or vs untransfected cells (Fig. 8B). In addition, 3.5 to 5.5% of cells expressing WT FLAG-LA, but only very rare cells expressing R388P FLAG-LA, were negative for acetylated H3 (K9ac or K27ac) staining (Fig. 8C). This observation highlighted a distinct impact of WT versus R388P-LA overexpression on some epigenetic marks in myoblasts. The increased histone acetylation upon R388P lamins A expression suggests that the mutation could favour chromatin relaxation in myoblasts.

Chromatin remodelling by histone deacetylase or acetyl transferase inhibitors does not reverse the abnormal nuclear shape induced by R388P-LA expression in myoblasts.

Drugs affecting chromatin organization by inhibiting histone deacetylase (HDACs) or the specific histone acetyl transferase HAT named NAT10 have been shown to reverse the nuclear shape alterations induced by progerin expression or lamin A/C depletion in skin fibroblasts (Columbaro et al., 2005; Larrieu et al., 2014). We tested the impact of anacardic acid, an HAT inhibitor, on the nuclear dysmorphism induced by R388P-LA expression in myoblasts. Although anacardic acid induced a global decrease in H3K9 acetylation as expected, it did not rescue nuclear dysmorphism (Fig. 8D-E). In addition, treatment of cells with the HDAC inhibitor Trichostatin A (TSA) (Xu et al., 2007) induced H3 deacetylation as assessed by H3K27ac staining, but increased nuclear dysmorphism in cells expressing R388P FLAG-LA (Fig. 8D-E), or either R388P-L647R FLAG-preLA or R388P FLAG-mLA (data not shown). Therefore, although the R388P mutant LA modifies the H3 acetylation status in myoblasts, modifying the acetylation pattern of cells does not rescue nuclear shape.

DISCUSSION

The R388P *LMNA* mutation is associated with a rare and severe congenital muscular dystrophy

In this study we identified a heterozygous *LMNA* p.R388P *de novo* mutation in a patient with a severe laminopathy clinically expressed as congenital muscular dystrophy with lipodystrophic features. To our knowledge, the association of L-CMD with lipodystrophy was not previously described. Although mutations all along the *LMNA* gene have been associated with congenital muscular dystrophy, the integrity and charge of the 388th amino acid seems particularly important for muscle development and/or function, since another mutation at this residue (R388C) also lead to a severe muscular phenotype of L-CMD (Benedetti et al. 2007). In accordance, the R388C or P alterations in lamin A/C are predicted to be probably or possibly damaging. The specific structural properties of proline (Bajaj et al., 2007; Deber and Therien, 2002) which replaces arginine might induce a modification in the folding/structure of lamin A/C. Instead, the pathogenicity of the *LMNA* R388H variation, which does not modify the charge of the protein residue and is predicted to be benign (as assessed by Polyphen-2), is unlikely (Parks et al., 2008). Arginine 388 belongs to a group of a.a (E358, M371, R386, R388) located at the end of coil 2B and at the C-ter of the rod domain that are highly conserved between species from human to *Xenopus*. Based on crystal structures of lamin A coil 2B dimer, they were proposed to play a key role in the longitudinal head to tail association of lamins (see Fig. S1; Strelkov, 2004). Accordingly, R388P (this study) as well as R386K, E358K and M371K mutations (Östlund et al., 2001) impede proper formation of a lamina lattice at the NE of myoblasts. However, only the *LMNA* p.R388P mutation causes L-CMD, whereas the three other *LMNA* mutations are responsible for the less severe phenotype of Emery-Dreifuss muscular dystrophy. Thus, we speculated that in addition to altering the lamin assembly properties, the R388P mutation might impair other important functions of lamin A. In that setting, the observed reduction in the amount of lamin A-emerin complexes at the NE and in the nuclear matrix anchorage of lamin A-LAP2 α complexes might trigger an inappropriate modulation of specific cellular pathways known to be regulated by emerin and LAP2 α in muscle (Dubinska-Magiera et al., 2013; Maraldi et al., 2011). In addition, the increased global acetylation of histone H3 might reflect additional effects of the R388P lamin A mutant on chromatin organisation and gene expression.

***LMNA* p.R388P-mutated fibroblasts show premature senescence but not the altered nuclear shape observed in myoblasts: cell-specific effects of the mutation.**

The phenotypic features we observed here in skin fibroblasts of the L-CMD patient bearing the *LMNA* p.R388P mutation have also been reported in other laminopathies, including lipodystrophies, muscular dystrophies and premature ageing syndromes (Vigouroux et al., 2001; Novelli et al., 2002; Muchir et al., 2004; Caron et al., 2007; Taimen et al., 2009; Verstraeten et al., 2009; Gordon et al., 2012). These features include the disorganization of the nuclear lamina with a honeycomb aspect, the local nuclear depletion of lamin B1 and/or the premature entry into senescence of the cells. However, the increased frequency of altered nuclear shape, which is frequent in cultured laminopathic cells (Vigouroux et al., 2001; Novelli et al., 2002; De Sandre-Giovannoli et al., 2003; Eriksson et al., 2003; Csoka et al., 2004; Goldman et al., 2004; Muchir et al., 2004), was not observed in this study.

Nevertheless, a severe nuclear dysmorphism was observed upon ectopic expression of the R388P lamins A in myoblasts, suggesting cell-specific effects of the mutation. Since we had not the possibility to measure the ratio of the endogenous WT vs mutant (R388P) A-type lamins within the patient fibroblasts, one can speculate that in this particular cell type, the expression level of p.R388P lamin A and/or specific partners might protect against nuclear dysmorphism.

Nuclear dysmorphies induced by the *LMNA* R388P mutation in muscle cells rely on specific mechanisms.

Since the discovery of *LMNA* mutations as responsible for several diseases, extensive work has been produced to characterize the associated cellular phenotypes. However, only few studies have been performed in the context of L-CMD (Bertrand et al., 2012; Mitsuhashi et al., 2010; Scharner et al., 2011). To our knowledge, our study is the first to precisely characterize the phenotypes of myoblasts expressing a mutant lamin A responsible for L-CMD. A major abnormality observed here is the dysmorphism of nuclei, a phenotype previously associated with other laminopathies including Hutchinson-Gilford progeria. However, our study reveals several specificities of the R388P L-CMD-related LA; i) R388P-LA accumulates in the nucleoplasm and is more soluble than WT-LA (this study) whereas progerin which is constitutively farnesylated forms a stiff lamina at the NE (Dahl et al., 2006; Delbarre et al., 2006), ii) nuclear dysmorphism relies on defective prelamins A processing in the progeria context but not in the L-CMD context, iii) preventing lamin A farnesylation rescues nuclear shape in cells expressing progerin (see for ex Capell et al. 2005, Toth et al. 2005; Yang et al. 2005) but not R388P L-CMD-associated lamin A, iv) releasing the forces exerted on the NE from outside with the cytoskeleton rescues nuclear shape of fibroblasts from patients with progeria and from *LMNA*^{-/-} fibroblasts (Larrieu et al., 2014) but not of myoblasts expressing the R388P L-CMD related LA, v) chromatin remodelling with drugs such as the HDAC inhibitor TSA could reverse the nuclear dysmorphism in the progeria context (Columbaro et al., 2005) whereas inhibitors of either HAT or HDAC did not reverse nuclear dysmorphism induced by the R388P L-CMD related LA.

As lamin A and lamin B regulate viscosity and elasticity properties of the nucleus, respectively (Swift et al., 2013) the high degree of nuclear deformation induced by R388P lamins A together with alterations of NE integrity including abnormalities of lamin B1 staining support a loss of proper function of both A and B-type lamins in the L-CMD context.

