



HAL
open science

Altérations de la voie de signalisation BMP4 responsables de la différenciation accélérée de myoblastes mutés sur le gène LMNA

Alexandre Janin

► **To cite this version:**

Alexandre Janin. Altérations de la voie de signalisation BMP4 responsables de la différenciation accélérée de myoblastes mutés sur le gène LMNA. Biologie cellulaire. Université de Lyon, 2018. Français. NNT : 2018LYSE1237 . tel-02023092

HAL Id: tel-02023092

<https://theses.hal.science/tel-02023092>

Submitted on 18 Feb 2019

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

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



N° d'ordre NNT : 2018LYSE1237

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON
opérée au sein de
l'Université Claude Bernard Lyon 1

Ecole Doctorale N°340
BMIC - Biologie Moléculaire Intégrative et Cellulaire

Spécialité de doctorat : Biologie moléculaire et cellulaire
Discipline : Myologie

Soutenue publiquement le 16 novembre 2018, par :
Alexandre Janin

**Altérations de la voie de signalisation
BMP4 responsables de la différenciation
accélérée de myoblastes mutés sur le
gène *LMNA***

Devant le jury composé de :

Dr BONNE Gisèle

Directeur de Recherche, Institut de Myologie

Présidente du Jury

Pr FÉASSON Léonard

PU-PH, LIBM/CHU de Saint Etienne

Rapporteur

Dr NISSAN Xavier

Directeur de Recherche, I-Stem

Rapporteur

Dr GACHE Vincent

Chargé de Recherche, INMG

Examineur

Dr STREICHENBERGER Nathalie

MCU-PH, UCBL/Hospices Civils de Lyon

Examinatrice

Pr CHEVALIER Philippe

PU-PH, UCBL/ Hospices Civils de Lyon

Directeur de thèse

Dr MÉJAT Alexandre

Chargé de Recherche, INSERM

Invité

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université

Président du Conseil Académique

Vice-président du Conseil d'Administration

Vice-président du Conseil Formation et Vie Universitaire

Vice-président de la Commission Recherche

Directrice Générale des Services

M. le Professeur Frédéric FLEURY

M. le Professeur Hamda BEN HADID

M. le Professeur Didier REVEL

M. le Professeur Philippe CHEVALIER

M. Fabrice VALLÉE

Mme Dominique MARCHAND

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux

Faculté d'Odontologie

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Directeur : M. le Professeur G.RODE

Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON

Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS

Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA

Directeur : M. X. PERROT

Directeur : Mme la Professeure A-M. SCHOTT

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies

Département Biologie

Département Chimie Biochimie

Département GEP

Département Informatique

Département Mathématiques

Département Mécanique

Département Physique

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon

Polytech Lyon

Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. F. DE MARCHI

Directeur : M. le Professeur F. THEVENARD

Directeur : Mme C. FELIX

Directeur : M. Hassan HAMMOURI

Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE

Directeur : M. le Professeur G. TOMANOV

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Directeur : M. le Professeur J-C PLENET

Directeur : M. Y.VANPOULLE

Directeur : M. B. GUIDERDONI

Directeur : M. le Professeur E.PERRIN

Directeur : M. G. PIGNAULT

Directeur : M. le Professeur C. VITON

Directeur : M. le Professeur A. MOUGNIOTTE

Directeur : M. N. LEBOISNE

REMERCIEMENTS

AU PROFESSEUR PHILIPPE CHEVALIER

Je vous remercie d'avoir dirigé ce travail. Vous y trouverez le témoignage de mon profond respect. Je vous remercie également pour la qualité des relations clinico-biologiques qui existent entre nos deux services.

AU DOCTEUR ALEXANDRE MEJAT

Je te remercie de m'avoir accompagné dans ce travail et d'avoir permis sa réalisation. Merci de m'avoir transmis ton intérêt pour la recherche en myologie. Trouve dans ce travail le témoignage de ma gratitude.

AU DOCTEUR VINCENT GACHE

Je te remercie de m'avoir accompagné dans la valorisation de ce travail. Je te remercie également d'avoir accepté que je continue l'aventure dans l'équipe. Trouve dans ce travail le témoignage de ma reconnaissance, de ma gratitude et de mon respect.

AUX RAPPORTEURS, LE PROFESSEUR LEONARD FEASSON ET LE DOCTEUR XAVIER NISSAN

Je vous remercie d'avoir pris le temps de juger ce travail en tant que rapporteurs et de lui apporter votre avis d'expert. Soyez assurés de ma reconnaissance et de mon profond respect.

AU DOCTEUR GISELE BONNE

Je vous remercie pour l'intérêt porté à ce travail et d'avoir accepté de participer à mon jury de thèse. Je vous remercie également de l'aide que vous m'avez apporté dans l'accomplissement d'une partie de ce travail. Soyez assurée de mon estime et de mon profond respect.

AU DOCTEUR NATHALIE STREICHENBERGER

Je te remercie d'avoir accepté de participer à mon jury de thèse. Je te remercie également de ton aide pour les différents projets que nous avons pu mener. Sois assurée de ma plus grande estime et de mon profond respect.

CE TRAVAIL EST LE FRUIT D'UNE COLLABORATION A DIFFERENTS NIVEAUX. JE TIENS DONC A REMERCIE TOUS CEUX QUI ONT CONTRIBUE ET QUI ONT ETE INDISPENSABLES A CE TRAVAIL :

- Merci à l'équipe du laboratoire de cardiogénétique. Merci de supporter mes moments de craquage. Travailler à vos côtés est un réel plaisir.
- Merci aux membres passés et actuels de l'équipe MNCA. C'est un plaisir de travailler à vos côtés.
- Merci à tous mes collègues du service de Biochimie et Biologie moléculaire. Merci pour l'environnement de travail que l'on a pu créer. Je vous remercie pour votre soutien quotidien et pour nos moments *team building* entre les Molkky et les paris sur les prénoms des *Royal babies*.
- Merci aux personnels du Centre de Référence des Troubles du Rythme Héritaire pour leur implication dans la prise en charge des patients et pour la qualité des échanges clinico-biologiques entre nos services.

Les travaux présentés dans ce mémoire ont été réalisées à l'Institut NeuroMyoGène (CNRS UMR 5310 - INSERM U1217 - Université de Lyon - Université Claude Bernard Lyon 1) dirigé par le Pr Laurent Schaeffer au sein de l'équipe « Architecture Nucléaire » animée par le Dr Alexandre Méjat puis au sein de l'équipe MNCA (« Muscle Nuclear & Cytoskeleton Architecture ») animée par le Dr Vincent Gache et dans le laboratoire de Cardiogénétique moléculaire, Laboratoire de Biochimie et Biologie Moléculaire Grand Est, Groupement Hospitalier Est, Centre de Biologie et de Pathologie Est dirigé par le Dr Gilles Millat. Je tiens donc à remercier particulièrement ces structures pour leur accueil et pour avoir permis la réalisation de ces travaux.

RESUME

Altérations de la voie de signalisation BMP4 responsables d'une différenciation accélérée de myoblastes mutés sur le gène LMNA.

Les lamines A et C sont deux composants majeurs de la lamina nucléaire, réseau de filaments intermédiaires situé sous la membrane nucléaire interne. Les mutations du gène *LMNA*, codant les lamines A/C, ont été associées à de nombreuses pathologies humaines, appelées laminopathies, et affectant un ou plusieurs tissus dont le muscle. Les mécanismes physiopathologiques sous-jacents ne sont encore que partiellement élucidés. Les lamines A/C jouant un rôle crucial dans l'architecture nucléaire et l'organisation de la chromatine, l'hypothèse d'une altération de l'expression de facteurs de transcription ou de gènes tissu-spécifiques a été formulée. De plus, au niveau musculaire, il a été décrit que les lamines A/C jouent un rôle majeur dans la mise en place d'une différenciation musculaire efficace.

Afin d'identifier des altérations potentielles au sein des voies de signalisation régulant la différenciation musculaire, nous avons utilisé un modèle de myoblastes murins conditionnellement immortalisés et comparé le profil d'expression entre les myoblastes sauvages et inactivés pour le gène *Lmna* (*Lmna*^{-/-}). Nous avons ainsi identifié deux altérations majeures de la voie BMP (*Bone Morphogenetic Pathway*) : la diminution de l'expression du ligand *Bmp4* et l'augmentation de celle de *Smad6*, un inhibiteur intracellulaire de la voie. Cette surexpression de *Smad6* est responsable d'une séquestration cytoplasmique des Smads 1, 5 et 8 phosphorylées et d'une diminution de l'expression des gènes cibles, *Id1* et *Id2*. Les myoblastes *Lmna*^{-/-} montrent une différenciation myogénique prématurée, phénotype réversible par des expériences d'ARN interférent ciblant *Smad6*. Enfin, nous avons montré que ces défauts sont retrouvés dans des myoblastes humains de patient porteur hétérozygote de la mutation *LMNA* p.R310X.

Ces résultats apportent un nouveau mécanisme physiopathologique des laminopathies musculaires et identifient une nouvelle cible thérapeutique potentielle.

SUMMARY

Altered BMP4 pathway leads to accelerated myogenic differentiation of *LMNA* mutated cells.

LMNA gene encodes lamins A and C, two major components of the nuclear lamina, a network of intermediate filaments underlying the inner nuclear membrane. *LMNA* mutations have been associated with a wide spectrum of human diseases collectively called “laminopathies” affecting one or several tissues, such as muscles. The physiopathological mechanisms underlying laminopathies remain unclear. Given the crucial role of lamins A/C in nuclear architecture and chromatin organization, the “gene regulation” hypothesis has been proposed. It suggests that *LMNA* mutations could alter in a tissue-specific manner transcription factors and/or genes expression. Moreover, lamins A/C have been described as important regulators in muscle differentiation regulation.

To identify potential alterations in signaling pathways regulating muscle differentiation in *LMNA*-mutated myoblasts, we used a previously described model of conditionally immortalized murine myoblasts and compared gene expression profiles in wild-type and *Lmna*^{-/-} H-2K myoblasts. We identified two major alterations of the Bone Morphogenetic Protein (BMP) pathway in *Lmna*^{-/-} myoblasts: *Bmp4* downregulation and *Smad6* overexpression. We demonstrated that *Smad6* overexpression lead to *Smad1/5/8* sequestration in the cytoplasm and to the downregulation of their target genes, *Id1* and *Id2*. As a consequence, *Lmna*-null myoblasts displayed a premature differentiation which could be rescued by downregulating *Smad6* expression. Finally, we showed that these defects are relevant for human laminopathies as they are also present in myoblasts from a human patient carrying a *LMNA*^{+/Q310X} mutation.

Taken together, these results provide a potential mechanism for the muscle stem cell exhaustion and muscle atrophy observed in muscle laminopathies and identify a new therapeutical target likely to reverse pathological phenotypes.

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS.....	3
RESUME	5
SUMMARY	6
SOMMAIRE.....	7
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	11
INDEX DES FIGURES	13
INDEX DES TABLEAUX.....	15
Chapitre 1 : INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE.....	16
1 Physiologie du muscle strié squelettique	17
1.1 Généralités.....	17
1.2 Anatomie des muscles squelettiques.....	18
1.3 Les types de fibres musculaires.....	19
1.4 Structure de la fibre musculaire	20
1.5 Structure des myofibrilles.....	22
1.5.1 Structure du sarcomère, unité structurale et contractile des myofibrilles	22
1.5.2 Les myofilaments fins d'actine et les protéines associées	24
1.5.3 Les myofilaments épais de myosine et les protéines associées.....	25
1.5.4 Les troisième et quatrième systèmes filamentaires	25
1.6 La régénération du muscle strié squelettique	26
1.6.1 Les cellules satellites.....	26
1.6.1.1 Rôles	26
1.6.1.2 Localisation et structure.....	27
1.6.1.3 Détection et identification	27
1.6.1.4 Capacité d'auto-renouvellement : fonction et mécanisme	29
1.6.1.5 Activation, prolifération et différenciation	30
1.6.2 Implication des cellules satellites dans les maladies neuromusculaires.....	33
2 Les lamines.....	36
2.1 L'enveloppe nucléaire	36
2.1.1 Découverte et structure générale de l'enveloppe nucléaire.....	36
2.1.2 Composition de l'enveloppe nucléaire.....	36
2.1.2.1 La membrane nucléaire externe ou « <i>outer nuclear membrane</i> » (ONM).....	36
2.1.2.2 La membrane nucléaire interne ou « <i>inner nuclear membrane</i> » (INM)	37

2.1.2.3	Le complexe du pore nucléaire ou « <i>nuclear-pore complexe</i> » (NPC)	37
2.2	La lamina nucléaire.....	39
2.2.1	Description.....	39
2.2.2	Les lamines de type A.....	39
2.2.3	Les lamines de type B.....	40
2.2.4	Structure des lamines.....	41
2.2.4.1	Structure primaire.....	41
2.2.4.2	Structures secondaire et tertiaire des lamines.....	43
2.2.5	Assemblage des lamines.....	44
2.2.6	Expression des lamines au cours du développement	45
2.2.7	Maturation des lamines	45
2.2.8	Import des lamines	47
2.2.9	Dynamique des lamines pendant le cycle cellulaire	48
2.2.10	Modifications post-traductionnelles des lamines A	49
2.2.10.1	Phosphorylations.....	49
2.2.10.1.1	Pendant la mitose	49
2.2.10.1.2	En interphase	49
2.2.10.2	Glycosylation	50
2.2.10.3	Acétylation.....	50
2.2.10.4	SUMOylation	50
2.2.10.5	Ubiquitination	51
2.2.10.6	Oxydation	52
3	Les partenaires nucléoplasmiques des lamines de type A	54
3.1	Les protéines associées aux lamines (ou <i>lamina-associated proteins</i>)	54
3.2	La protéine Rb (ou <i>retinoblastoma protein</i>)	55
3.3	La protéine BAF.....	55
3.4	F-actine nucléaire	56
3.5	SREBP1.....	56
3.6	Titine	56
4	Rôles des lamines de type A.....	57
4.1	Organisation de la chromatine	57
4.2	Organisation de l'enveloppe nucléaire.....	58
4.3	Définition des propriétés mécaniques du noyau et des cellules	58
4.4	Mécanotransduction.....	59
4.4.1	Support et preuves sous-jacentes	59
4.4.2	Mécanismes potentiels sous-jacents à la mécanotransduction	63
4.5	Positionnement du noyau.....	67
4.6	Support de différentes voies de signalisation	67

4.7	Réplication et réparation de l'ADN.....	68
4.8	Transcription.....	69
5	Les laminopathies.....	70
5.1	Description générale.....	70
5.2	Atteinte du nerf périphérique.....	75
5.2.1	Description clinique et génétique	75
5.2.2	Physiopathologie	75
5.3	Atteinte du tissu adipeux.....	76
5.3.1	Description clinique et génétique	76
5.3.2	Physiopathologie	77
5.3.2.1	Perte de l'activité du facteur de transcription SREBP1	77
5.3.2.2	Rôle du facteur de transcription PPAR γ	77
5.4	Atteinte du tissu musculaire strié.....	78
5.4.1	Description clinique	78
5.4.1.1	Dystrophie musculaire d'Emery-Dreifuss	78
5.4.1.2	Dystrophie musculaire congénitale.....	80
5.4.1.3	Dystrophie musculaire des ceintures (LGMD-1B).....	81
5.4.1.4	Atteinte cardiaque.....	83
5.4.2	Modèles murins disponibles.....	85
5.4.3	Mécanismes physiopathologiques	86
5.4.3.1	Activation de la voie des MAP kinases	86
5.4.3.2	Altération de la réponse au stress mécanique.....	87
5.4.3.3	Dérégulation de la voie de signalisation pRb-MyoD	88
5.4.3.4	Diminution de l'activation de la voie de signalisation WNT/ β -caténine.	90
5.4.3.5	Altération de la voie de signalisation TGF β	91
5.5	Atteinte multisystémique : le vieillissement accéléré	92
6	La voie de signalisation BMP (<i>Bone Morphogenetic Protein</i>).....	94
6.1	La superfamille du TGF β	94
6.2	Les voies de signalisation canoniques du TGF β et des BMP	97
6.3	Les voies de signalisation non canoniques du TGF β et des BMP	101
6.4	La voie de signalisation BMP : physiologie.....	102
6.4.1	Du concept de « <i>Bone Morphogenetic Proteins</i> » à celui de « <i>Body Morphogenetic Proteins</i> » 102	
6.4.2	La régulation extracellulaire de la voie de signalisation BMP.....	104
6.4.3	La régulation intracellulaire de la voie de signalisation BMP.	105
6.5	La voie de signalisation BMP : rôle dans le développement musculaire	107
6.5.1	Description initiale dans la formation osseuse	107
6.5.2	Rôle dans la myogenèse embryonnaire.....	107