In conclusion, altogether our data highlight the multiple dominant negative impacts of the L-CMD related mutant LA (p.R388P) on the organisation/function of the nuclear compartment in myoblasts. Attempts to decrease the expression level of that mutant lamin A should be considered when elaborating therapeutic protocols.

MATERIAL & METHODS

Identification of the novel *LMNA* p.R388P heterozygous mutation

The proband was referred at age 11 at La Pitié-Salpêtrière Molecular Biology Department (Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, France) for *LMNA* sequencing. Clinical, biological, molecular studies of the patient and her relatives were performed after full informed consent according to legal procedures. Genomic DNA was extracted from peripheral-blood leukocytes. The entire coding region and splice junctions of *LMNA* were amplified by PCR with specific primers in the proband and her relatives and submitted to direct sequencing as described (Bonne et al., 1999).

Primary cultures of skin fibroblasts

Subcutaneous fibroblasts were cultured after skin biopsy from the patient (aged 16) and from two healthy individuals (her 43-yr-old mother and an unrelated 18-yr-old man) and were cultured in DMEM medium containing 10% foetal calf serum between passages 6 and 14, as indicated. They showed no evidence of contamination. All subjects gave their informed consent according to our local ethics committee.

Senescence beta-Gal assay

Fibroblasts adherent to coverslips were fixed for 12 min at 22°C with 3% formaldehyde and incubated overnight at 37°C in [1 mg/ml X-gal, 40 mM citric acid, 126 mM sodium phosphate pH 6, 5 mM potassium ferricyanide, 5 mM potassium ferrocyanide, 150 mM NaCl, 2 mM MgCl₂]. Estimation of the SA- β -galactosidase activity was done by quantifying the percentage of positive blue cells by direct observation of the samples at the microscope (n = 900-1100 cells in each case).

C2C12 cell culture and transfection

C2C12 cells were obtained from American Type Culture Collection, grown in DMEM medium containing high glucose and GlutaMAXTM (Gibco) and 10% foetal bovine serum and tested for mycoplasma contamination. For cell transfection, XtremeGENE 9 (Roche) or lipofectamineTM 2000 (Life technologies) were used according to the manufacturer's instructions. Cells were analysed 24h after transfection.

Plasmids

Constructs encoding FLAG fusions of WT or L647R prelamin A (a.a 1–664), mature lamin A (a.a 1–646) and of progerin (deletion a.a 607-656) were generated by PCR amplification of the relevant regions of cDNA using as templates pSVK3-prelamin A and pSVK3-mature-lamin A (Duband-Goulet et al., 2011) or pEGF-progerin (Delbarre et al. 2006), followed by ligation of the amplified DNA into the BamH1 and EcoR1 sites of pCMV-Tag 2A (Stratagene). Construct encoding GFP fusion of WT prelamin A was previously described (Favreau et al., 2004). The vectors encoding lamin A with the R388P mutation (pEGFP-R388P-preLA, pCMV-R388P-FLAG-preLA, pCMV-R388P-L647R-FLAG-preLA, pCMV-R388P-FLAG-mLA) were constructed by site-directed mutagenesis using the QuickChange Lightning site directed mutagenesis (Agilent Technologies) with the following primers : forward 5' gag gag agg cta cca ctg tcc ccc agc 3' and reverse 5' gct ggg gga cag tgg tag cct ctc ctc 3'.

Drug treatments of cells

Six hours after transfection, cells were incubated in the presence of mevinolin (Sigma-Aldrich) at 10 μ M or in 1% DMSO for 18h.

Twenty four hours after transfection, cells were incubated with cytoskeleton destabilizing drugs, i.e nocodazole (Sigma-Aldrich) at 5 or 10 μ M for 3h or with cytochalasin D (Sigma-Aldrich) at 1 μ M or 2 μ M for 3h. Since cells were fixed directly (no pre-extraction step), “solubilized” tubulin and actin molecules were detected throughout the cytoplasm of cells by immunofluorescence. Alternatively, microtubules were stabilized by treating cells with Taxol (Sigma-Aldrich) at 1 μ M for 2h. Thirty hours or eight hours after transfection, cells were incubated in the presence of either trichostatin A (TSA, Sigma-Aldrich) at 100 nM or anacardic acid at 100 μ M for a period of 16h.

Antibodies and immunological methods.

C2C12 cells were either grown on glass coverslips or in plastic dishes for immunofluorescence (IF) and immunoblotting (IBlot) analysis, respectively. For IF, cells were fixed with PFA, then

processed as previously indicated (Favreau et al., 2004). Immunofluorescences were observed at the confocal microscope Zeiss LSM 700 at the imagery platform of BFA institute. Primary antibodies used were rabbit anti-lamin A/C (as described in Vigouroux et al., 2001; Favreau et al., 2004), mouse anti-lamin A/C (Novocastra; dilution 1:200 for IF), goat anti-prelamin A (Santa Cruz Biotechnology; dilution 1:500 for Iblot), rabbit anti-LAP2 α (Immuquest, UK; dilution 1:250 for IF and 1:2000 for Iblot), mouse anti-emerin (NCL, Novocastra; dilution 1:30 for IF and 1:500 for Iblot), rabbit anti-FLAG (Sigma-Aldrich; dilution 1:300 for IF), mouse anti-FLAG (Sigma-Aldrich; dilution 1:400 for IF and 1:600 for Iblot), mouse anti-GFP (Roche; dilution 1:200 for IF and 1:5000 for Iblot), rabbit anti-GAPDH (Sigma-Aldrich; dilution 1:5000 for Iblot), mouse anti-actin (Millipore; dilution 1:5000 for Iblot), mouse anti-desmin (RD301, Santacruz; dilution 1:50 for IF), mouse anti- α -tubulin (DM1A, Sigma; dilution 1:500 for IF), mouse anti- γ -tubulin (GTU-88, Sigma-Aldrich; dilution 1:300 for IF), rabbit anti H3K9ac (06-942, Upstate; dilution 1:60 for IF and 1:400 for Iblot) and rabbit anti-H3K27ac (ab4729, Abcam; dilution 1:300 for IF and 1:1000 for Iblot).

Nuclear dysmorphism evaluation. Nuclear dysmorphism was estimated from FLAG immunostaining pictures, either directly by visual observation or indirectly when specified using Image J software to calculate the nuclear circularity ($4\pi \times \text{area} / \text{perimeter}^2$; a form factor of 1 representing a perfect circle).

In situ detection of protein-protein interactions by Proximity Ligation Assay (PLA)

In situ protein-protein interactions were detected by Proximity Ligation Assay (Barateau and Buendia, 2016) in fixed C2C12 cells expressing WT or R388P FLAG-LA. To limit unspecific PLA signals, we chose to detect [LA – emerin] interactions using a mix of [rabbit anti-FLAG and mouse anti-emerin] antibodies for cells expressing FLAG-LA and to detect [LA-LAP2 \square] interactions using a mix of [mouse anti-GFP and rabbit anti-FLAG] antibodies for cells expressing GFP-LA. Next, Duolink PLA probe anti-rabbit plus, Duolink PLA probe anti-mouse minus and Duolink detection reagents orange (detected with a Cy3 filter) were used according to manufacturer's instructions (Olink, Bioscience). Detection of FLAG transfected cells also required the addition of Cy2-conjugated secondary goat antibodies against rabbit. Confocal microscopy image acquisition was performed using a LSM 700 Laser scanning microscope (Zeiss) at the imagery platform of BFA institute. Quantitative analysis of PLA signals used a custom image recognition Image J plugin that relied on a two-step algorithm as described previously (Vadrot et al., 2015). Data were compiled as the intensity of PLA signals in function of their distance to the closest point of the nuclear periphery. Considering the distance between the periphery and the nucleus barycentre as the maximal distance (100%), the peripheral signals refer to those detected within an intranuclear peripheral region limited to 10% of the maximal distance.

Protein extract preparation and protein analysis by Western blot.

Whole cell extracts were prepared by directly resuspending cells in Laemmli sample buffer. In some experiments, cell fractionation was performed following a procedure adapted from Fey and colleagues (1984) and briefly described previously (Favreau et al. 2004). Alternatively, cells were processed for extraction following the procedure described by Mitnacht and Weinberg (1991). Briefly, adherent cells were incubated for 10 min at 4°C with an hypotonic buffer (10 mM Hepes pH 7.9, 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.5 mM DTT, 0.4% Triton) that contained either 0, 50, 150 or 250 mM NaCl. In all cases, solubilized proteins (Supernatant) were precipitated by Trichloroacetic acid (TCA) before resuspension in Laemmli sample buffer while unextracted proteins (Pellet) were resuspended directly in Laemmli sample buffer. Protein extracts were analysed by immunoblot as previously described (Vadrot et al. 2015). Gel quantification was performed by using ImageJ software.

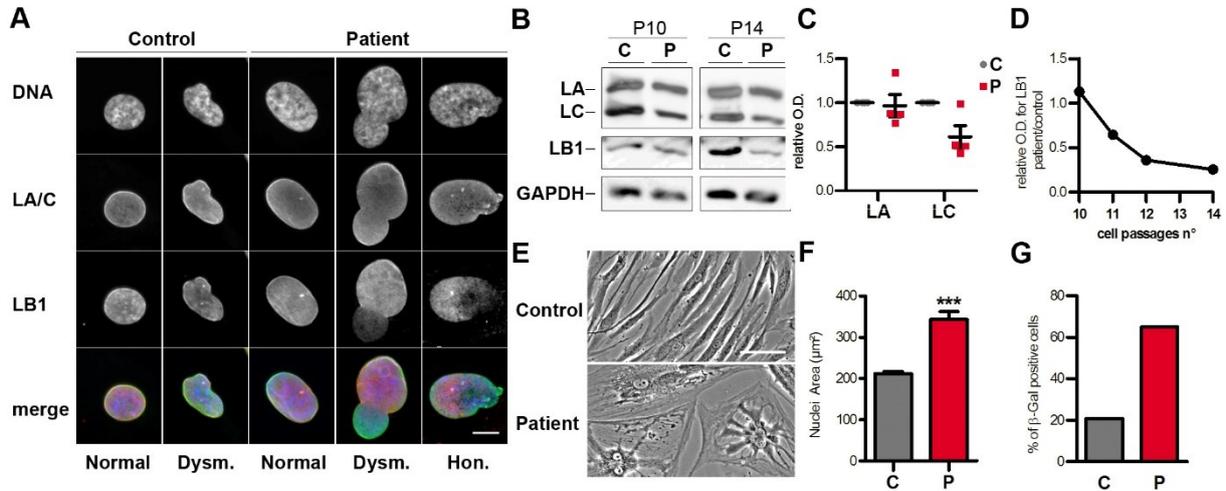
Statistical analysis

Quantitative results are expressed as means \pm s.e.m., or medians with third and first quartiles.

Comparisons between samples were performed with the Mann-Whitney test, the Kruskal-Wallis (also called one-way ANOVA on ranks) test with or without the pairwise comparisons of groups or the two-way ANOVA test coupled with the Bonferroni posttests, as indicated.

FIGURES

Barateau et al. Figure 1

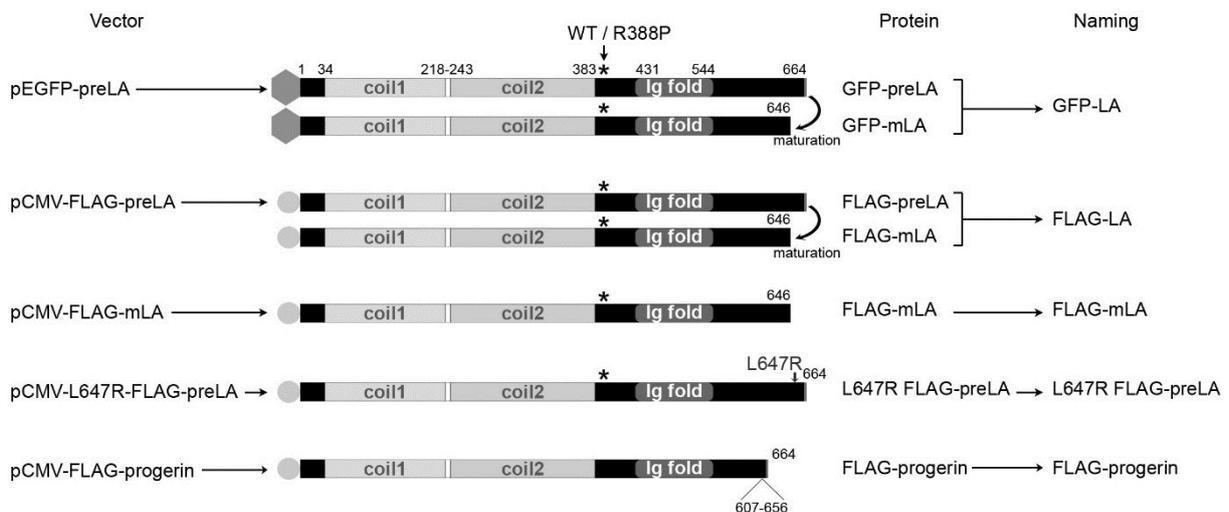


Legend of Figure 1.

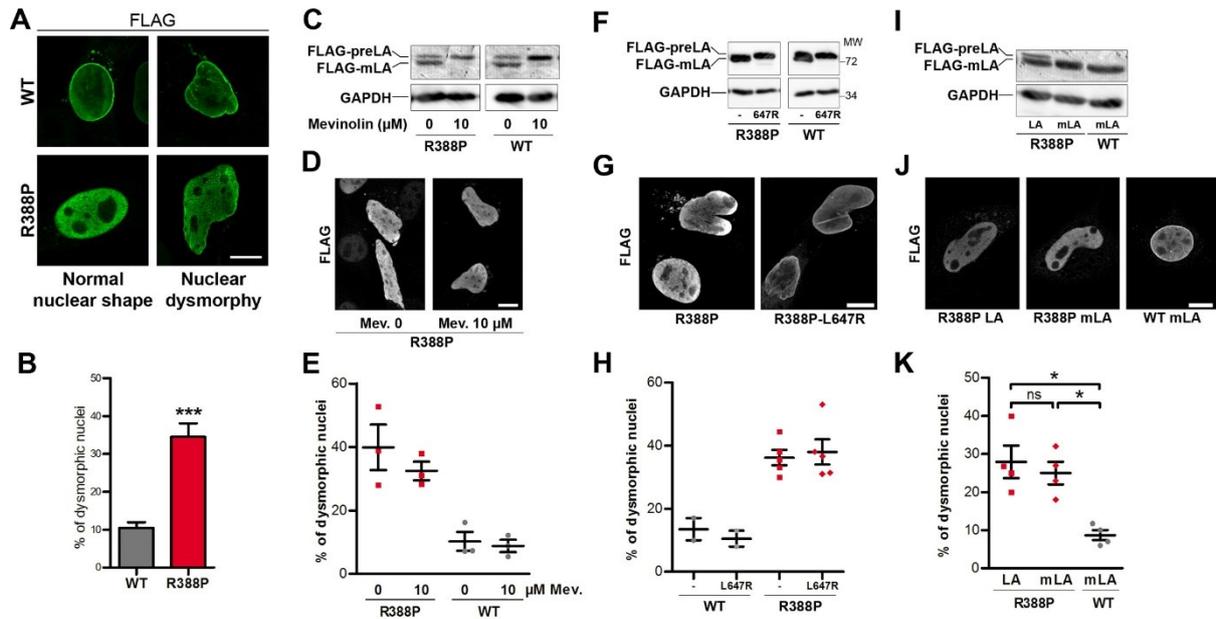
Abnormal cellular phenotypes of fibroblasts from the patient with *LMNA* R388P-associated L-CMD.