6.5.3	Rôle dans la myogenèse fœtale	109
6.5.4	Rôle dans la myogenèse post-natale.....	110
Chapitre 2 : PRÉSENTATION DU PROJET DE RECHERCHE		113
Chapitre 3 : MANUSCRIT.....		116
1	Références de l'article.....	117
2	Résumé	117
3	Article.....	118
Chapitre 4 : DISCUSSION ET CONCLUSION		133
1	Résumé des résultats.....	134
2	Limites de l'étude.....	137
3	Le rôle de la voie BMP dans l'homéostasie musculaire squelettique et cardiaque .	137
4	Les protéines SMADs au croisement des voies de signalisation BMP et TGFβ.....	138
5	De la lamina nucléaire aux altérations de la voie BMP	140
6	L'inhibiteur SMAD6, nouvelle cible thérapeutique ?	141
7	Conclusion générale.....	142
TABLE DES ANNEXES		143
ANNEXES		144
BIBLIOGRAPHIE		176

LISTE DES ABRÉVIATIONS

BMP	Bone Morphogenetic Protein
BAF	Barrier to Autointegration Factor
BRE	BMP-Responsive Element
CD	Cluster of Differentiation
CDK1	Cyclin Dependant Kinase 1
CMT	Charcot-Marie-Tooth
EDMD	Emery-Dreifuss Muscular Dystrophy
ERK	Extracellular signal-regulated Kinase
FISH	Fluorescence In Situ Hybridization
FPLD	Dunningan-type Familial Partial Lipodystrophy
HGPS	Hutchison-Gilford Progeria Syndrome
ID	Inhibitor of DNA-binding
IFN	Interféron
INM	Inner nuclear membrane
KASH	Klarsicht, ANC-1, Syne Homology
LAD	Lamina-associated Domain
LAP	Lamina-associated Protein
L-CMD	<i>LMNA</i> -related Congenital Muscular Dystrophy
LGMD1B	Limb-Girdle Muscular Dystrophy type 1B
LHD	Lamin A/C Heart Disease
LINC	Linker of Nucleoskeleton to Cytoskeleton
LLC	Large Latent Complex
LTBP	Latent TGF β Binding Protein
MAD	MandibuloAcral Dysplasia
MAP	Microtubule-Associated Protein
MLC	Myosin Light Chain
MyHC	Myosin Heavy Chain
NLS	Nuclear Localisation Signal
NPC	Nuclear Pore Complex
ONM	Outer Nuclear Membrane
Pbs	Paires de bases
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
PKC	Protéine Kinase C
PPAR	Peroxisome Proliferator-Activated Receptor

RE	Réticulum Endoplasmique
ROS	Reactive Oxygen Species
SLC	Small Latent Complex
SREBP1	Sterol Regulatory Element Binding Protein-1
SUMO	Small Ubiquitin-like Modifier
TGF	Transforming Growth Factor
YAP	Yes-Associated Protein

INDEX DES FIGURES

Figure 1. Organisation du tissu musculaire strié squelettique	18
Figure 2. Structure macroscopique et microscopique des muscles striés squelettiques.....	21
Figure 3. Vue schématique et en microscopie électronique de la structure du sarcomère.	23
Figure 4. Localisation des cellules satellites en microscopie électronique à transmission.	26
Figure 5. Localisation des marqueurs exprimés par les cellules satellites dans le modèle murin... 28	
Figure 6. Les cellules satellites ont une capacité d'auto-renouvellement.....	30
Figure 7. Représentation schématique des facteurs exprimés au cours de la différenciation musculaire.....	31
Figure 8. Cinétique d'expression des facteurs de transcription myogéniques au cours de l'activation, de la différenciation et de la fusion des cellules satellites.....	32
Figure 9. Les pathologies musculaires peuvent être divisées en deux groupes.	35
Figure 10. Structure de l'enveloppe nucléaire.....	38
Figure 11. Les principales isoformes de lamines A sont produites par épissage alternatif du gène <i>LMNA</i>	40
Figure 12. Les lamines de types B.....	40
Figure 13. Comparaison de la structure générale des lamines à celle des filaments intermédiaires cytoplasmiques des vertébrés.....	42
Figure 14. Observation en microscopie électronique de filaments de lamines A/C de foie de rat. 43	
Figure 15. Structure de l' <i>Ig-fold</i> des lamines.....	43
Figure 16. Schéma de l'assemblage des lamines.....	44
Figure 17. Processus de maturation des lamines de type A.....	46
Figure 18. Modèle du rôle de l'importine $\alpha 16$ dans le trafic des protéines jusqu'à l'INM.....	48
Figure 19. Représentation schématique des différentes modifications post-traductionnelles décrites des lamines humaines.....	53
Figure 20. Représentation schématique des protéines de l'enveloppe nucléaire impliquées dans la transmission de force au noyau.....	60
Figure 21. Organisation particulière dans les cellules musculaires.....	62
Figure 22. Récapitulatif des mécanismes proposés dans la mécanotransduction.....	66
Figure 23. Les mutations dans le gène <i>LMNA</i> sont responsables de pathologies appelées « laminopathies ».....	71
Figure 24. Localisation des mutations du gène <i>LMNA</i> en fonction du diagnostic et du tissu atteint.	72
Figure 25. Pathologies causées par des mutations dans des gènes codant des protéines de l'enveloppe nucléaire.....	73

Figure 26. Critères diagnostiques dans les pathologies cardiaques liées au gène <i>LMNA</i>	84
Figure 27. Les lamines de type A et LAP2a affectent la fonction de pRb dans le contrôle du cycle cellulaire par plusieurs mécanismes.....	89
Figure 28. Représentation schématique de la maturation anormale des lamines A dans le syndrome d'Hutchinson-Gilford.....	93
Figure 29. Arbre phylogénique des membres de la superfamille du TGF chez l'homme.....	95
Figure 30. Maturation et séquestration du TGF- β	96
Figure 31. Les voies de signalisation de la superfamille du TGF β SMAD-dépendantes.....	100
Figure 32. Mécanismes d'action du répresseur intracellulaire, SMAD6.	106
Figure 33. Schéma récapitulatif de l'expression de Pax3, MyoD, BMP et Noggin au niveau du bourgeon embryonnaire de l'aile chez l'embryon de poulet.....	108
Figure 34. Représentation schématique de la fonction de la voie BMP pendant la myogenèse fœtale.....	109
Figure 35. Rôle de la voie de signalisation BMP pendant la progression de la différenciation des cellules satellites.....	111
Figure 36. Modèle proposé par Friedrichs <i>et al.</i> pour le rôle de la voie BMP pendant la différenciation des cellules satellites.....	112

INDEX DES TABLEAUX

Tableau I. Comparaison des caractéristiques des types de fibres	20
Tableau II. Comparaison des phénotypes musculaires liés à des mutations dans le gène <i>LMNA</i>	82
Tableau III. Classification des ligands, des récepteurs de type I et de type II et des SMADs parmi les différentes familles des voies TGF β	99
Tableau IV. Tableau récapitulatif des ligands de la famille BMP, leurs récepteurs et leurs expressions tissulaires.....	103

Chapitre 1 : INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

1 Physiologie du muscle strié squelettique

1.1 Généralités

Grâce à leurs capacités de contractilité, d'excitabilité mais aussi d'élasticité, les muscles sont à l'origine du mouvement et de la force. On en distingue trois types :

- (i) Les muscles striés squelettiques, à l'origine de contractions et donc de mouvements volontaires. Ils sont sous le contrôle du système nerveux cérébro-spinal.
- (ii) Le myocarde, qui permet la contraction non volontaire du coeur, sous le contrôle du système nerveux autonome. Il présente une organisation en muscle strié, proche de celle des muscles striés squelettiques.
- (iii) Les muscles lisses, à l'origine de contractions et de mouvements involontaires, sous le contrôle du système nerveux autonome.

Les muscles squelettiques sont un des tissus les plus dynamiques et les plus plastiques du corps humain. Chez l'Homme, ils représentent environ 40% du poids total du corps, contiennent 50 à 75% des protéines totales et sont responsables de 30 à 50% du renouvellement protéique total. Ils contribuent à de multiples fonctions corporelles :

- (i) D'un point de vue mécanique, la fonction principale des muscles est de convertir de l'énergie chimique en énergie mécanique permettant ainsi de produire une force, de maintenir une posture et de générer un mouvement volontaire ;
- (ii) D'un point de vue métabolique, les muscles squelettiques contribuent au métabolisme basal en tant que tissu de réserve pour le glycogène ou des acides aminés, en tant que tissu producteur de chaleur et en tant que tissu consommateur pendant une activité physique.

La suite de cette partie de l'exposé se concentrera sur les muscles squelettiques, étant au centre du projet de recherche.

1.2 Anatomie des muscles squelettiques

Grâce à la liaison des muscles squelettiques au squelette par les tendons situés à leurs extrémités, la contraction musculaire permet le mouvement du membre concerné.

C'est un tissu post-mitotique contractile composé de myofibrilles, ou fibres musculaires, cellules multinucléées résultant de la fusion de cellules mononucléées différenciées. L'organisation générale des muscles striés squelettiques reprend plusieurs éléments conjonctifs, de l'extérieur vers l'intérieur (Figure 1) :

- (i) L'épimysium, membrane de tissu conjonctif entourant les muscles squelettiques
- (ii) Le péri-mysium, entourant chaque faisceau musculaire
- (iii) L'endomysium qui est finement vascularisé et qui entoure les fibres musculaires qui composent chaque faisceau musculaire.

Le muscle est également irrigué par un réseau de vaisseaux sanguins, permettant un apport en nutriments et en oxygène, et innervé par des fibres sensibles et motrices.

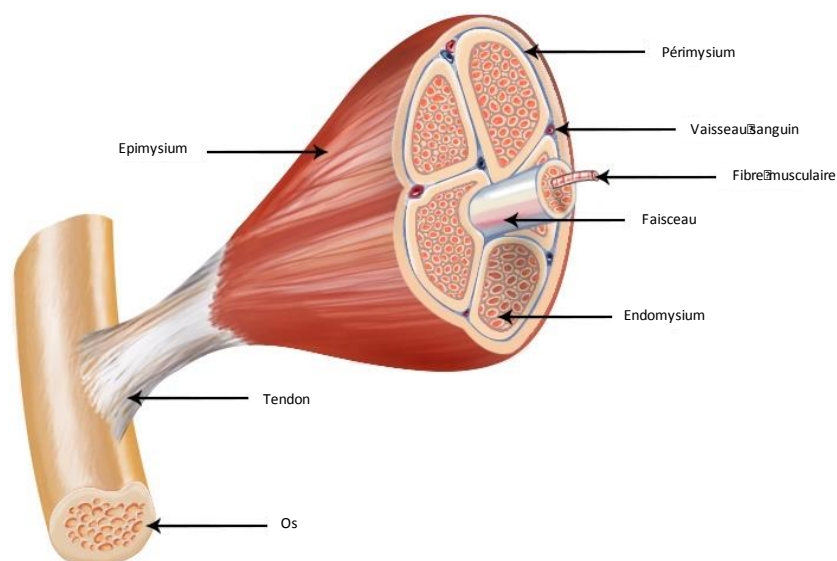


Figure 1. Organisation du tissu musculaire strié squelettique

Le muscle est recouvert de l'épimysium, membrane protectrice, et est relié à l'os par un tendon. Les fibres musculaires s'organisent au sein du péri-mysium en faisceaux de plusieurs centaines de fibres. Modifié d'après www.ncbi.nlm.nih.gov.

1.3 Les types de fibres musculaires

Une fibre musculaire est une cellule unique, multinucléée, de forme allongée, dont la longueur est très variable et peut atteindre plusieurs centimètres. Leur diamètre est, quant à lui, compris entre 10 et 100 μm environ. Elle résulte de la fusion entre des cellules immatures mononuclées au cours du développement embryonnaire ou de la régénération musculaires, appelées « myoblastes ».

La classification des fibres musculaires repose sur leur taille, leur vascularisation, leur contenu en glycogène ou en mitochondries ainsi que sur leur innervation motrice. Ces caractéristiques vont globalement définir leur capacité à réaliser un exercice d'une intensité plus ou moins importante sur une durée plus ou moins longue. Classiquement, on trouve :

- (i) Des fibres de type I, dites lentes. Ces fibres contiennent peu de glycogène mais une quantité importante de mitochondries : ce sont des fibres dites « oxydatives ». Elles expriment une isoforme particulière de la chaîne lourde de la myosine (MyHC) : MyHC-1 codée par le gène *MYH7*. Elles sont également de petite taille mais très vascularisées. Ces caractéristiques leurs permettent de réaliser des exercices prolongés bien que peu intenses. Elles interviennent donc principalement dans le maintien de la posture.

- (ii) Des fibres de type II, dites rapides. Ces fibres contiennent, quant à elles, peu de mitochondries mais sont riches en glycogène. Elles sont peu vascularisées et de plus grande taille. Ces fibres, plus puissantes que les fibres de type I, peuvent ainsi réaliser des exercices plus intenses mais de durée courte. Leur métabolisme essentiellement glycolytique les rend plus fatigable. Au sein de ce groupe, plusieurs sous-classes (IIA, IIB, IIX) ont été définies sur leur coloration de l'ATPase myofibrillaire. Elles expriment également des isoformes de la chaîne lourde de la myosine différentes : MyHC-2A codée par le gène *MYH2*, MyHC-2B codée par *MYH4* et MyHC-2X codée par *MYH1*. Cette différence conditionne leur vitesse de contraction (IIB>IIX>IIA). La composition en type de fibres est caractéristique d'un muscle donné mais peut varier en fonction de nombreux stimuli extérieurs dont l'exercice physique notamment.

	I	IIA	IIX	IIB
VITESSE DE CONTRACTION	+	+++	++++	+++++
METABOLISME OXYDATIF	+++++	++++	++	+
METABOLISME GLYCOLYTIQUE	+	++++	++++	+++++
VASCULARISATION	+++++	+++	++	+
DIAMETRE	++	++	++++	+++++
FATIGUABILITE	+	++	+++	+++++

Tableau I. Comparaison des caractéristiques des types de fibres

Les différents critères sont quantifiés de façon semi-quantitative (+ : très faible, ++ : faible, +++ : moyen, ++++ : haut, +++++ : très haut), inspiré de Lefaucheur et al. 2010.

1.4 Structure de la fibre musculaire

La fibre musculaire, également appelée myofibre ou cellule musculaire, est multinucléée et post-mitotique. Elle est composée de deux parties (Figure 2) :

- (i) Une composante contractile permettant la contraction et le mouvement : les myofibrilles constituées de la succession des sarcomères
- (ii) Une composante non contractile servant de support à l'activité contractile : les organites intracellulaires (mitochondries, réticulum endoplasmique), sarcolemme, enzymes...

Chaque myofibrille est entourée par un réseau membranaire complexe. Ce réseau, qui dérive du sarcolemme, s'invagine à l'intérieur des myofibres, perpendiculairement à la cellule pour former, à intervalles réguliers, le système tubulaire transverse ou « tubule-T ». Ce système permet la propagation et la diffusion du signal électrique de l'extérieur vers l'intérieur de la fibre afin de permettre à l'ensemble des myofibrilles composant une fibre musculaire de répondre rapidement et simultanément.

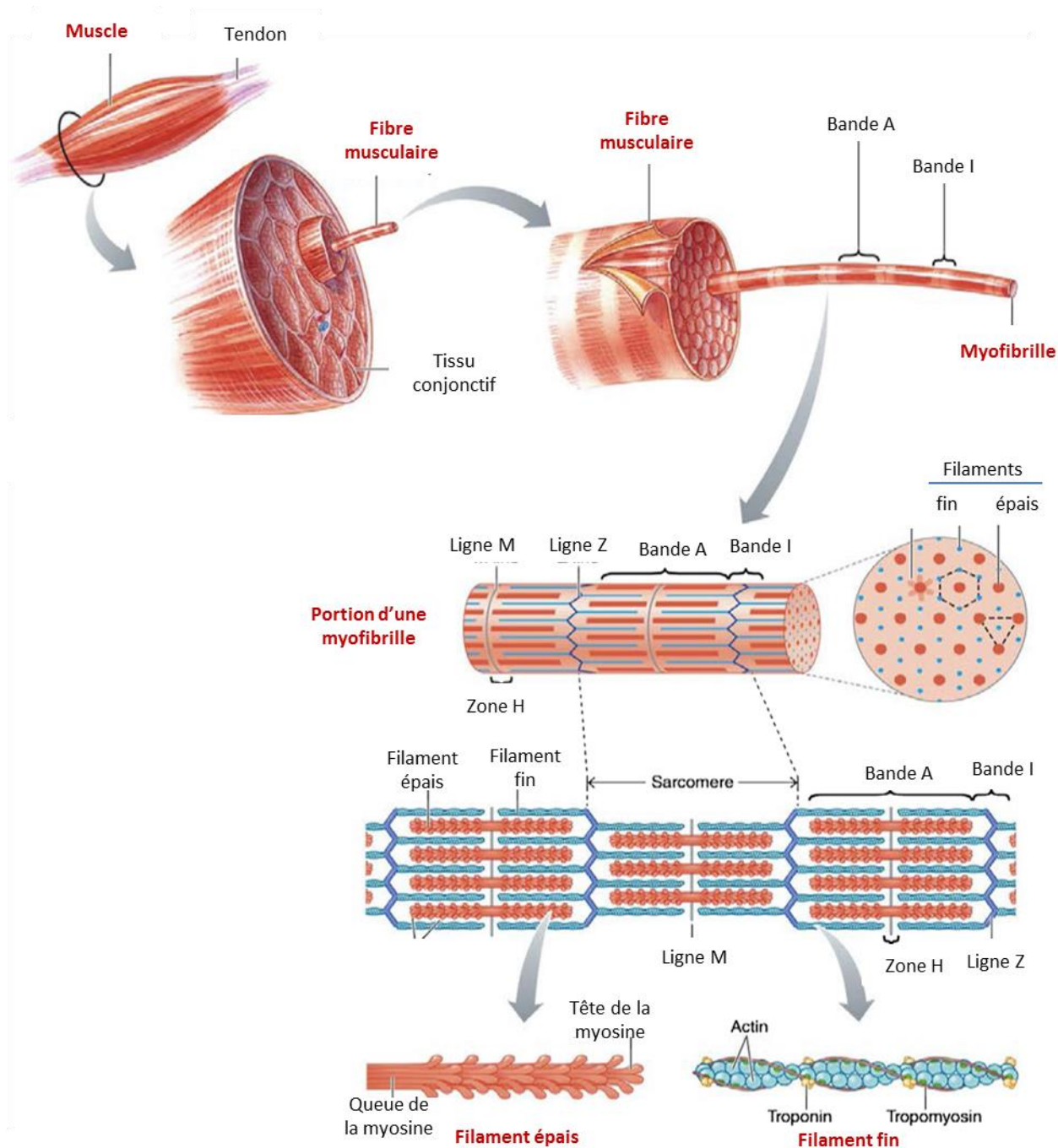


Figure 2. Structure macroscopique et microscopique des muscles striés squelettiques.

La fibre musculaire contient de nombreux éléments contractiles cylindriques appelés myofibrilles. Chaque myofibrille correspond à la succession de l'unité structurale contractile du muscle : le sarcomère. Ce dernier est formé par un assemblage très organisé et composé principalement de filaments fins d'actine et de filaments épais de myosine. Modifiée d'après Frontera *et al.* 2015 (1).

1.5 Structure des myofibrilles

1.5.1 Structure du sarcomère, unité structurale et contractile des myofibrilles

La myofibrille est l'unité de base de la contraction musculaire. Elle est constituée d'une succession de segments, appelés « sarcomères », délimités à leurs extrémités par une strie Z (pour *Zwischenscheibe* qui signifie « disque intermédiaire » en allemand).

Les sarcomères sont de taille variable (de 1,6 à 2,5 μm) selon l'état de la contraction musculaire. Ils sont principalement constitués de deux types de myofilaments dont l'organisation et l'association sont finement déterminées et qui constituent les régions du sarcomère :

- (i) Les myofilaments fins constitués d'actine ;
- (ii) Les myofilaments épais constitués de myosine.

L'observation des myofibrilles en microscopie optique montre une striation régulière par une alternance de bandes claires et de bandes sombres due au chevauchement des myofilaments fins et épais. La partie la plus sombre se retrouve au centre du sarcomère et est appelée « bande A » (pour anisotrope). Elle résulte du chevauchement des myofilaments fins d'actine et des myofilaments épais de myosine. L'observation du sarcomère en microscopie électronique a montré que, au centre de la bande A, se trouvait une zone plus claire, appelée « zone H » (pour *heller*, « plus clair » en allemand), au niveau de laquelle seuls les myofilaments épais sont présents. Au milieu de la zone H, se trouve la ligne M (pour *Mittelscheibe*, « disque du milieu » en allemand) avec une très grosse protéine d'environ 4000 kDa essentielle au maintien des filaments de myosine, la titine. De part et d'autre de la bande A, on trouve de nouveau une zone plus claire correspondant aux bandes I (pour isotrope) qui contient uniquement l'extrémité des filaments fins d'actine (2). Un sarcomère est délimité par deux stries Z et est donc composé par une bande A centrale et par deux demi-bandes I. L'essentiel de la réalisation de la contraction est porté par les protéines dites « contractiles » que sont la myosine et l'actine dont le chevauchement et le glissement l'une sur l'autre produit la force (Figure 3).

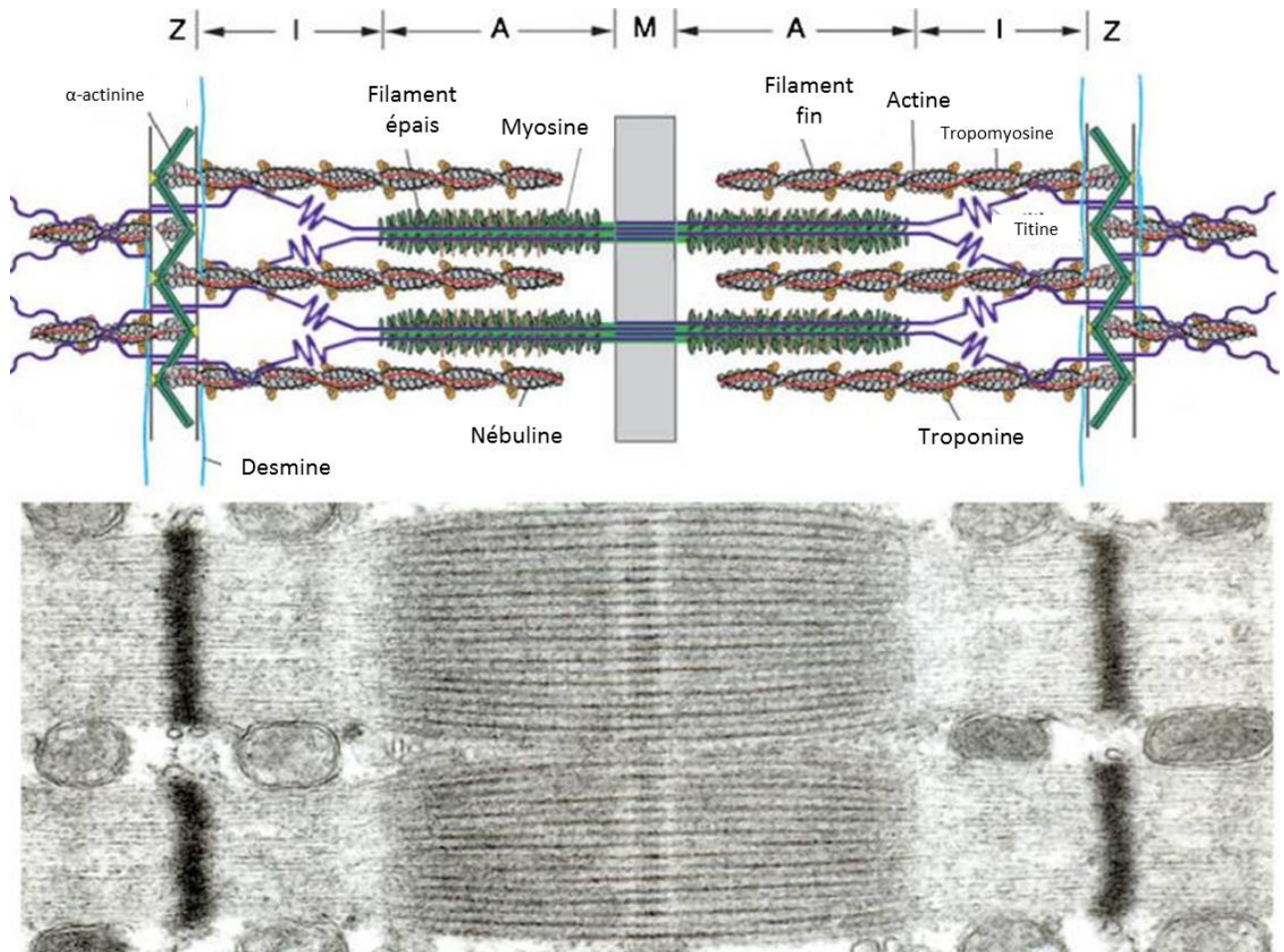


Figure 3. Vue schématique et en microscopie électronique de la structure du sarcomère.

Schéma de la structure du sarcomère et de certaines des protéines structurales les plus abondantes. Les filaments épais de myosine sont visibles en saillie depuis le disque M, alors que les filaments d'actine sont en saillie depuis les disques Z. La structure des sarcomères est partagée entre le muscle squelettique et le muscle cardiaque, mais certaines protéines sont des isoformes différentes ou sont codés des gènes différents. Modifiée d'après Nedergaard *et al.* 2013 (2).

1.5.2 Les myofilaments fins d'actine et les protéines associées

L'actine, plus précisément son isoforme alpha, est la protéine la plus abondante du muscle squelettique. Au niveau musculaire, l' α -actine constitue les myofilaments fins ancrés au niveau de la strie Z qui couvrent la totalité de la demi-bande I jusqu'à une partie de la bande A pour s'arrêter au niveau de la zone H. Ces filaments fins sont constitués de monomères d'actine globulaire (ou « actine G ») organisés en actine fibrillaire (ou « actine F ») organisée en double hélice et associée à des protéines régulatrices telles que la tropomyosine ou le complexe des troponines.

Ces protéines régulatrices contrôlent la liaison entre les myofilaments fins et épais de manière calcium dépendante :

- (i) En absence de calcium, la tropomyosine se trouve dans les sillons des filaments fins. Ainsi, les têtes de myosine ne peuvent accéder à leurs sites de liaison présents sur les filaments d'actine.
- (ii) En présence de calcium, ce dernier va se fixer au niveau de la troponine C (pour *calcium*). Cette fixation induit une perte d'affinité de la troponine I (pour *inhibitrice*) pour l'actine et de la troponine T (pour *tropomyosine*) pour la tropomyosine. Le complexe troponine-tropomyosine change alors de conformation et les sites de liaison de la myosine sur l'actine deviennent alors accessibles. Cette interaction actine-myosine permet d'activer la fonction ATPase des têtes des myofilaments épais de myosine et déclenche le glissement des filaments fins sur les filaments épais. Ce glissement est à l'origine de la force de contraction (3).

1.5.3 Les myofilaments épais de myosine et les protéines associées

Les myofilaments épais s'étendent de chaque côté de la ligne M tout le long de la bande A et sont composés de plusieurs centaines de molécules de myosine. Chacune d'entre elle est constituée de deux chaînes lourdes (appelées MHC pour *myosin heavy chain*) et de quatre chaînes légères (appelées MLC pour *myosin light chain*). Cet hexamère est divisé en trois régions séparées remplissant des fonctions distinctes :

- (i) La tige constituée par les régions C-terminales des deux chaînes lourdes.
- (ii) Le cou, qui permet la rotation de la tête de la myosine.
- (iii) La tête constituée par les régions N-terminales des deux chaînes lourdes associées aux 4 chaînes légères. Ce domaine contient le site de liaison à l'actine et le domaine catalytique à activité ATPase. Ainsi, après hydrolyse de l'ATP, la tête subit une rotation permettant le glissement du myofilament fin d'actine vers le centre du sarcomère.

Des protéines associées à ces myofilaments épais jouent un rôle dans l'assemblage des filaments et dans la régulation de la contraction musculaire. On trouve par exemple les protéines C et H de la liaison à la myosine (*myosin binding proteins*, MyBP-C et H) ou l'adénosine monophosphate désaminase (4-6).

1.5.4 Les troisième et quatrième systèmes filamenteux

En complément des deux premiers systèmes filamenteux que sont les myofilaments fins d'actine et épais de myosine, on trouve deux autres protéines filamenteuses : la titine, qui constitue le troisième système filamenteux, et la nébuline qui forme le quatrième.

1.6 La régénération du muscle strié squelettique

Même à l'âge adulte, le muscle continue de croître et se remodeler pour répondre notamment aux traumatismes (blessures, dommages musculaires) ou à l'exercice musculaire. Ces deux activités sont portées par une population de cellules souches restant dans le muscle adulte appelées « cellules souches musculaires » ou « cellules satellites ». Elles ont été identifiées par Alexander Mauro en 1961 de par leur localisation particulière entre la membrane sarcoplasmique et la lame basale (cf. Figure 4) (7).

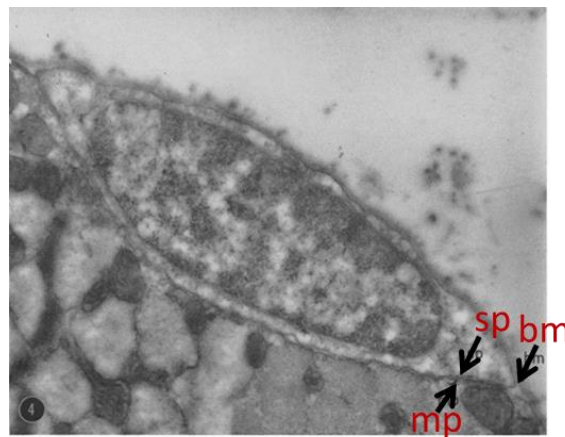


Figure 4. Localisation des cellules satellites en microscopie électronique à transmission.