A) Human skin fibroblasts from control (passage 13) and patient (passage 11) were fixed, labelled with anti-LA/C or anti-LB1 antibodies, and observed by immunofluorescence microscopy. DNA was stained with Hoechst. Are shown phenotypes representative for normal nuclear morphology (Normal), nuclear dysmorphism (Dysm.) and lamina with a honeycomb pattern (Hon.). $n > 300$ nuclei / condition. Scale bar, 10 μm . **B)** Whole cell extracts of fibroblasts from control and patient at passages 10 and 14 (P10, P14) were analysed by western blot using antibodies directed against either LA/C, LB1 or GAPDH. **C)** ECL signals obtained as in B) were scanned and quantified for LA and LC ($n = 4$) (mean \pm s.e.m.). **D)** Ratio of ECL signals obtained by western blot for LB1 in whole extracts of patient vs control cells, at passages 10, 11, 12 and 14, as indicated. **E)** Phase contrast images of control (passage 11) and patient (passage 9) cells. Scale bar, 100 μm **F)** Measurement of nuclear area for control and patient fibroblasts at passages 13 and 11, respectively (mean \pm s.e.m.). $n > 100$ nuclei / condition. **G)** Senescence assessment using the β -Galactosidase assay for control and patient fibroblasts at passages 9 and 6, respectively.

Barateau et al. Figure 2



Barateau et al. Figure 4



Legend of Figure 4.

Different maturation intermediates of R388P prelamin A trigger nuclear dysmorphism.

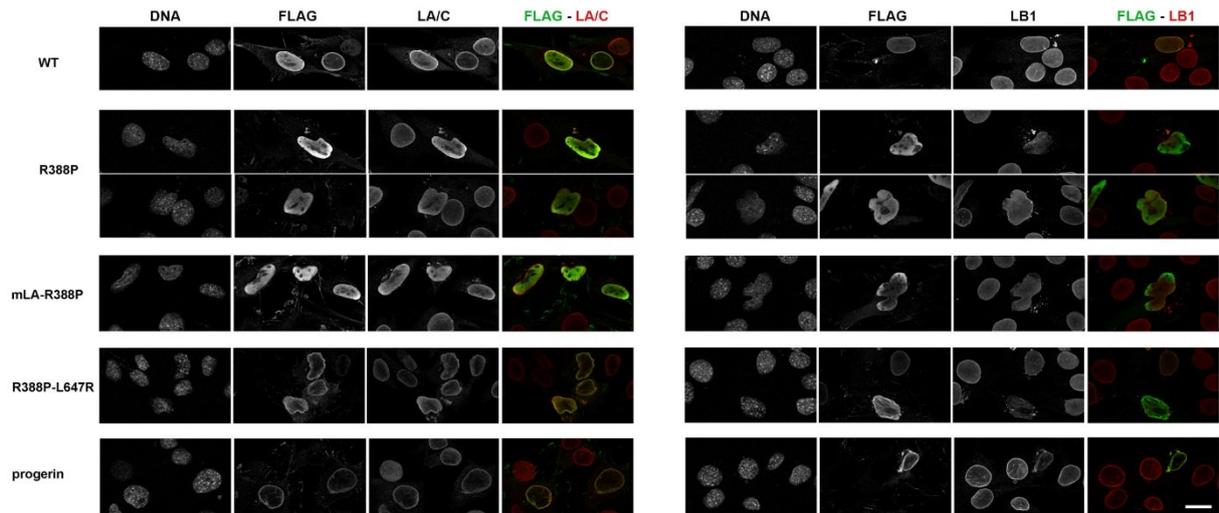
A) C2C12 cells overexpressing WT (WT) or mutant (R388P) FLAG-LA were fixed, labelled with anti-FLAG antibodies, and immunofluorescence observed at the confocal microscope. Representative nuclei with a normal shape (ovoid) or with dysmorphism are shown. Scale bar, 10 μ m. **B)** Percentage of dysmorphic nuclei among cells expressing either WT FLAG-LA or R388P FLAG-LA, as evaluated by visual observation (mean \pm s.e.m.), (n = 8 independent experiments with >100 nuclei / experiment, ***p<0.001, Mann Whitney test).

C) Whole cell extracts of C2C12 cells overexpressing WT or R388P FLAG-LA and treated with DMSO (0) or Mevinolin (Mev) at 10 μ M (10) for 18h, were analysed by western blot using anti-FLAG antibodies. GAPDH was used as a loading control. **D)** C2C12 cells as described in **C)** were fixed, labelled with anti-FLAG antibodies, and immunofluorescence observed at the confocal microscope. **E)** Percentage of dysmorphic nuclei of cell populations assessed by visual observation as in **D)** (mean \pm s.e.m.) (n = 3 independent experiments and >100 nuclei / experiment, Kruskal-Wallis test with pairwise comparisons of groups).

F) Whole cell extracts of C2C12 cells overexpressing FLAG-tagged R388P LA, R388P-L647R preLA, WT LA or L647R preLA were analysed by western blot using anti-FLAG and anti-GAPDH antibodies. **G)** C2C12 cells as described in **F)** were fixed, labelled with anti-FLAG antibodies, and immunofluorescence observed at the confocal microscope. **H)** Percentage of dysmorphic nuclei for cell populations observed in **G)** (mean \pm s.e.m.) for R388P and R388P-L647R (n = 5 independent experiments and >100 nuclei / experiment, p=0.9, Mann Whitney test) and for WT and WT-L647R (n = 2 independent experiments and >100 nuclei / experiment).

I) Whole cell extracts of C2C12 cells overexpressing R388P FLAG-LA, R388P FLAG-mLA or WT FLAG-mLA were analysed by western blot using anti-FLAG and anti-GAPDH antibodies. **J)** C2C12 cells as described in **I)** were fixed, labelled with anti-FLAG antibodies, and immunofluorescence observed at the confocal microscope. **K)** Percentage of dysmorphic nuclei for cell populations observed as in **J)** (mean \pm s.e.m.) (n = 4 independent experiments and >100 nuclei / experiment, * p<0.05, Kruskal-Wallis test with pairwise comparisons of groups). Scale bars in **A**, **D**, **G** and **J**, 10 μ m.

Barateau et al. Figure 5

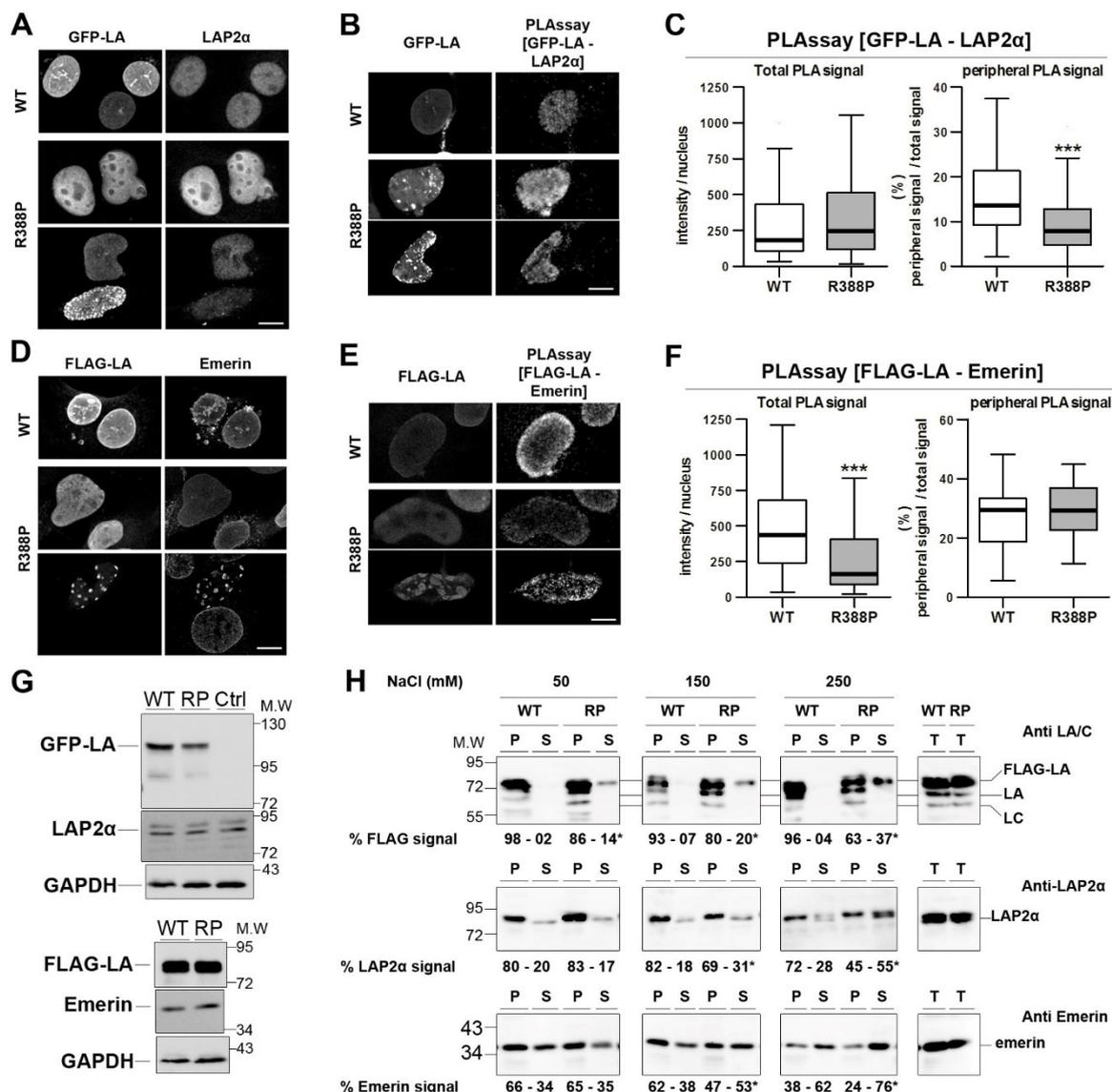


Legend of Figure 5.

R388P lamins A impacts NE association of endogenous A and B-type lamins.

C2C12 cells overexpressing FLAG-tagged WT-LA, R388P-LA, mLA-R388P, R388P-L647R LA, or progerin were fixed, labelled with a mix of anti FLAG and either anti-LA/C or anti-LB1 antibodies, as indicated, before observation at the confocal microscope. DNA was stained with Hoechst. Merges show co-staining for FLAG (green) and lamins (red). Scale bar, 20 μ m.

Barateau et al. Figure 6



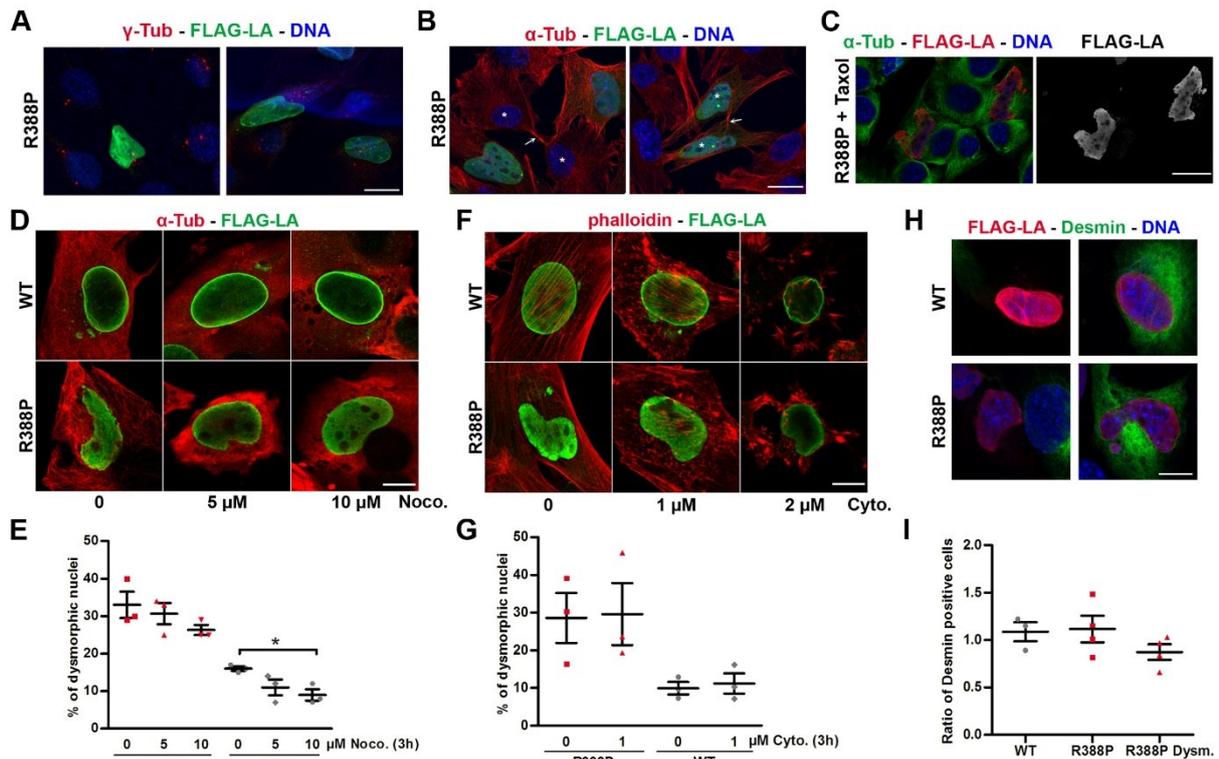
Legend of Figure 6.

Changes in the lamin A in situ proximity and global solubility of LAP2α and emerin in response to R388P-LA expression.

A-B) C2C12 cells overexpressing WT (upper panel) or R388P (lower panels) GFP-LA were fixed, labelled with anti-GFP and anti-LAP2α antibodies, and processed either for immunofluorescence (**A**) or proximity ligation assay (PLAssay) (**B**), before observation at the confocal microscope. Scale bar, 10 μm. **C)** Quantification of PLA signals per nucleus among GFP/PLA positive cells as shown in **B**). The graphs show the median intensity of the total PLA signals detected per nucleus (left panel) and the median frequency of the PLA signals detected at the intranuclear periphery (right panel). Boxes show first and third quartiles, bars are put according to Tukey method for n = 67 (WT) and 74 (R388P) nuclei, *** p<0.001 (Mann Whitney test). **D-E)** C2C12 cells overexpressing WT or R388P FLAG-LA were fixed, labelled with anti-FLAG and anti-emerin antibodies, and processed either for immunofluorescence (**D**) or PLA (**E**) before observation at the confocal microscope. Scale bar, 10 μm. **F)** Quantification of PLA signals per nucleus among FLAG/PLA positive cells as shown in **E**). The graphs show the median intensity of the total PLA signals detected per nucleus (left panel) and the median frequency of the PLA signals detected at the intranuclear periphery (right panel). Boxes show first and third quartiles, bars are put according to Tukey method for n = 59 (WT) and 31 (R388P) nuclei, *** p<0.001 (Mann Whitney test). **G)** Whole

cell extracts of C2C12 cells either control (Ctrl) or overexpressing wild-type (WT) or R388P (RP) LA, tagged with GFP (upper panel) or FLAG (lower panel) were analysed by western blot using anti-GFP, anti-FLAG, anti-LAP2 α , anti-emerin and anti-GAPDH antibodies, as indicated. **H)** C2C12 cells overexpressing WT or R388P (RP) FLAG-LA were extracted with a hypotonic buffer including 0.4% Triton and either 50, 150 or 250 mM NaCl. Proteins from insoluble (P) and soluble fractions (S) as well as whole cell extracts (T) were analysed in parallel by western blot, using antibodies directed against LA/C, LAP2 α or emerin. Each lane (P, S) corresponds to a material extracted from a similar number of cells. The ratio of ECL signals for FLAG-LA, LAP2 α and emerin detected in the pellet (P) versus the supernatant (S) are indicated in percentages.