Vue transversale sur une fibre de *tibialis anticus* de grenouille (sp : membrane de la cellule satellite, mp : membrane plasmique de la fibre musculaire, bm : membrane basale). D'après Scharner et Zammit,, 2011 (8).

1.6.1 Les cellules satellites

1.6.1.1 Rôles

Le muscle, à l'âge adulte, est composé de fibres musculaires différenciées et multinucléées et de noyaux post-mitotiques. Dans les conditions physiologiques, en l'absence de toute pathologie ou blessure du muscle, le renouvellement des noyaux est très faible (9). Après un dommage, la régénération musculaire et le renouvellement des noyaux sont rendus possibles par la présence à la surface des fibres musculaires matures de cellules souches adultes, ou « cellules satellites ».

Ces cellules, identifiables par le marqueur Pax7, ont la propriété d'être quiescente à l'état basal. En réponse à un stimulus externe, ces cellules sont capable de s'auto-renouveler, de proliférer puis d'arrêter leurs divisions, de fusionner et de se différencier pour donner de nouvelles fibres musculaires matures (10).

1.6.1.2 Localisation et structure

Les cellules satellites doivent leur nom à leur situation en périphérie des fibres musculaires, entre la lame basale et le sarcolemme (cf. Figure 4). Elles sont spécifiques du tissu musculaire strié squelettique et sont absentes du tissu musculaire cardiaque et du tissu musculaire lisse. Elles mesurent de 15 à 50 μm , sont parallèles au grand axe de la fibre, sont caractérisées par un rapport nucléocytoplasmique élevé et une hétérochromatine nettement visible (7,11).

Dans le muscle mature sain, elles représentent de 2 à 7 % du nombre total de noyaux et seules 4 à 10% d'entre elles sont activables (12–14). Chez l'homme, dans les conditions physiologiques le nombre de cellules satellites semble constant de l'enfance à l'âge adulte malgré des cycles de régénération potentiellement nombreux. Cependant, le pool de cellules satellites semble varier en fonction de l'âge et des études montrent une diminution de ce dernier chez les personnes âgées comparées aux adultes jeunes. De plus, ce pool semble plus élevé dans les fibres lentes avec l'âge (15,16).

1.6.1.3 Détection et identification

La localisation périphérique et sous-sarcolemmique de la cellule satellite n'est pas suffisante pour leur identification puisque d'autres types de cellules, comme les cellules souches vasculaires, présentent cette même caractéristique et occupent la même niche (17). Ainsi, associés à cette localisation caractéristique, des marqueurs spécifiques sont nécessaires pour leur identification mais également pour caractériser leur état fonctionnel (18).

Parmi les marqueurs les plus utilisés (Figure 5), on trouve :

- (i) Des marqueurs membranaires tels que NCAM ou CD56, CD34, VCAM, les M-Cadhérines, les syndecan 3 et 4, les β 1-intégrines, la cavéoline 1, l'intégrine α 7 ou encore le récepteur aux chimiokines CXCR4, le récepteur à activité tyrosine kinase c-Met ou le récepteur à la calcitonine ;
- (ii) Des marqueurs de la membrane nucléaire tels que les lamines A/C ou l'émerine
- (iii) Des marqueurs cytoplasmiques tels que la desmine ;
- (iv) Des facteurs de transcription tels que Pax3, Pax7, Myf5 ou MyoD (19).

Il est à noter que leur profil d'expression varie en fonction de l'état fonctionnel de la cellule souche musculaire. Le marqueur Pax7 (*Paired box 7*) est reporté par de nombreuses études comme le marqueur le plus utilisé et le plus fiable. Son paralogue, Pax3, n'est exprimé qu'à l'âge adulte et dans certains groupes de muscles (20). Pax7 joue un rôle crucial dans le maintien de la population de cellules souches post-natales (21). Ce marqueur est exprimé dans les cellules satellites à l'état quiescent mais également à l'état prolifératif (22). Les autres marqueurs montrent une expression qui peut varier selon les cellules satellites et selon les stades du cycle cellulaire.

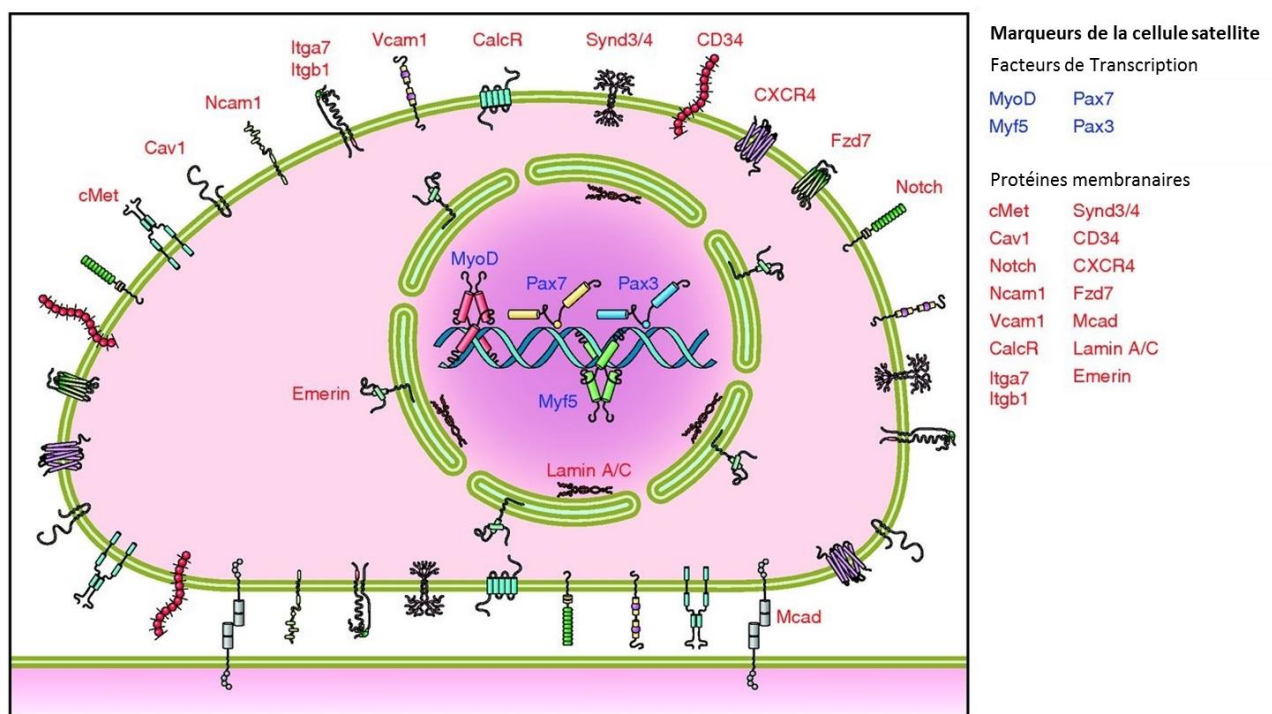


Figure 5. Localisation des marqueurs exprimés par les cellules satellites dans le modèle murin.

De nombreuses protéines sont exprimées par les cellules satellites et ont été utilisées comme marqueurs pour les distinguer des autres types cellulaires environnants dans le muscle squelettique. En raison de l'hétérogénéité des populations de cellules satellites, il est peu probable que tous ces marqueurs soient exprimés dans une cellule satellite donnée à un moment donné. Cette figure résume cependant la localisation cellulaire des marqueurs utilisés pour identifier les cellules satellites. Modifié d'après Yin *et al.* 2013 (19).

1.6.1.4 Capacité d'auto-renouvellement : fonction et mécanisme

Comme évoqué précédemment, les cellules satellites jouent un rôle crucial dans la croissance post-natale du muscle et dans la régénération musculaire après un dommage. A l'état quiescent et en réponse à des stimuli variés (blessures, exercices musculaires), elles peuvent s'activer pour reprendre le cycle cellulaire afin de générer des myoblastes capables de fusionner pour donner de nouveaux myonuclei ou de nouvelles fibres musculaires en cas de régénération. De plus, cette capacité de régénération musculaire est conservée même en cas de dommages musculaires répétés, témoin d'une capacité d'autorenouvellement des cellules musculaires.

Les cellules quiescentes expriment plusieurs marqueurs tels que Pax7, M-Cadhérine et CD34. MyoD est rapidement exprimé pendant l'activation des cellules satellites *in vivo* et *in vitro* (en culture, toutes les cellules satellites expriment MyoD après 24h de culture). Après une phase de prolifération, les cellules satellites deviennent des myoblastes positifs pour les marqueurs Pax7 et MyoD. La plupart perdent ensuite le marqueur Pax7 tout en maintenant l'expression de MyoD. Elles vont alors progressivement entrer dans le phénomène de différenciation. Cependant, certaines cellules vont quant-à-elles éteindre l'expression de MyoD tout en maintenant celle de Pax7 pour finalement quitter le cycle cellulaire. Ces cellules vont reprendre l'expression de marqueurs caractéristiques de la quiescence tels que le sphingomyéline (23) (Figure 6).

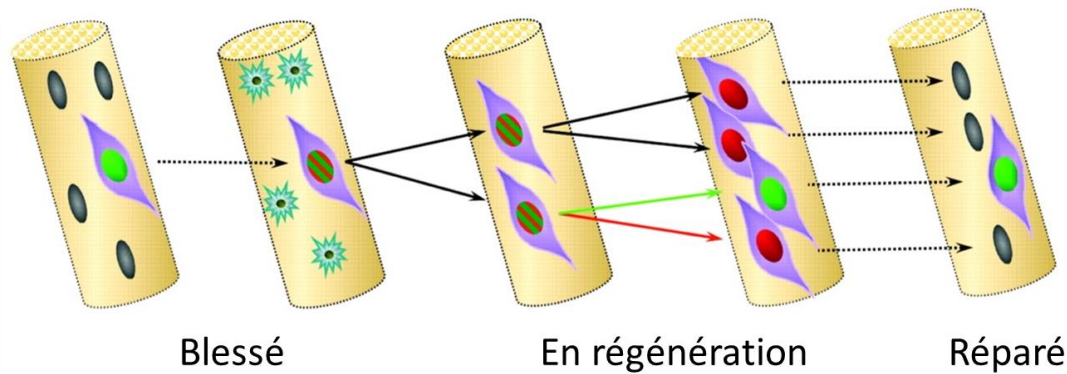


Figure 6. Les cellules satellites ont une capacité d'auto-renouvellement.

Les cellules satellites quiescentes Pax7-positives (noyau vert) co-expriment MyoD (noyau vert et rouge) lorsqu'elles sont activées à la suite de lésions musculaires. Après avoir proliféré en tant que myoblastes dérivés de cellules satellites Pax7 positif et MyoD positif, la plupart des cellules régulent négativement Pax7, maintiennent l'expression de MyoD (noyau rouge) et se différencient pour remplacer les myonuclei perdus (noir). Chez d'autres descendants de cellules satellites, toutefois, l'expression de MyoD est perdue et l'expression de Pax7 est maintenue (noyau vert) lorsque la cellule se renouvelle d'elle-même. Modifié d'après Zammit, 2008 (23).

1.6.1.5 Activation, prolifération et différenciation

En conditions normales, chez un individu sain et en l'absence de blessures ou d'efforts intenses, les cellules satellites sont quiescentes. Elles sont donc en phase G₀ et ne sont pas engagées dans le cycle cellulaire (24).

En réponse à un dommage musculaire, les cellules satellites vont exprimer MyoD puis Ki67. Ces cellules MyoD+ Ki67+ vont proliférer afin de donner un nombre important de myoblastes. Après cette étape de prolifération, les myoblastes vont ensuite exprimer la myogénine, facteur de transcription, et réprimer l'expression de Pax7 pour entrer dans le processus de différenciation. On parle alors de myoblastes « engagés » (ou « *committed myoblasts* » en anglais). L'expression de la myogénine va alors permettre la fusion des myoblastes entre eux pour former des myotubes multinucléés. Les mécanismes moléculaires sous-jacents à la fusion des myoblastes restent obscurs mais, deux facteurs (myomaker and myomixer) ont été récemment identifiés comme cruciaux pour cette étape (Figure 7 et Figure 8).

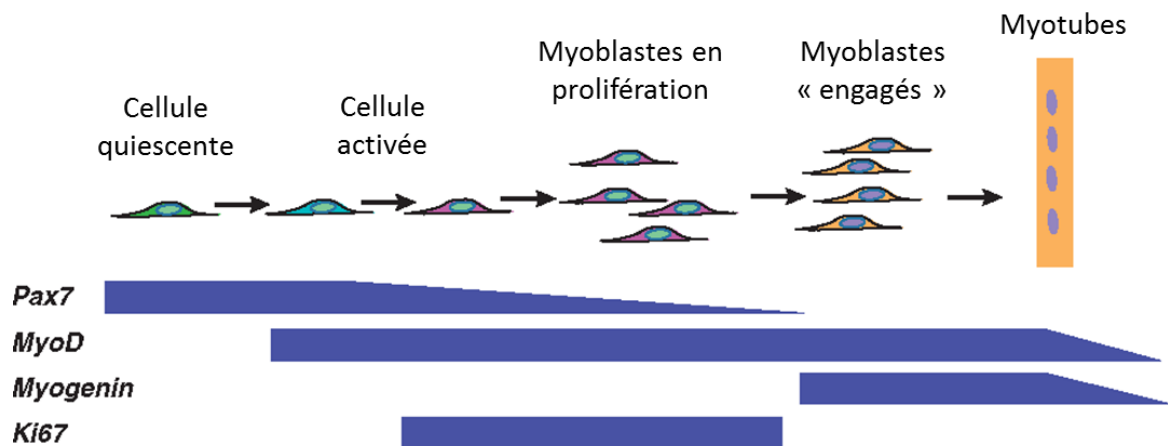


Figure 7. Représentation schématique des facteurs exprimés au cours de la différenciation musculaire.

Les cellules souches musculaires quiescentes sont positives pour Pax7, CalcR et M-cad. Les cellules souches musculaires activées perdent l'expression de CalcR et commencent à exprimer MyoD. Ensuite, les cellules souches musculaires expriment Ki67 et lancent la division cellulaire. Les myoblastes engagés perdent l'expression de Pax7 et expriment la myogénine. Les cellules positives à la myogénine fusionnent les unes avec les autres pour former des myotubes multinucléés. Modifié d'après Fukada, 2018 (25).