Barateau et al. Figure 7



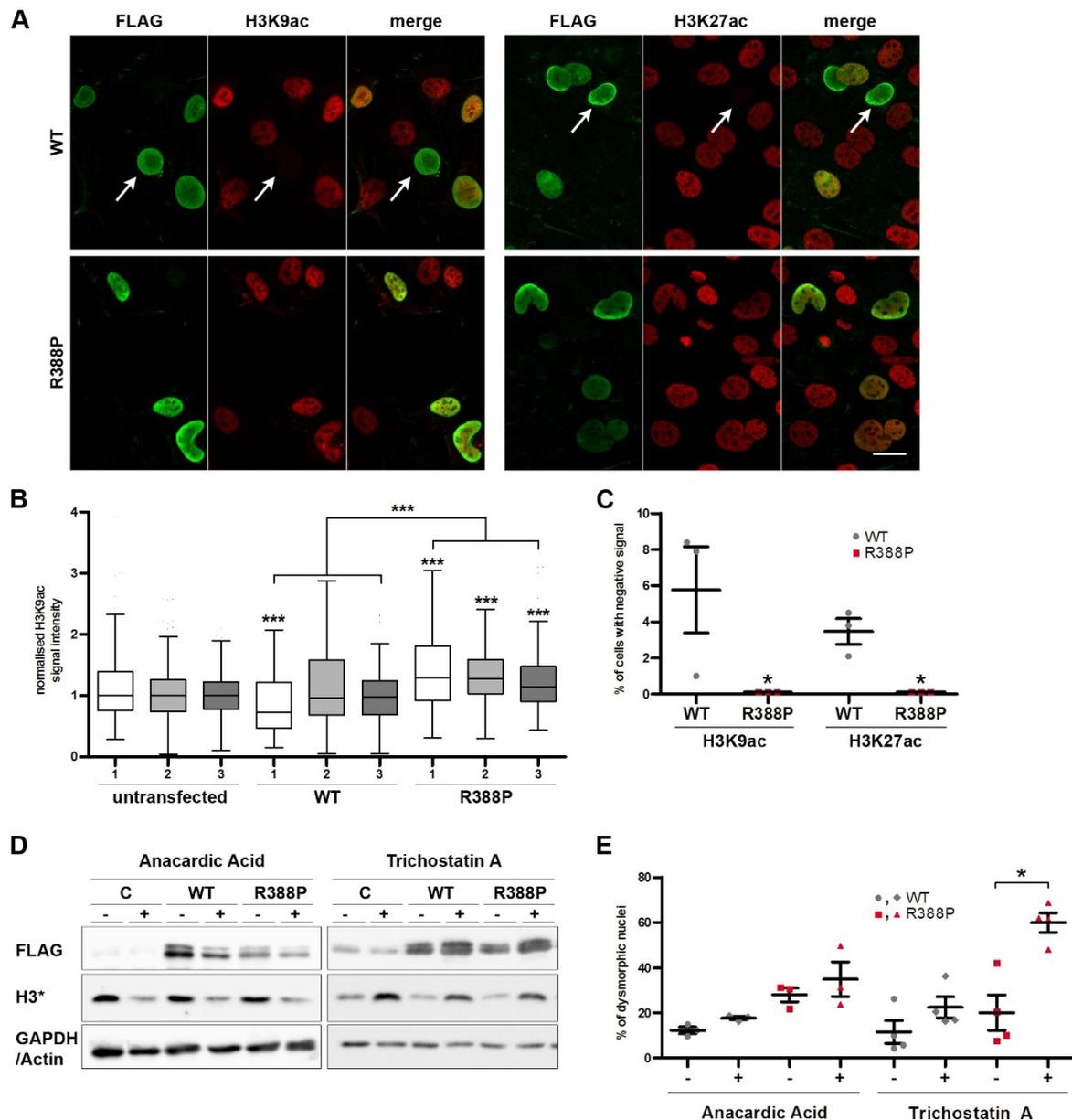
Legend of Figure 7.

Alterations in cytoskeleton organization are not major contributors to nuclear dysmorphism in myoblasts expressing R388P LA.

A-C) C2C12 cells overexpressing R388P FLAG-LA were fixed, labelled with rabbit anti-FLAG antibodies (green in **A-B**, red in **C**) together with either mouse anti- γ -tubulin antibodies to detect the centrosomes (red in **A**) or mouse anti- α -tubulin antibodies to detect the microtubule network (red in **B**, green in **C**) before observation at the confocal microscope. DNA was stained with Hoechst (blue). Scale bars, 20 μ m. In **A)** are shown cells that contain either two or four centrosomes (left and right panel, respectively). In **B)** are shown nuclei (stars) in daughter cells at cytokinesis, as revealed by the microtubules enriched midbody (arrows), upon expression (right panel) or absence (left panel) of R388P-LA. In **C)** are shown examples of dysmorphic nuclei upon treatment of cells with taxol (1 μ M for 2h). **D)** C2C12 cells overexpressing WT or R388P FLAG-LA were treated with 0.05% DMSO (0) or with 5 to 10 μ M Nocodazole (Noco.) for 3h at 37°C. After fixation, labelling with rabbit anti-FLAG (green) and mouse anti- α -tubulin antibodies (red), immunofluorescence were observed at the confocal microscope. Scale bar, 10 μ m. **E)** The graph illustrates the percentage (mean \pm SEM) of dysmorphic nuclei among cells treated as shown in **D)**, * $p < 0.05$ for $n = 3$ independent experiments and > 100 nuclei / experiment (WT and R388P data were analysed separately by Kruskal-Wallis tests with pairwise comparisons of groups). **F)** C2C12 cells overexpressing WT or R388P FLAG-LA were treated with 0.2% DMSO (0) or with the actin depolymerizing agent Cytochalasin D at 1 or 2 μ M (Cyto.) for 3h at 37°C. After fixation, labelling with rabbit anti-FLAG antibodies and with phalloidin, immunofluorescence were observed at the confocal microscope. Scale bar, 10 μ m. **G)** Percentage

(mean \pm s.e.m.) of dysmorphic nuclei among cells treated as in F), $p > 0.05$ for $n = 3$ independent experiments and >100 nuclei / experiment (WT and R388P data were analysed separately by Kruskal-Wallis tests with the pairwise comparisons of groups). **H)** C2C12 cells overexpressing WT or R388P FLAG-LA were fixed, labelled with rabbit anti-FLAG (red) and mouse anti-desmin (green) antibodies and observed at the confocal microscope. DNA was stained with Hoechst (blue). Representative cells illustrating nuclear shape in the absence or presence of endogenous desmin expression (left and right panels, respectively). Scale bar, 10 μ m. **I)** The graph illustrates the mean ratio (\pm s.e.m.) of desmin positive vs negative cells for transfected cells versus untransfected control cells. Are considered the whole population of cells expressing WT or mutant (R388P) FLAG-LA and the subpopulation of cells expressing R388P FLAG-LA with dysmorphic nuclei (R388P Dym.), $p > 0.05$ for $n = 4$ independent experiments and >100 nuclei / experiment (Kruskal-Wallis tests with pairwise comparisons of groups).

Barateau et al. Figure 8



Legend of Figure 8.

Changes in H3 acetylation do not rescue nuclear shapes in myoblasts expressing R388P LA.

A) C2C12 cells overexpressing WT or R388P FLAG-LA were fixed, labelled with mouse anti-FLAG (green) and rabbit anti-H3K9ac or anti H3K27ac (red in left and right panels, respectively)

antibodies before observation at the confocal microscope. Arrows in A) indicate the absence of H3K9/K27ac signal in cells overexpressing WT lamins A. Scale bar, 20 μ m.

B) The graph illustrates the H3K9ac median immunofluorescence signal intensity observed per nucleus of cells processed as in A) that express either WT or R388P-LA. Signals are normalized to the signal measured in untransfected cells for 3 independent experiments (1, 2, 3). Boxes show first and third quartiles, bars are put according to Tukey method for $n > 125$ nuclei per condition, *** $p < 0.001$ (Mann Whitney test). **C)** Percentage (mean \pm s.e.m.) of cells processed as in A) that express WT or R388P-LA and are negatively stained for H3K9ac or H3K27ac. (* $p < 0.05$ for $n = 3$ and > 100 nuclei / condition, Mann Whitney test). **D)** C2C12 cells, control (C) or expressing WT or R388P FLAG-LA were incubated in the absence (-) or presence (+) of anacardic acid (100 μ M) or trichostatin A (100 nM), as indicated. Whole cell extracts were analysed by western blot using anti-FLAG, anti-H3K9ac (left panel) and anti-H3K27ac (right panel) antibodies. GAPDH and Actin detection were used as loading controls in the left and right panels, respectively.

E) C2C12 cells expressing WT or R388P FLAG-LA were treated with drugs as in D) and processed by immunofluorescence as in A). The graph illustrates the percentage of dysmorphic nuclei for cell populations (mean \pm s.e.m), * $p < 0.05$ for $n = 3$ independent experiments and > 100 nuclei / experiment (Kruskal-Wallis test with pairwise comparisons of groups).

FUNDING

This work was supported by the Association Française contre les Myopathies (B.B.; P.V.), CNRS, Inserm, University Paris Diderot Paris 7 and University Paris 6 Pierre and Marie Curie.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to Dr Valentina Sirri, Dr Pascal Roussel and Dr Veronique Pizon for advices and tools used for disrupting cytoskeleton elements in cells, to Dr Kim Maincent who referred to us the patient and to Dr Pascale Richard who contributed to the identification of the *LMNA* p.R388P mutation. We thank the patient and controls who participated in this study.

CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

None declared.

REFERENCES

- Bajaj, K., Madhusudhan, M.S., Adkar, B.V., Chakrabarti, P., Ramakrishnan, C., Sali, A. and Varadarajan, R. (2007) Stereochemical criteria for prediction of the effects of proline mutations on protein stability. *PLoS Comput. Biol.* **3**, e241.
- Barateau, A. and Buendia, B. (2016) In situ detection of interactions between nuclear envelope proteins and partners. *Methods Mol. Biol.* **1411**, 147-158.
- Benedetti, S., Menditto, I., Degano, M., Rodolico, C., Merlini, L., D'Amico, A., Palmucci, L., Berardinelli, A., Pegoraro, E., Trevisan, C.P. *et al.* (2007) Phenotypic clustering of lamin A/C

mutations in neuromuscular patients. *Neurology* **69**, 1285-1292.

- Bertrand, A.T., Renou, L., Papadopoulos, A., Beuvin, M., Lacene, E., Massart, C., Ottolenghi, C., Decostre, V., Maron, S., Schlossarek, S. et al.** (2012) DelK32-lamin A/C has abnormal location and induces incomplete tissue maturation and severe metabolic defects leading to premature death. *Hum. Mol. Genet.* **21**, 1037-1048.
- Bonne, G., Di Barletta, M.R., Varnous, S., Becane, 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.
- 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.
- Caron, M., Auclair, M., Donadille, B., Bereziat, V., Guerci, B., Laville, M., Narbonne, H., Bodemer, C., Lascols, O., Capeau, J. et al.** (2007) Human lipodystrophies linked to mutations in A-type lamins and to HIV protease inhibitor therapy are both associated with prelamin A accumulation, oxidative stress and premature cellular senescence. *Cell Death Differ.* **14**, 1759-1767.
- Chang, W., Worman, H.J. and Gundersen, G.G.** (2015) Accessorizing and anchoring the LINC complex for multifunctionality. *J. Cell Biol.* **208**, 11-22.
- Columbaro, M., Capanni, C., Mattioli, E., Novelli, G., Parnaik, V.K., Squarzoni, S., Maraldi, N.M. and Lattanzi, G.** (2005) Rescue of heterochromatin organization in Hutchinson-Gilford progeria by drug treatment. *Cell Mol. Life Sci.* **62**, 2669-2678.
- Csoka, A.B., Cao, H., Sammak, P.J., Constantinescu, D., Schatten, G.P. and Hegele, R.A.** (2004) Novel lamin A/C gene (LMNA) mutations in atypical progeroid syndromes. *J. Med. Genet.* **41**, 304-308.
- 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.
- Deber, C.M. and Therien, A.G.** (2002) Putting the beta-breaks on membrane protein misfolding. *Nat. Struct. Biol.* **9**, 318-319.
- 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.
- Delbarre, E., Tramier, M., Coppey-Moisand, 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.
- Dittmer, T.A. and Misteli, T.** (2011) The lamin protein family. *Genome Biol.* **12**, 222.
- 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.
- Duband-Goulet, I., Woerner, S., Gasparini, S., Attanda, W., Konde, E., Tellier-Lebegue, C., Craescu, C.T., Gombault, A., Roussel, P., Vadrot, N. et al.** (2011) Subcellular localization of SREBP1 depends on its interaction with the C-terminal region of wild-type and disease related A-type lamins. *Exp. Cell Res.* **317**, 2800-2813.
- Dubinska-Magiera, M., Zaremba-Czogalla, M. and Rzepecki, R.** (2013) Muscle development, regeneration and laminopathies: how lamins or lamina-associated proteins can contribute to muscle