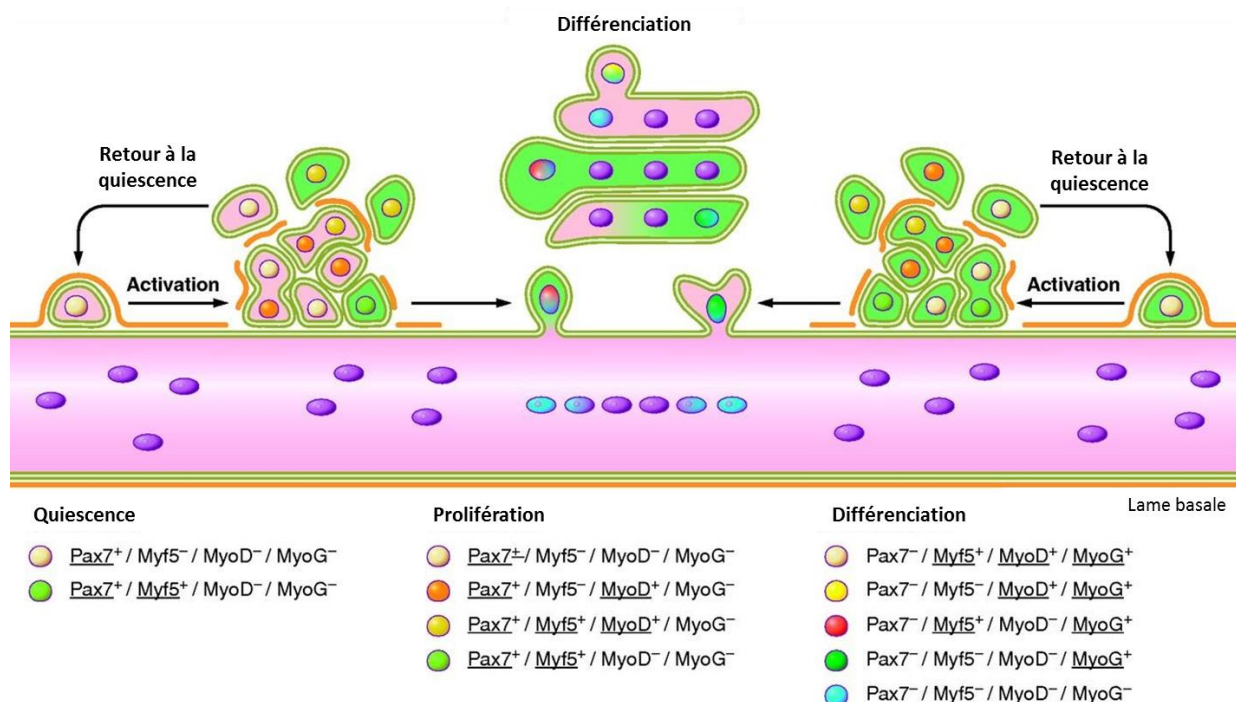


Figure 8. Cinétique d'expression des facteurs de transcription myogéniques au cours de l'activation, de la différenciation et de la fusion des cellules satellites.

Le programme myogénique est orchestré par des facteurs de transcription clés qui dictent la progression de la quiescence, de l'activation, de la prolifération, de la différenciation et de l'autorenouvellement des cellules satellites. Cela se traduit par la transformation de cellules satellites individuelles en une myofibre contractile. Au départ, les cellules satellites sont au repos sur le plan mitotique (phase G₀) et résident dans une niche sublaminare. Les cellules satellites au repos sont caractérisées par l'expression de Pax7 et de Myf5. Les dommages causés à l'environnement entourant les cellules satellites entraînent la détérioration de la lame basale et leur sortie de l'état de repos (activation de la cellule satellite). Les cellules satellites en prolifération et leur descendance sont souvent appelées cellules précurseurs myogéniques (MPC) ou myoblastes adultes. Les myoblastes adultes expriment les facteurs de transcription myogéniques MyoD et Myf5. Après la prolifération, les myoblastes adultes commencent à se différencier en régulant négativement Pax7. L'initiation de la différenciation et de la fusion terminale commence par l'expression de myogénine, qui, de concert avec MyoD, activera les gènes structurels et contractiles propres au muscle. Pendant la régénération, les cellules satellites activées ont la capacité de retourner au repos pour maintenir le pool de cellules satellite. Cette capacité est essentielle pour l'intégrité musculaire à long terme. Modifié d'après Zammit, 2008 (23).

1.6.2 Implication des cellules satellites dans les maladies neuromusculaires

Les pathologies du muscle squelettique peuvent être divisées grossièrement en deux catégories (Figure 9

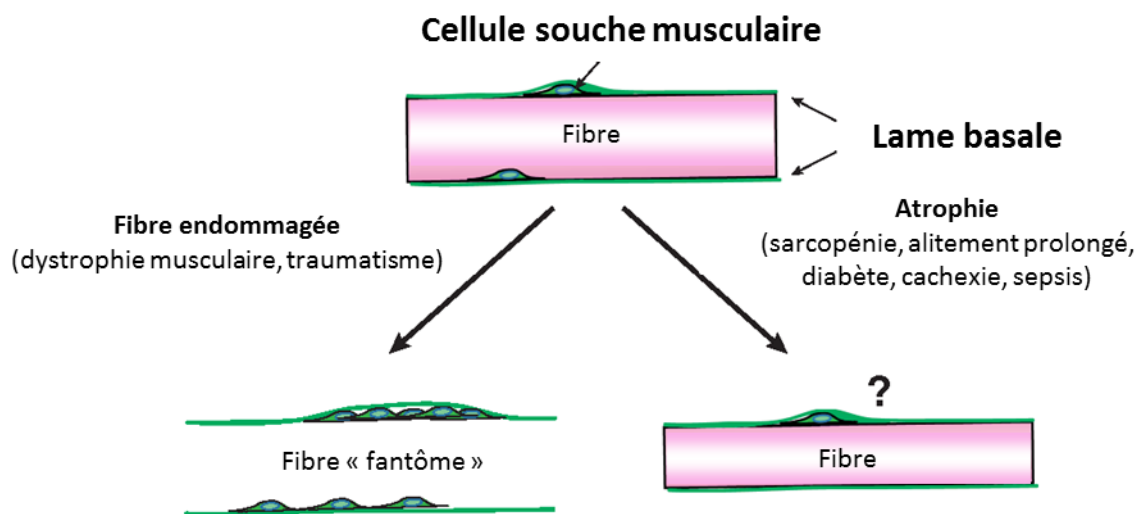


Figure 9) :

- (i) Celles qui font suite à un dommage musculaire ou à une blessure
- (ii) Celles qui ne font pas suite à ce type d'altérations musculaires.

Ainsi, on trouve des signes de dommages musculaires dans la plupart des dystrophies musculaires. Les cellules satellites jouent alors un rôle central dans la progression de la pathologie (25).

Comme décrit précédemment, le rôle central des cellules satellites pour la régénération musculaire est largement accepté.

Dans un modèle de lésion aiguë, les restes de lame basale du muscle lésé jouent un rôle crucial dans l'activation, la prolifération et la différenciation des cellules satellites. Ces restes sont souvent qualifiés de « fibres fantômes » (« *ghost fibres* » en anglais) dans la littérature. Ainsi la capacité de régénération musculaire semble dépendre fortement de

ces «fibres fantômes». Une des bases de ce concept est que le nombre de noyaux centraux diffère entre les souris *mdx* (un modèle de dystrophie musculaire de Duchenne) et les souris *dy2J/dy2J* (un modèle de dystrophie musculaire congénitale de type 1A). Les souris *mdx* manquent de dystrophine, une partie du complexe protéique associé à la dystrophine situé dans le sarcolemme. La lame basale reste similaire à celle du modèle de lésion aiguë. Les souris *dy2J/dy2J* ont une mutation dans la laminine $\alpha 2$, un composant de la lame basale. Les souris *mdx* ont 50 à 70% de fibres musculaires avec des noyaux centraux dans les muscles tibialis antérieur et gastrocnémien. D'autre part, on trouve, chez les souris *dy2J/dy2J*, seulement 10% de fibres musculaires avec des noyaux centraux dans les muscles tibialis antérieur et gastrocnémien. Par conséquent, le nombre moins élevé de myonoyaux centraux observés chez les souris *dy2J/dy2J* indique la capacité de régénération plus faible des cellules satellites de souris déficientes en laminine $\alpha 2$ dans un environnement de lame basale incomplète (25).

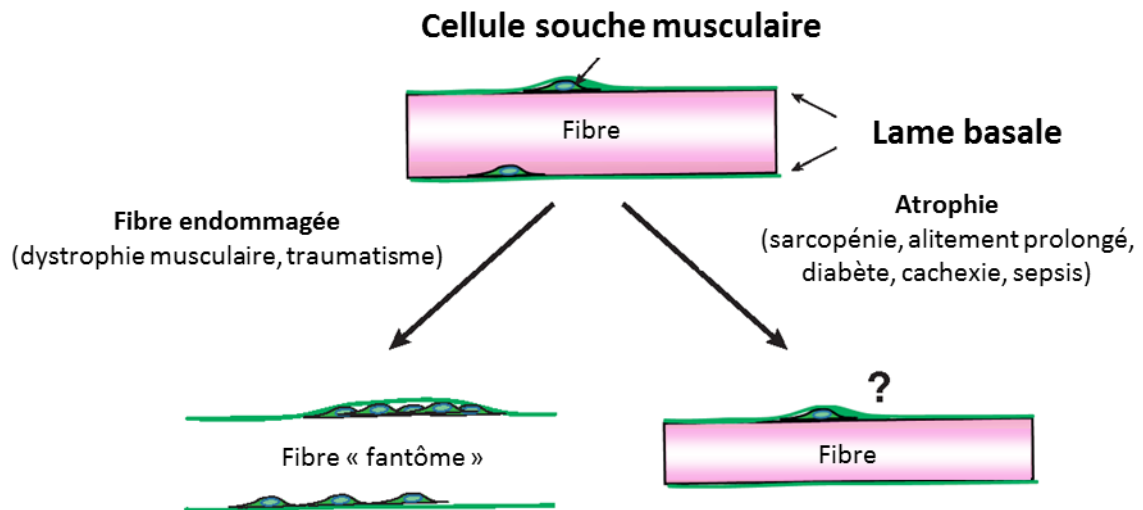


Figure 9. Les pathologies musculaires peuvent être divisées en deux groupes.

Dans les dystrophies musculaires ou les traumatismes, les myofibres endommagées sont éliminées par infiltration de macrophages et les cellules souches musculaires prolifèrent sous les restes de la lame basale. Dans l'atrophie liée à la sarcopénie ou à un alitement prolongé, le rôle de la cellule souche musculaire dont la genèse et dans le développement de la pathologie reste controversé. Modifié d'après Fukada, 2018 (25).

2 Les lamines

2.1 L'enveloppe nucléaire

2.1.1 Découverte et structure générale de l'enveloppe nucléaire

La présence d'un organite spécifique renfermant l'information génétique, appelé « noyau », est une des principales différences entre les procaryotes et les eucaryotes. Dans la plupart des cellules eucaryotes, le noyau est séparé du cytoplasme par une barrière régulant finement les échanges entre l'intérieur et l'extérieur du noyau : l'enveloppe nucléaire (26). Elle permet de séparer le matériel nucléaire du reste de la cellule et contient un très grand nombre de protéines impliquées notamment dans l'organisation de la chromatine et dans la régulation de l'expression des gènes (27). Cette régulation passe d'abord par la compartimentation de la cellule et la séparation physique entre les étapes nucléaires de transcription et de maturation de l'ARN messager. La machinerie traductionnelle cytoplasmique permet, quant à elle, la synthèse des protéines à partir de l'ARN messager mature (28).

Bien que l'existence d'une enveloppe nucléaire ait été suggérée il y a plus d'un siècle grâce à des expériences de micromanipulation sur des cellules animales et végétales (29), sa structure précise n'a été décrite que plusieurs décennies plus tard grâce à l'émergence de la microscopie électronique (30). Ainsi, l'enveloppe nucléaire est une bicouche lipidique constituée d'une couche externe, appelée « membrane nucléaire externe » ou « *outer nuclear membrane* » (ONM), et d'une couche interne, appelée « membrane nucléaire interne » ou « *inner nuclear membrane* » (INM). Ces deux couches délimitent un espace appelé « espace périnucléaire » en continuité avec la lumière du réticulum endoplasmique (31). Elles fusionnent au niveau des pores nucléaires (32).

2.1.2 Composition de l'enveloppe nucléaire

2.1.2.1 La membrane nucléaire externe ou « *outer nuclear membrane* » (ONM)

La membrane nucléaire externe est en continuité avec le réticulum endoplasmique, partageant ainsi des caractéristiques fonctionnelles et structurales. Malgré cette continuité et cette similarité, certaines protéines se retrouvent enrichies au niveau de la membrane nucléaire externe et absentes du réticulum endoplasmique (33). Ces protéines

font un lien entre le cytosquelette, le nucléosquelette et la membrane nucléaire interne. Elles appartiennent au complexe LINC pour « *Linker of nucleoskeleton to cytoskeleton* » et assurent notamment le maintien de l'architecture nucléaire (31,34) (Figure 10).

2.1.2.2 La membrane nucléaire interne ou « *inner nuclear membrane* » (INM)

La membrane nucléaire interne interagit avec le nucléoplasme grâce à un large panel de protéines. À ce jour, plus d'une centaine de protéines, enchâssées dans la membrane nucléaire interne, ont été décrites comme LAP2 (*lamina-associated polypeptide 2*), l'émerine et MAN1 appartenant à la famille des protéines à domaine LEM (31,35).

Les protéines de la membrane nucléaire interne jouent un rôle crucial dans l'organisation et le maintien de l'architecture nucléaire, dans la mécanotransduction, dans le mouvement et la migration nucléaire, dans l'expression des gènes et dans la régulation de leur expression ou encore dans l'organisation de voies de signalisation (36). Le bon fonctionnement de cette membrane est en partie dépendante de protéines dites « d'échafaudage » ou « de soutien » que sont les lamines nucléaires. Ce réseau de protéines d'une épaisseur de 10 nm environ est un réseau de filaments intermédiaires constitué majoritairement des lamines de type A et B qui tapisse la surface interne de l'enveloppe nucléaire.

2.1.2.3 Le complexe du pore nucléaire ou « *nuclear-pore complexe* » (NPC)

Les membranes nucléaires internes et externes fusionnent au niveau de domaines spécifiques de l'enveloppe nucléaire, domaines où résident les complexes du pore nucléaire. Ces complexes sont probablement les complexes protéiques cellulaires les plus gros connus chez l'Homme (environ 125 000 kDa). L'ensemble du complexe forme un cylindre d'un diamètre externe de 120 nm environ et d'une hauteur de 50 nm environ. Il est percé d'un pore ajustable de 40 à 60 nm de diamètre. La majorité des protéines formant le pore appartient à la famille des nucléoporines. Ce pore est responsable de la régulation des échanges entre le noyau et le cytoplasme.

Le Complexe LINC normal et ses interacteurs

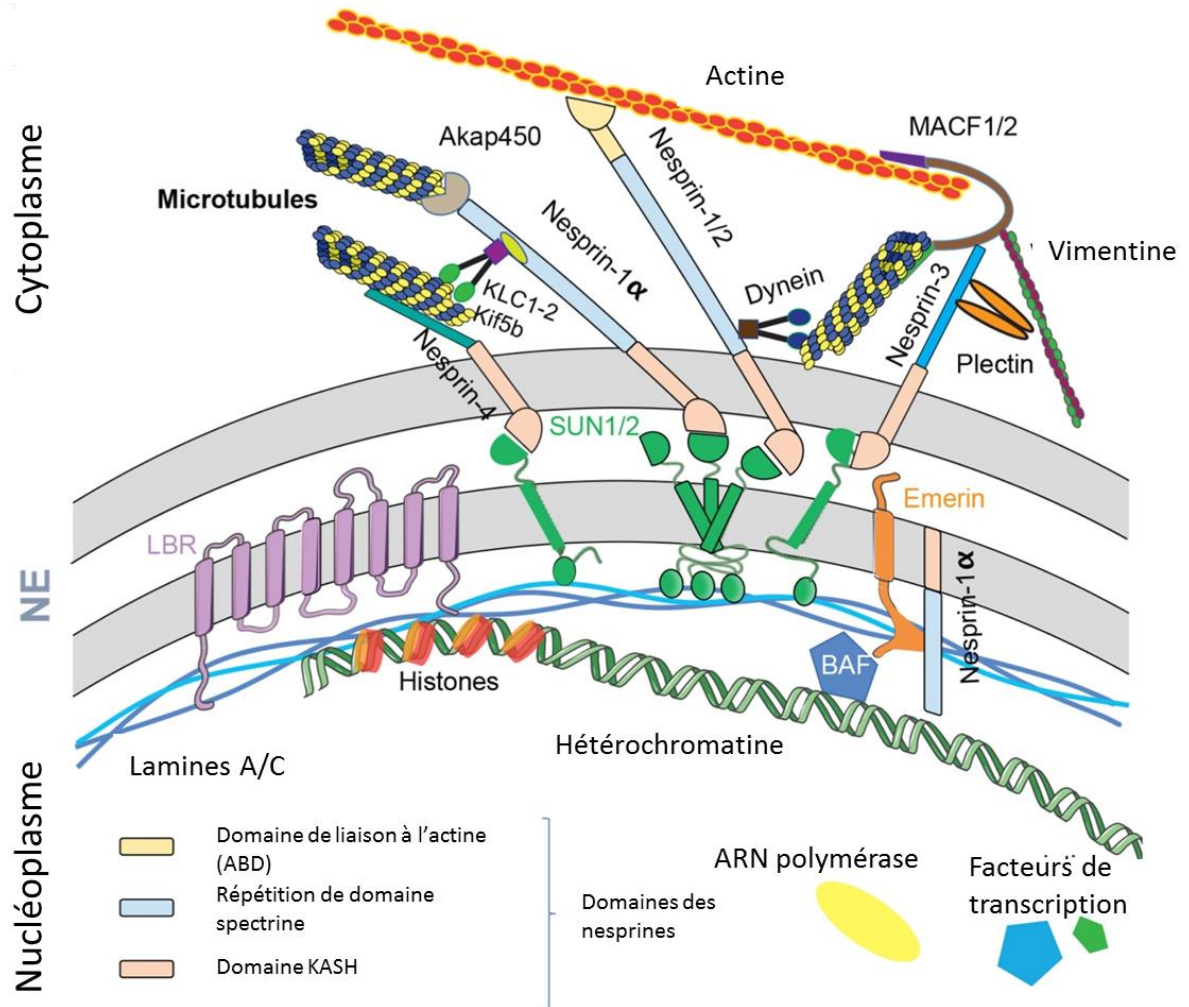


Figure 10. Structure de l'enveloppe nucléaire.