- development, regeneration and disease. *Cell. Mol. Life Sci.* **70**, 2713-2741.
- 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.
- 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.
- Favreau, C., Higuete, D., Courvalin, J.C. and Buendia, B.** (2004) Expression of a mutant lamin A that causes Emery-Dreifuss muscular dystrophy inhibits in vitro differentiation of C2C12 myoblasts. *Mol. Cell Biol.* **24**, 1481-1492.
- Fey, E.G., Wan, K.M. and Penman, S.** (1984) Epithelial cytoskeletal framework and nuclear matrix-intermediate filament scaffold: three-dimensional organization and protein composition. *J. Cell Biol.* **98**, 1973-1984.
- Freund, A., Laberge, R.M., Demaria, M. and Campisi, J.** (2012) Lamin B1 loss is a senescence-associated biomarker. *Mol. Biol. Cell* **23**, 2066-2075.
- Gesson, K., Vidak, S. and Foisner, R.** (2014) Lamina-associated polypeptide (LAP)2alpha and nucleoplasmic lamins in adult stem cell regulation and disease. *Semin. Cell Dev. Biol.* **29**, 116-124.
- 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.
- Gordon, L.B., Cao, K. and Collins, F.S.** (2012) Progeria : translational insights from cell biology. *J. Cell Biol.* **199**, 9-13.
- 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.
- Lattanzi, G.** (2014) Diverse lamin-dependent mechanisms interact to control chromatin dynamics. Focus on laminopathies. *Nucleus* **5**, 427-440.
- Maraldi, N.M., Capanni, C., Cenni, V., Fini, M. and Lattanzi, G.** (2011) Laminopathies and lamin-associated signaling pathways. *J. Cell. Biochem.* **112**, 979-992.
- Meinke, P. and Schirmer, E.C.** (2015) LINC'ing form and function at the nuclear envelope. *FEBS Lett.* **589**, 2514-2521.
- Mitsubishi, H., Hayashi, Y.K., Matsuda, C., Noguchi, S., Wakatsuki, S., Araki, T. and Nishino, I.** (2010) Specific phosphorylation of Ser458 of A-type lamins in LMNA-associated myopathy patients. *J. Cell Sci.* **123**, 3893-3900.
- Mittnacht, S. and Weinberg, R.A.** (1991) G1/S phosphorylation of the retinoblastoma protein is associated with an altered affinity for the nuclear compartment. *Cell* **65**, 381-393.
- 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.
- 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.
- Östlund, 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.
- Parks, S.B., Kushner, J.D., Nauman, D., Burgess, D., Ludwigsen, S., Peterson, A., Li, D., Jakobs, P., Litt, M., Porter, C.B. et al.** (2008) Lamin A/C mutation analysis in a cohort of 324 unrelated patients with idiopathic or familial dilated cardiomyopathy. *Am. Heart J.* **156**, 161-169.
- Polychronidou, M. and Grohans, J.** (2011) Determining nuclear shape: the role of farnesylated nuclear membrane proteins. *Nucleus* **2**, 17-23.
- Scharner, J., Brown, C.A., Bower, M., Iannaccone, S.T., Khatri, I.A., Escolar, D., Gordon, E., Felice, K., Crowe, C.A., Grosmann, C. et al.** (2011) Novel LMNA mutations in patients with Emery-Dreifuss muscular dystrophy and functional characterization of four LMNA mutations. *Hum. Mutat.* **32**, 152-167.
- Simon, D.N. and Wilson, K.L.** (2013) Partners and post-translational modifications of nuclear lamins. *Chromosoma* **122**, 13-31.
- Strelkov, S.V., Schumacher, J., Burkhard, P., Aebi, U. and Herrmann, H.** (2004) Crystal structure of the human lamin A coil 2B dimer: implications for the head-to-tail association of nuclear lamins. *J. Mol. Biol.* **343**, 1067-1080.
- Swift, J., Ivanovska, I.L., Buxboim, A., Harada, T., Dingal, P.C., 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.
- Taimen, P., Pflieger, K., Shimi, T., Moller, D., Ben-Harush, K., Erdos, M.R., Adam, S.A., Herrmann, H., Medalia, O., Collins, F.S. et al.** (2009) A progeria mutation reveals functions for lamin A in nuclear assembly, architecture, and chromosome organization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **106**, 20788-20793.
- Toth, J.I., Yang, S.H., Qiao, X., Beigneux, A.P., Gelb, M.H., Moulson, C.L., Miner, J.H., Young, S.G. and Fong, L.G.** (2005) Blocking protein farnesyltransferase improves nuclear shape in fibroblasts from humans with progeroid syndromes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **102**, 12873-12878.
- Vadrot, N., Duband-Goulet, I., Cabet, E., Attanda, W., Barateau, A., Vicart, P., Gerbal, F., Briand, N., Vigouroux, C., Oldenburg, A.R. et al.** (2015) The p.R482W substitution in A-type lamins deregulates SREBP1 activity in Dunnigan-type familial partial lipodystrophy. *Hum. Mol. Genet.* **24**, 2096-2109.
- Verstraeten, V.L., Caputo, S., van Steensel, M.A., Duband-Goulet, I., Zinn-Justin, S., Kamps, M., Kuijpers, H.J., Ostlund, C., Worman, H.J., Briede, J.J. et al.** (2009) The R439C mutation in LMNA causes lamin oligomerization and susceptibility to oxidative stress. *J. Cell. Mol. Med.* **13**, 959-971.
- 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.
- Wang, Y., Lichter-Konecki, U., Anyane-Yeboah, K., Shaw, J.E., Lu, J.T., Ostlund, C., Shin, J.Y., Clark, L.N., Gundersen, G.G., Nagy, P.L. et al.** (2016) A mutation abolishing the ZMPSTE24 cleavage site in prelamin A causes a progeroid disorder. *J. Cell Sci.* **129**, 1975-1980.
- Worman, H.J. and Bonne, G.** (2007) "Laminopathies": a wide spectrum of human diseases. *Exp. Cell Res.* **313**, 2121-2133.
- Xu, W.S., Parmigiani, R.B. and Marks, P.A.** (2007) Histone deacetylase inhibitors: molecular mechanisms of action. *Oncogene* **26**, 5541-5552.
- Yang, S.H., Bergo, M.O., Toth, J.I., Qiao, X., Hu, Y., Sandoval, S., Meta, M., Bendale, P., Gelb, M.H., Young, S.G. et al.** (2005) Blocking protein farnesyltransferase improves nuclear blebbing in

mouse fibroblasts with a targeted Hutchinson-Gilford progeria syndrome mutation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **102**, 10291-10296.

ABBREVIATIONS

CMD, congenital muscular dystrophy; *LMNA*, gene encoding for A-type lamins; L-CMD, *LMNA* dependent congenital muscular dystrophy ; preLA, prelamin A; mLA, mature lamin A; NE, nuclear envelope.

Annexe 3 : Integrative 3D genome modeling reveals implications of lamin A mutations on genome architecture³

Jonas Paulsen¹, Monika Sekelja¹, Anja R. Oldenburg¹, Alice Barateau², Anita L. Sørensen¹, Akshay Shah¹, Erwan Delbarre¹, Nolwenn Briand, Corinne Vigouroux^{3,4,5,6}, Brigitte Buendia², Philippe Collas^{1,7}

¹ Department of Molecular Medicine, Institute of Basic Medical Sciences, Faculty of Medicine, University of Oslo, Oslo, Norway.

² Institut BFA, Université Paris 7 - CNRS, Paris, France.

³ INSERM, UMR S938, Centre de Recherches Saint – Antoine

⁴ UPMC Université Paris 6 UMR S938,

⁵ ICAN

⁶ AP - HP Hôpital Tenon, Paris, France.

⁷ Norwegian Center for Stem Cell 11 Research, Oslo University Hospital, Oslo, Norway.

Correspondence should be addressed to P.C. 12 (philc@medisin.uio.no).

ABSTRACT

Processes shaping the 3-dimensional (3D) human genome remain elusive. We present Chrom3D, a user-friendly whole-genome 3D modeling software that dynamically simulates the radial positioning of topologically-associating domains (TADs) in the nucleus. We integrate Hi-C and lamin-associated domain (LAD) information to generate high-resolution ensembles of models that recapitulate single-cell TAD distribution. Chrom3D reveals dynamic TADs and TADs constitutively placed at the nuclear periphery or nuclear interior. TAD stability in these compartments is consistent with their gene density and expression level. A- and B-type lamins as radial constraints differentially skew LAD distribution towards the nuclear interior or periphery. Predictions of radial LAD placement in model ensembles are validated by quantitative imaging. Lastly, Chrom3D models reveal unexpected features of LAD regulation in the nuclear interior in cells from patients carrying a lipodystrophy-causing LMNA mutation. Integration of radial positioning constraints in 3D genome models enables the study of spatial gene regulation in disease contexts.