Les nesprines remplissent plusieurs fonctions au niveau de l'enveloppe nucléaire externe mais également au niveau de l'enveloppe nucléaire interne. Les isoformes longues des nesprines participent au niveau de l'ONM au pont reliant le noyau au cytosquelette d'actine et les isoformes plus courtes, telles que la nesprin-1a, interagissent via Akap450 et KLC-1/2 avec les microtubules. Dans le même temps, des isoformes plus petites interagissent avec le nucléosquelette au niveau de l'INM. Modifié d'après Janin *et al.* 2018 (37).

2.2 La lamina nucléaire

2.2.1 Description

La lamina nucléaire a été mise en évidence par microscopie électronique d'abord chez les amibes en 1956 (38). En 1966, Donald W. Fawcett décrit, dans des cellules de vertébrés, un liseré sombre, dense aux électrons, entre la membrane nucléaire interne et la chromatine, appelé « *fibrous lamina* » (39).

La lamina nucléaire appartient à la matrice nucléaire, structure nucléaire insoluble par une extraction en sel, et est constituée de trois protéines de la membrane nucléaire interne (appelées lamines A, B et C) dont le clonage de l'ADNc a permis de montrer qu'elles appartiennent aux filaments intermédiaires de classe V (27,40-42).

Une localisation nucléoplasmique de la lamina nucléaire a également été rapportée. Ces structures, en foyers ou plus diffuses, sont des domaines d'interaction avec des facteurs de transcription.

L'ensemble des protéines appartenant à la famille des filaments intermédiaires présente une parenté structurale (43):

- Une région centrale très conservée, également appelée « *coiled coil rod domain* », « *rod domain* » ou encore « domaine en superhélice α ». Ce domaine inclut quatre segments en hélice α (1A, 1B, 2A et 2B) liés entre eux par des *linkers* (L1, L12 et L2) ;
- Deux régions adjacentes, N et C terminales, globulaires. Ces régions sont variables en taille et en composition en acides aminés.

2.2.2 Les lamines de type A

Les lamines de type A sont codées par le gène *LMNA* localisé sur le bras long du chromosome 1 (locus 1q21.2-q21.3) (44). Ce gène est long de 24 kb et est constitué de 12 exons (45). Chez les vertébrés, elles se composent de deux isoformes majeures : la lamine A et la lamine C. On trouve de nombreuses autres isoformes mineures dont les deux principales sont la lamine A Δ 10 exprimée dans les cellules somatiques (46) et, la lamine C2 exprimée dans les cellules germinales (47).

Chez l'Homme, ces isoformes sont obtenues par épissage alternatif du transcrit primaire issu de la transcription du gène *LMNA* (45).

Les lamines A et C sont identiques jusqu'au codon 566. La lamine A subit un épissage grâce à la reconnaissance d'un site donneur situé 90 paires de bases (pb) en aval du début de l'exon 10. La lamine C ne subit pas cet épissage, comporte cinq acides aminés spécifiques en C-terminal, mais est dépourvue des régions codées par les exons 11 et 12 de par la présence d'un codon stop 18 pbs en aval. Ainsi, le précurseur de la lamine A (ou prélamine A) est constitué de 664 acides aminés alors que la lamine C ne comporte que 572 acides aminés (48)(49).

La lamine C2 a la même structure que la lamine C au niveau de sa région C-terminale. Son extrémité N-terminale est différente de toutes les autres isoformes des lamines de type A car codée par un exon alternatif 1C2 localisé dans le premier exon du gène *LMNA* (47). Enfin, la lamine AΔ10 diffère de la lamine A par l'absence de l'exon 10 (46).

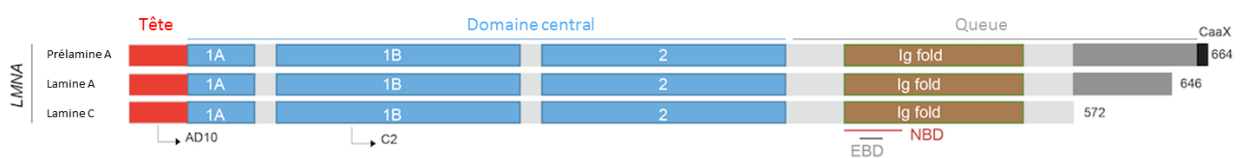


Figure 11. Les principales isoformes de lamines A sont produites par épissage alternatif du gène *LMNA*.

EBD : emerlin binding domain; NBD, nesprin binding domain. Modifié d'après Janin *et al.* 2018 (37).

2.2.3 Les lamines de type B

Les lamines de type B se trouvent dans toutes les cellules et se composent de deux protéines codées par deux gènes distincts : la lamine B1, codée par le gène *LMNB1*, et la lamine B2, codée par gène *LMNB2*, situés respectivement sur le chromosome 5q23.2 et 19p13.3 chez l'Homme (50)(51). Le gène *LMNB2* code également pour une seconde isoforme minoritaire, la lamine B3 (52).

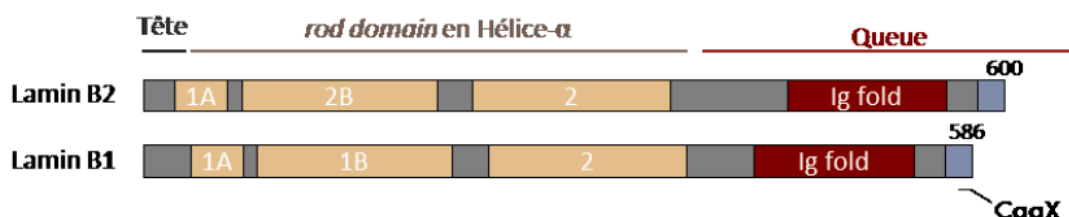


Figure 12. Les lamines de types B.

2.2.4 Structure des lamines

2.2.4.1 Structure primaire

Les filaments intermédiaires partagent une structure dite « tripartite » qui consiste en un domaine central en superhélice α (également appelé « *rod domain* ») très conservé avec, de chaque côté, une tête et une queue, domaines non hélicoïdaux, qui sont très variables (53). Les lamines nucléaires s'assemblent en dimère grâce à leur domaine central qui comprend trois domaines *coiled-coil* séparés par des régions de liaison flexibles (*flexible linker regions*). Les lamines, de par leur phylogénie avec les filaments intermédiaires cytoplasmiques, se caractérisent par la présence de 6 répétitions d'heptades supplémentaires (soit 42 acides aminés) dans le domaine coil 1B et d'une région NLS (« signal de localisation nucléaire » ou « *nuclear localization signal* » en anglais) par rapport aux filaments intermédiaires cytoplasmiques des vertébrés (cf. Figure 13) (40,41,53,54).

Le NLS est un motif de cinq résidus dont la majorité est basique : Lys-(Lys ou Arg)-(Lys ou Arg)-(Lys ou Arg)-(Ile ou Leu)-(Glu ou Asp). Ce motif est crucial pour l'import nucléaire des protéines. Concernant les lamines A et B, les domaines NLS situés dans la partie carboxy-terminale de la protéine sont respectivement Lys-Lys-Arg-Lys et Lys-Arg-Lys-Arg (cf. Figure 13) (55).

Près du NLS, on trouve, dans la partie carboxyterminale, un domaine *immunoglobulin-like* (Ig-fold) connu pour être impliqué dans des interactions ADN-protéine, phospholipide-protéine ou protéine-protéine (cf. Figure 13). Ce domaine très conservé est également retrouvé dans de nombreuses autres protéines. Dans le cas des lamines, ce domaine permet notamment la liaison au PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*), clamp permettant le maintien de l'ADN polymérase sur le brin d'ADN lors de la réplication (56).

Pour la majorité des lamines (A, B1, B2 et AΔ10) se trouve également, dans cette partie C-terminale, un motif CAAX (Cystéine – acide aminé aliphatique – acide-aminé aliphatique – any) (cf. Figure 13). Les lamines C et C2 en sont dépourvus (cf. 2.2.2 Les lamines de type A). Ce motif sera farnésylé transitoirement chez les lamines A ou de façon permanente chez les lamines B lors de la maturation.

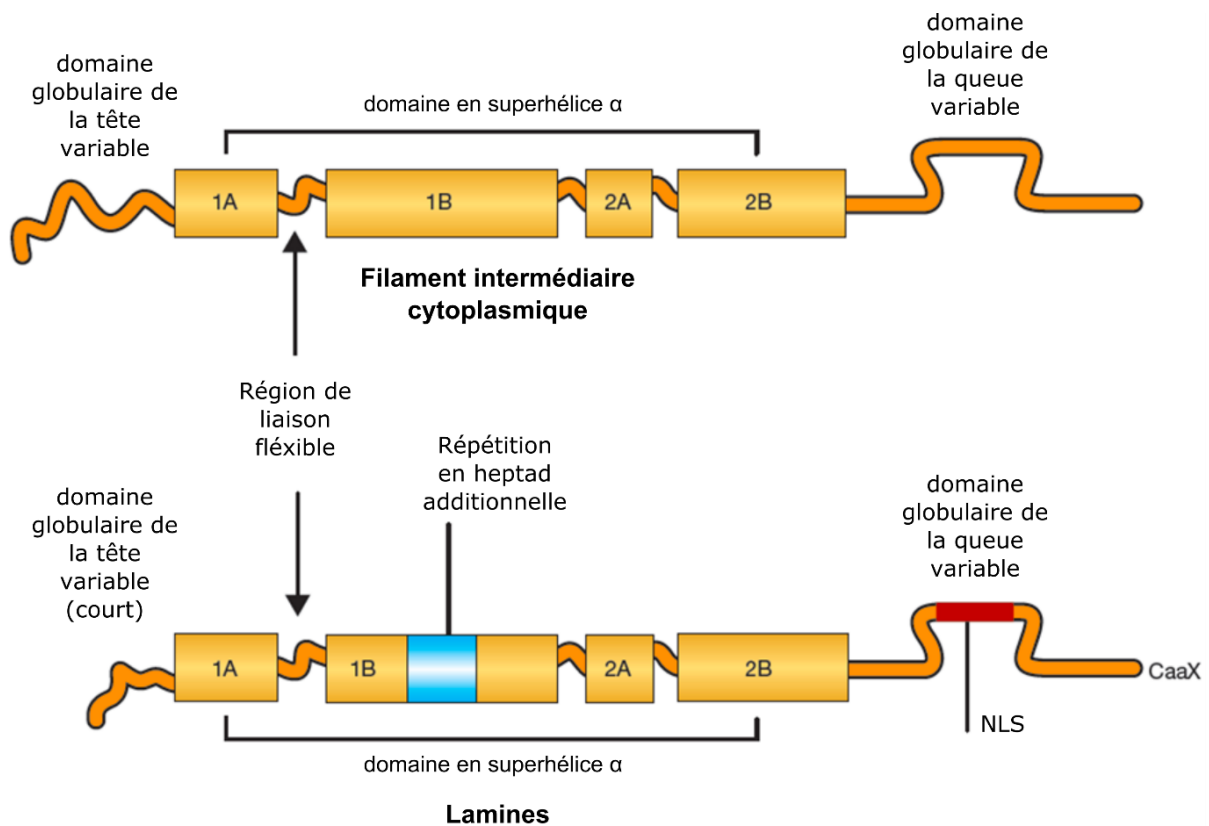


Figure 13. Comparaison de la structure générale des lamines à celle des filaments intermédiaires cytoplasmiques des vertébrés.

Les filaments intermédiaires ont une structure tertiaire conservée constituée d'un domaine globulaire variable, d'un domaine de dimérisation constitué d'enroulement de spires hélicoïdales α composé de quatre bobines enroulées, basées sur des répétitions heptad, interrompues par des domaines de liaison souples et une queue globulaire variable. Les domaines en spirale enroulée sont nommés respectivement 1A, 1B, 2A et 2B. Les régions de liaison flexible sont non hélicoïdales. Les différences majeures entre les filaments intermédiaires cytoplasmiques des vertébrés et les lamines sont : premièrement, les domaines de la tête sont très courts (environ 33 acides aminés) ; deuxièmement, il y a une extension de six heptades de la bobine 1B ; et troisièmement, le domaine de la queue globulaire est généralement caractérisé par la possession d'une séquence signal de localisation nucléaire et d'un site de carboxyméthylation, de farnésylation et de clivage protéolytique (CaaX). D'après Hutchison and Worman, 2004 (54).

2.2.4.2 Structures secondaire et tertiaire des lamines

Le domaine globulaire C-terminal des lamines peut être facilement visualisé en microscopie électronique grâce à des échantillons de protéines purifiées s'associant *in vitro* en oligomères (cf. Figure 14) (57).

En 2002, il a été montré par deux équipes, par spectroscopie RMN (58) ou par cristallographie (59), que la structure *immunoglobulin-like* (Ig-fold) comprise entre les résidus 411 à 533 se présentait sous la forme de deux feuillets β constitués chacun de quatre et cinq brins β . Les axes de ces deux feuillets sont décalés de 45° l'un par rapport à l'autre.

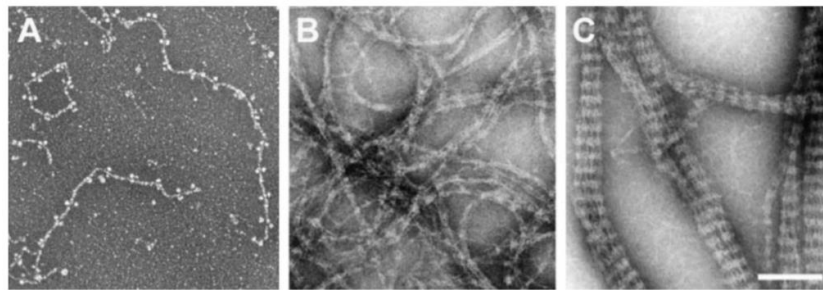


Figure 14. Observation en microscopie électronique de filaments de lamines A/C de foie de rat.

Modifié d'après Herrmann and Aebi, 2004 (57).

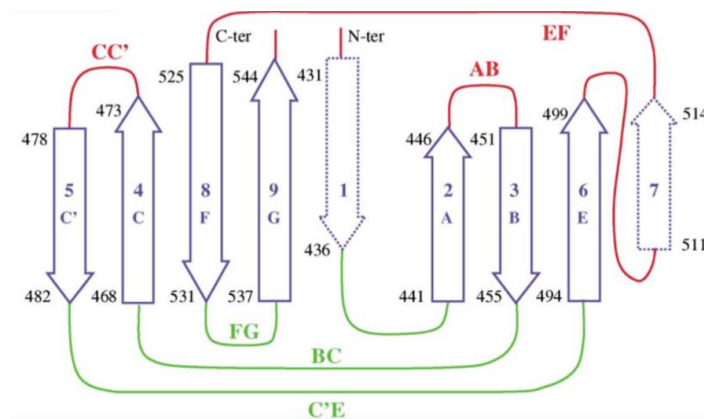


Figure 15. Structure de l'Ig-fold des lamines.

Les brins β appartenant aux deux feuilles β sont affichés sous forme de flèches bleues. Leurs limites sont indiquées à côté des extrémités des flèches. Les flèches bleues correspondent aux brins β formant le pli classique de l'Ig-fold, tandis que les flèches bleues en pointillés représentent les brins β caractéristiques des lamines. Les boucles situées du côté N-terminal du sandwich β sont colorées en rouge et les boucles situées du côté opposé, en vert. Modifié d'après Krimm *et al.* 2002 (58).

2.2.5 Assemblage des lamines

La première étape de l'assemblage des lamines est la formation de dimères par l'enroulement des deux hélices α de façon parallèle. Ces dimères vont ensuite s'assembler longitudinalement par un recouvrement partiel entre une partie de l'extrémité carboxyterminale d'un dimère et l'extrémité aminoternale du dimère voisin. Ce second niveau d'assemblage permet de former des polymères. L'étape suivante permet de former les protofilaments, résultant de l'association antiparallèle de deux polymères de lamines (cf. Figure 16) (51).

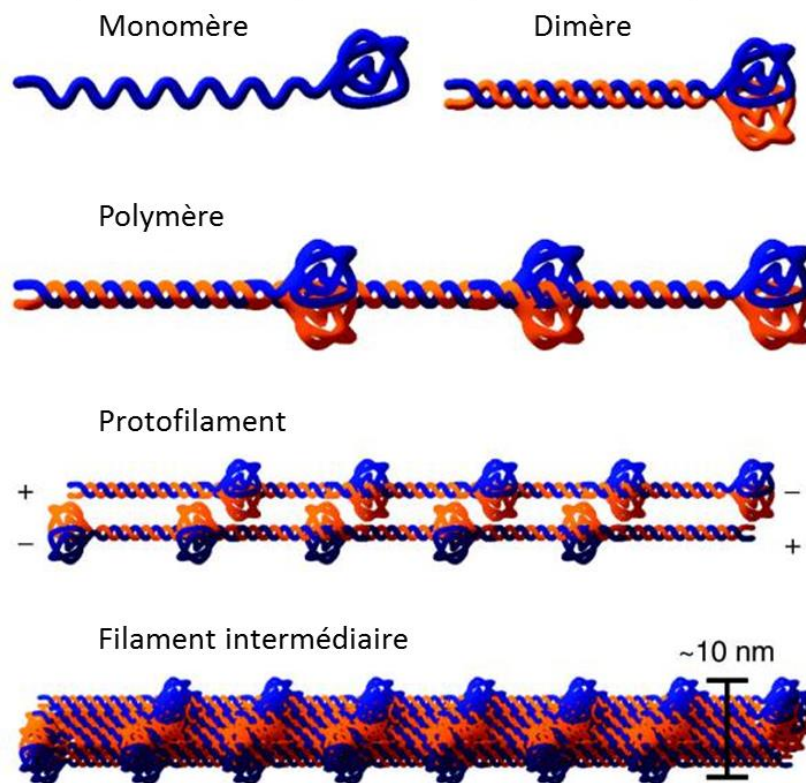


Figure 16. Schéma de l'assemblage des lamines.

Les dimères de lamines se forment à partir de monomères qui s'associent parallèlement tête à tête pour former une bobine enroulée au niveau du domaine α -hélicoïdal central. Les polymères de lamines s'assemblent ensuite par association de dimères de manière polaire tête contre queue par un chevauchement échelonné de 2 à 4 nm au niveau des extrémités amino et carboxy-terminales des domaines rods. Les protofilaments sont finalement produits par association anti-parallèle de deux polymères de lamines. Entre trois et quatre protofilaments s'associent latéralement pour former un filament intermédiaire d'environ 10 nm de diamètre. Modifié d'après Dittmer and Misteli, 2011 (51).

Dans les cellules exprimant à la fois les deux types de lamines, des analyses de FRET dans des cellules HeLa ont montré une formation d'homodimères puis d'homopolymères de lamines A ou de lamines B mais capables d'interagir entre eux à la périphérie nucléaire (60).

2.2.6 Expression des lamines au cours du développement

Dans les cellules somatiques de mammifères, les lamines de type A sont exprimées de façon différentielle au cours du développement. Elles sont exprimées dans la majorité des cellules différenciées et dans les cellules souches adultes dont notamment les cellules souches musculaire. Elles sont cependant absentes des autres types de cellules souches (cellules souches embryonnaires par exemple). Les lamines de type B, quant à elles, sont ubiquitaires (61).

Dans les cellules germinales de mammifère et dans les pronucléi, seules deux isoformes sont exprimées : la lamine B3 et la lamine C2 respectivement. Ces deux isoformes sont spécifiques et ne sont donc pas exprimées dans d'autres types cellulaires (52,62).

L'expression des lamines dans les cellules souches embryonnaires est limitée aux lamines B1 et B2. Elles sont détectées juste avant la dérégulation du gène de pluripotence *Oct-3/4* et juste après l'activation de *SSEA-4* (*stage-specific embryonic antigen-4* ou antigène spécifique du stage embryonnaire 4). Cette cinétique d'expression après l'initiation de la différenciation cellulaire laisse supposer un rôle des lamines de type A dans le verrouillage du stade différencié (61).

2.2.7 Maturation des lamines

Le processus de maturation est spécifique des lamines A, les lamines C ne le subissent pas. Cette absence de maturation est due à la différence de structure des lamines A et C. Malgré leur identité de structure pour leurs 566 premiers acides-aminés, les lamines A et C diffèrent par leur extrémité C-terminale. La prélamine A, composée de 664 acides aminés, est le précurseur de la lamine A et contient un motif CAAX en C-terminal. Ce motif est spécifique de la prélamine A, il n'est pas retrouvé dans la lamine C qui ne peut alors subir ce processus de maturation (31).

Cette maturation comprend quatre étapes (cf. Figure 17) :

- Le motif CaaX est d'abord farnésylé par la farnésyltransférase ;
- Le motif aaX est ensuite clivé par une protéase : FACE1/ZMSTE24 ou FACE2/RCE1 ;
- La cystéine Farnésylée est ensuite carboxyméthylée par l'isoprényl-cystéine-carboxy-méthyltransférase ou icmt ;
- Enfin, les 15 derniers acides aminés sont clivés par FACE1/ZMPSTE24. La lamine A mature ne contient donc plus que 646 acides aminés.

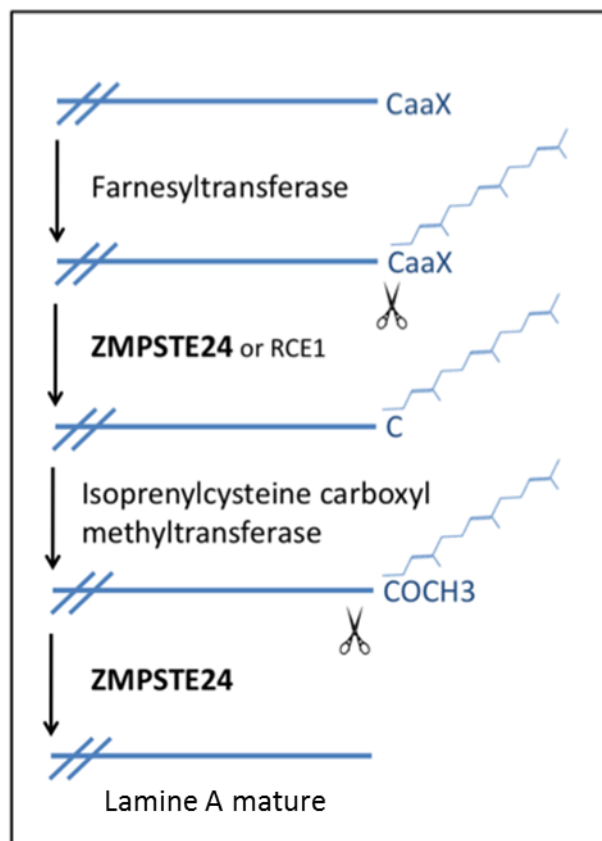


Figure 17. Processus de maturation des lamines de type A.

La maturation de la prélamine A est une succession de réactions enzymatiques conduisant à une forme mature de lamine A. La première étape est la farnésylation d'un résidu cystéine pour obtenir une forme farnésylée de prélamine. Par la suite, une protéase (ZMPSTE24 ou RCE1) coupe les résidus aaX de la queue C-terminale. Enfin, la protéase ZMPSTE24 coupe les 15 derniers résidus de l'extrémité C-terminale pour obtenir la lamine A mature. Modifié d'après Janin *et al*, 2017 (31).

Les trois premières étapes de ce processus de maturation concernent également les lamines de type B. La dernière étape de clivage n'a pas lieu pour ces dernières. Elles sont donc constitutivement farnésylées et carboxyméthylées.

Selon les études, cette maturation a lieu dans le cytoplasme et/ou dans le noyau des cellules en interphase. La présence des différentes enzymes de cette maturation dans le cytosol (farnésyltransférase) ou dans les membranes du réticulum endoplasmique (ZMPSTE24, RCE1 et l'icmt) supportent l'hypothèse d'une maturation cytoplasmique (31). Cependant, la découverte plus tardive de ZMPSTE24 et de l'icmt dans le noyau associée à des études cinétiques et de localisation de la prélamine A et de la lamine A supportent l'hypothèse d'une maturation nucléaire (63–65).

2.2.8 Import des lamines

Les protéines membranaires de l'INM sont reconnues et liées par l'importine $\alpha 16$ dès leur synthèse ribosomale (66,67). Ceci permet leur insertion dans la membrane du réticulum endoplasmique par glissement du complexe protéine-importine $\alpha 16$ le long de la membrane du réticulum et de l'ONM, qui est en continuité avec la membrane du réticulum endoplasmique puis passent par les pores nucléaires pour atteindre l'INM.

Cependant, les lamines ne sont pas des protéines transmembranaires enchâssées dans l'INM mais sont seulement associées à l'INM. Ainsi, le rôle de la séquence NLS des lamines de type A et B n'est pas encore clair : est-elle reconnue par l'importine $\alpha 16$? On sait cependant que, sans ce signal NLS, les lamines ne sont pas importées dans le noyau en interphase (68).

NON LIBRE DE DROIT

Figure 18. Modèle du rôle de l'importine $\alpha 16$ dans le trafic des protéines jusqu'à l'INM.

1. L'importine $\alpha 16$ (en rose) s'associe à la membrane du réticulum endoplasmique (ER). 2. L'importine $\alpha 16$ se lie à la protéine de l'INM pendant sa synthèse ribosomale. 3. L'importine $\alpha 16$ reste liée à la protéine de l'INM même après dissociation du ribosome. La protéine est donc enchâssée dans la membrane du RE. 4. Pendant le transit de la protéine du RE vers l'INM, deux hypothèses cohabitent : (gauche) le complexe interagit (directement ou non) avec des moteurs moléculaires pour apporter l'énergie nécessaire au mouvement dans le noyau ou (droite) l'importine $\alpha 16$ interagit avec des nucléoporines pour faciliter la translocation du complexe à travers les pores latéraux du NPC. Modifié d'après Saksena et al, 2006 (66).

2.2.9 Dynamique des lamines pendant le cycle cellulaire

En 2007, l'hypothèse que la division cellulaire promouvait un réarrangement de l'architecture de l'enveloppe nucléaire pour faciliter l'organisation de l'ADN a été formulée (69). Des expériences d'immunofluorescence ont montré la complexité du comportement des lamines nucléaires au cours du cycle cellulaire (70). Pendant l'interphase, la quantité, la localisation et l'architecture des lamines de type A et de type B sont stables (71). Au début de la mitose, lorsque la chromatine se condense pour former les chromosomes, l'enveloppe nucléaire se désintègre et les polymères de lamines se désassemblent en dimères. Ce désassemblage de l'enveloppe nucléaire nécessite l'activation de protéines à activité kinase et la phosphorylation de protéines de l'enveloppe nucléaire (72).

La dépolarisation des lamines commence dès le début de la prophase par leur phosphorylation par des protéines kinases comme CDK1 (*cyclin-dependant kinase 1*) ou PKC (*protein kinase C*). Les lamines A adoptent alors une distribution diffuse dans le nucléoplasme, témoin d'une intégrité de l'enveloppe nucléaire à cette étape. La disparition de l'enveloppe nucléaire arrive alors à la fin de la prophase. Les dimères de

lamines A vont ainsi diffuser dans le cytoplasme, les dimères de lamines B vont eux rester associés aux membranes du réticulum puis se fragmenteront (73). Pendant la métaphase, la majorité des lamines de type B est dépolymérisée et le fuseau mitotique est formé (74). Les lamines vont garder une localisation diffuse pendant la fin de la métaphase et le début de l'anaphase. Le ré-assemblage de la lamina nucléaire se produit en fin d'anaphase et en télophase (70) grâce à une déphosphorylation des lamines A/C par des phosphatases. Enfin, la cytokinèse terminera la mitose (75).

2.2.10 Modifications post-traductionnelles des lamines A

2.2.10.1 Phosphorylations

L'analyse de la structure primaire des lamines de type A montre 61 sites de phosphorylation. Un grand nombre d'entre eux sont localisés près du NLS. Ces sites peuvent être différemment utilisés pendant la mitose et/ou en interphase.

2.2.10.1.1 Pendant la mitose

Deux kinases jouent un rôle central pendant la mitose :

- La kinase cycline-dépendant (CDK1) peut phosphoryler différents résidus Serine situés de chaque côté du *rod domain* (Ser22, Ser392, Ser404 ou Ser406). La phosphorylation de ces résidus par CDK1 empêche la formation des polymères mais ne perturbe pas l'assemblage en dimères (76–80). La formation de l'homologue de la sérine 22 chez la drosophile (Ser37) augmente la solubilité des lamines et empêche leur interaction avec la chromatine *in vivo* (81).
- La famille de protéines des kinases C (PKC). Des études chez le zebrafish semblent montrer que la phosphorylation des lamines par les PKC serait une condition nécessaire au démasquage des sérines cibles de CDK1 (77,82,83).

2.2.10.1.2 En interphase

La phosphorylation des lamines de type A pendant l'interphase sur certains résidus est connue mais le rôle fonctionnel de ces modifications reste cependant mal compris.

Des mutations du gène *LMNA* affectant ces sites de phosphorylations sont par ailleurs associées à certaines pathologies. Des cas de dystrophie musculaire d'Emery-

Dreifuss ont été rapportés comme liés à une mutation de la sérine 404 en un acide aminé non phosphorylable (p.Ser404Ala) (84).

2.2.10.2 Glycosylation

La glycosylation des lamines est une notion connue depuis 1989 mais, son type, la O-GlcNAcylation, n'a été connue que plus tardivement (85). Elle est une modification réversible portant sur des résidus sérine ou thréonine et elle participe à la régulation de voies de signalisation, de la mitose ou de la transcription, en complément ou en compétition avec la phosphorylation (86). Bien que mise en évidence sur les résidus C-terminaux Ser612 et Thr643 dans des cellules HeLa en mitose (87) ou sur les résidus Ser611 (homologue murin de la Ser612 humaine) et Ser613 du cerveau de souris (88), l'implication fonctionnelle de cette modification n'est à ce jour pas connue.

2.2.10.3 Acétylation

D'abord découverte comme une modification post-traductionnelle des histones, il a ensuite été montré que de nombreuses autres protéines sont acétylées tant au niveau cytoplasmique (comme la tubuline) qu'au niveau nucléaire (comme les lamines) (89).

La structure primaire des lamines de type A montre huit sites d'acétylation répartis entre le *rod domain* (concerne les résidus Lysine 97, 108, 114, 270, 311 et 378), le NLS (Lys417) et l'*Ig-fold* (Lys 450). De la même façon, on trouve six sites d'acétylation dans la structure primaire des lamines B1 (les résidus Lysine 33, 123, 157, 181, 271 et 483) et quatre dans la structure primaire des lamines B2 (les résidus Lysine 47, 81, 393 et 520).

Les implications fonctionnelles précises de cette modification post-traductionnelle des lamines restent, à ce jour, obscures. L'hypothèse du rôle de la lamine acétylée dans l'accrochage de l'hétérochromatine à l'enveloppe nucléaire a été proposée (90).

2.2.10.4 SUMOylation

Les protéines SUMO (pour *small ubiquitin-like modifier*) se lient de façon covalente à des résidus lysines de protéines cibles (91). Ces modifications peuvent participer à la régulation de la localisation, de la fonction et des interactions avec des partenaires et ainsi

avoir des conséquences fonctionnelles sur de nombreuses voies de signalisation : import/export nucléaire, transcription, apoptose, régulation du cycle cellulaire ou encore stabilité des protéines (92). Les enzymes responsables de la fixation ou de la suppression des protéines SUMO sont principalement localisées au niveau de l'enveloppe nucléaire et du noyau (93,94).

Chez l'Homme, les lamines de type A sont modifiées par SUMO2 au niveau du résidu lysine 201. Cette SUMOylation est cruciale pour la localisation et la polymérisation de la lamine A puisque ces deux dernières sont particulièrement altérées par les mutations impactant ce résidu comme la p.Lys201Arg ou des résidus proches comme les mutations p.Glu203Gly ou p.Glu203Lys (95).

Les enzymes SUMO et SUMO1 peuvent également SUMOyler les lamines de type A en deux positions : au niveau du NLS (Lys420) et de *Ig-fold* (Lys486). Des mutations de ce dernier résidu, empêchant ainsi sa SUMOylation correcte, ont été décrites responsables de lipodystrophies (p.Lys486Asn) (96).

Enfin, dans des cellules HEK293, les lamines de type A sont également modifiées par SUMO3 et SUMO4 (97,98).

2.2.10.5 Ubiquitination

L'ubiquitine est une petite protéine de 8,5 kDa qui, comme les protéines SUMO, se lie de façon covalente à des résidus lysines de protéines cibles. Deux enzymes, E1 et E2, sont responsables de la préparation de l'ubiquitine pour le transfert, alors que l'enzyme E3 est responsable de la spécificité de la fixation de l'ubiquitine sur la protéine cible (99). La fixation d'une seule ubiquitine à une protéine cible peut être à l'origine d'une régulation de voies de signalisation ou de fonctions nucléaires. Alors que, une chaîne d'ubiquitine, formée grâce à la liaison d'une ubiquitine à une autre, est le témoin d'un « marquage » de la protéine pour une dégradation protéolytique (100).

La plupart des sites d'ubiquitination des lamines A/C, B1 et B2 est localisée dans le *rod domain* et pourrait influencer leur assemblage en polymères. Une mono ou une poly-ubiquitination des lamines A/C pourrait avoir des rôles centraux tant dans la régulation de leur fonction ou de leur localisation que dans la coordination spatiale et temporelle de voies de signalisation. Bien que leur rôle dans le renouvellement des lamines est admis, cet impact est encore très largement mal connu (101).

2.2.10.6 Oxydation

Les espèces réactives de l'oxygène (ROS), produites au cours du métabolisme de l'oxygène, peuvent réguler de nombreuses voies de signalisation et notamment la sénescence cellulaire (101). Des études réalisées sur des fibroblastes primaires cutanées humains ont montrées que des résidus cystéine de la queue de la lamine A peuvent être oxydés (Cys522, Cys588 et Cys591). La mutation simultanée de ces trois résidus en alanine est responsable d'une altération de l'architecture nucléaire avec des noyaux déformés et une sénescence des cellules lorsque ces dernières sont soumises à un stress oxydant. Une sénescence prématurée a également été rapportée dans des fibroblastes inactivés pour le gène *LMNA*. Ceci suggère que les lamines de type A jouent un rôle important dans la protection de la cellule contre le stress oxydant (102,103).

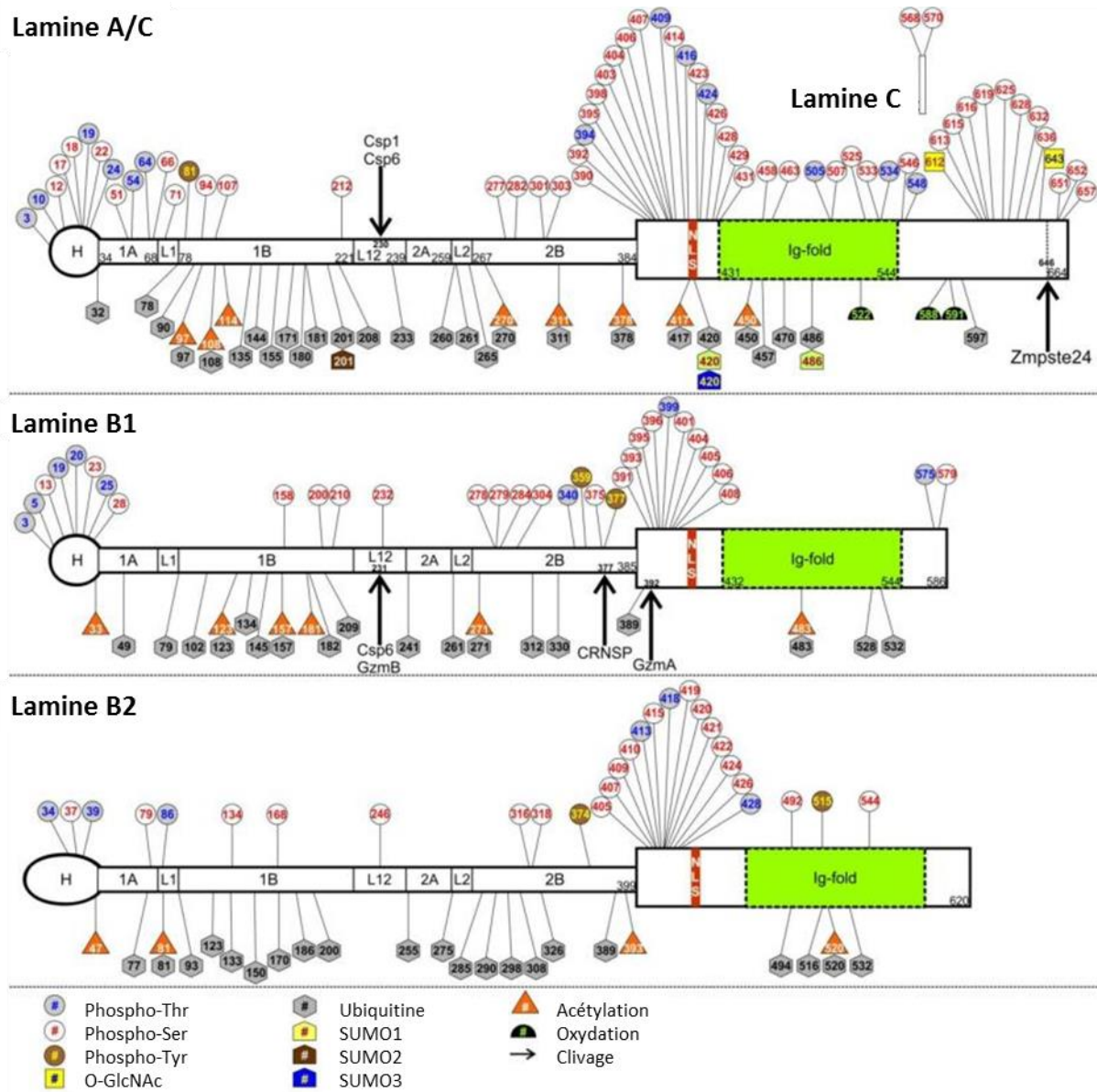


Figure 19. Représentation schématique des différentes modifications post-traductionnelles décrites des lamines humaines.

Schémas indiquant les résidus spécifiques modifiés post-traductionnellement par phosphorylation, acétylation, O-GlcNAcylation, SUMOylation, ubiquitylation ou oxydation. Les flèches indiquent les sites clivés par la protéase de maturation pré-laminaire A Zmpste24 ou les protéases apoptotiques Caspase 1 (Csp1), Caspase 6 (Csp6), Granzyme A (GzmA), Granzyme B (GzmB) ou CRNSP. Modifié d'après Simon et Wilson, 2013 (101).

3 Les partenaires nucléoplasmiques des lamines de type A

3.1 Les protéines associées aux lamines (ou *lamina-associated proteins*)

Il existe deux groupes de protéines associées aux lamines (*lamina-associated proteins* ou LAP) : LAP 1 et LAP 2.

LAP1 fut une des premières protéines de ce groupe identifiée (104). C'est une protéine transmembranaire de la membrane nucléaire interne, codée par le gène *TOR1AIP1*. Chez le rat, trois isoformes, produites par épissage alternatif, ont été décrites : LAP1A, LAP1B et LAP1C avec des poids moléculaires respectifs de 75, 68 et 55 kDa (104,105). Chez l'homme, seules deux isoformes ont été décrites : LAP1B et LAP1C (isoforme tronquée dans sa partie N-terminale) (106,107). L'ensemble des isoformes partagent donc la même partie N-terminale de 187 acides aminés dans laquelle se trouve le domaine LEM. Ce motif de 40 acides aminés environ est commun à différentes protéines parmi lesquelles LAP2, émerine et MAN1 (ce qui lui vaut son nom de domaine LEM pour « LAP2, Emerin et MAN1 ») (108). Il peut lier la protéine adaptatrice BAF (*Barrier-to-Autointegration Factor*) qui médie l'interaction avec la chromatine de façon séquence-indépendante et joue ainsi un rôle central dans l'organisation nucléaire et l'assemblage de l'enveloppe nucléaire (31,109).

LAP2 α est particulièrement intéressante concernant la régulation de la localisation des lamines de type A. C'est l'un des six variants produits par épissage alternatif du gène *LAP2* (également nommé *TMPO*) (110). Contrairement aux autres isoformes qui sont uniquement des protéines de la membrane nucléaire interne, LAP2 α se localise dans le nucléoplasme où elle interagit avec les lamines de type A (111–113). Au niveau structural, LAP2 α se distingue des autres isoformes LAP2 par l'existence d'un domaine supplémentaire d'interaction avec la chromatine et d'un domaine d'interaction avec la protéine Rb (*retinoblastoma protein*) permettant la régulation du cycle cellulaire et de la différenciation cellulaire dans sa partie C-terminale (114–116).

L'étude des cellules de souris déficientes en LAP2 α , tout comme celle de fibroblastes humains traités par un ARN interférent contre LAP2 α , montrent une réduction significative de la quantité de lamines A/C au niveau du nucléoplasme (117–

119). De plus, un niveau faible de lamines de type A dans le nucléoplasme a été mis en évidence dans des cellules quiescentes ou en différenciation. Ce niveau est corrélé avec une diminution de l'expression de LAP2 α (120,121) .

Ces données suggèrent que LAP2 α permet la régulation et la stabilisation d'un pool soluble et peu polymérisé de lamines A/C dans le nucléoplasme. Cependant le mécanisme moléculaire sous-jacent n'est pas complètement identifié. Deux hypothèses coexistent : soit la liaison de LAP2 α à la queue des lamines empêche leur polymérisation (111) soit la liaison de LAP2 α est liée à des modifications post-traductionnelles (phosphorylations par exemple) des lamines qui affectent leur assemblage (122).

3.2 La protéine Rb (ou *retinoblastoma protein*)

La protéine Rb, ou produit du gène rétinoblastome *RB-1*, et p107 et p130, respectivement son homologue et son paralogue sont collectivement appelés « protéines de poche ». Elles sont largement impliquées dans la régulation du cycle cellulaire.

Des expériences de co-immunoprécipitation ont pu montrer que les lamines de type A, LAP2 α et la forme hypophosphorylée de la protéine Rb (pRb) formaient un complexe ternaire (116).

Ce complexe pRb/Lamines de type A/LAP2 α joue un rôle important dans la physiopathologie des laminopathies musculaires, il sera donc détaillé plus tard dans l'exposé.

3.3 La protéine BAF

Cette petite protéine de 10 kDa a initialement été baptisée BAF, pour « *barrier to autointegration factor* », en raison de son rôle dans le blocage de l'intégration délétère d'ADN viral grâce au complexe qu'elle forme avec LAP2 α (123). Son implication dans de nombreux autres processus cellulaires (mitose, assemblage du noyau, régulation de l'expression des gènes, réparation des dommages causés à l'ADN) a été découverte plus récemment.

Ainsi, les protéines comportant des domaines LEM, telles que l'émerine ou LAP2 α , mais également la lamine A qui peut s'y lier soit directement avec une faible affinité soit indirectement via son interaction avec l'émerine ou LAP2 α sont des partenaires connus de cette protéine BAF (109,124).

3.4 F-actine nucléaire

Les lamines peuvent interagir directement avec la F-actine nucléaire grâce à deux domaines de liaison à l'actine :

- (i) le premier entre les résidus 461 et 536 et donc situé dans l'*Ig-fold* ;
- (ii) le deuxième entre les résidus 564 et 608 et donc situé dans la région C-terminale spécifique de la lamine A. Il a été montré que le domaine C-terminal de la lamine A mature avait une plus grande affinité pour la F-actine que le domaine C.

Ces interactions entre lamines et l'actine semblent être importantes pour la réorganisation de la chromatine et la transcription (125).

3.5 SREBP1

Les SREBP1s (« *Sterol regulatory element binding protein-1* ») appartiennent à la famille des facteurs de transcription à domaine bHLH-Zip (basic Helix-loop-helix leucine zipper) (126).

L'interaction entre les lamines de type A et SREBP1 joue un rôle important dans la physiopathologie des laminopathies avec atteinte du tissu adipeux (lipodystrophie), elle sera donc détaillée plus tard dans l'exposé.

3.6 Titine

La titine est la plus grosse protéine du corps humain puisque l'isoforme la plus longue a un poids moléculaire de 4,2 MDa. Deux types d'isoformes de par leur localisation ont été décrits pour la titine :

- (i) les isoformes cytoplasmiques, impliquées dans l'organisation des sarcomères pour leur propriété élastique (127) ;
- (ii) les isoformes nucléaires, décrites dans des cellules non-musculaires, essentielles pour la condensation des chromosomes et leur ségrégation au cours de la mitose (128,129).

La queue C-terminale des isoformes nucléaires de titine peuvent interagir avec les lamines de type A et les lamines de type B *in vitro* et *in vivo* (130).

4 Rôles des lamines de type A

4.1 Organisation de la chromatine

Les premières preuves d'une interaction entre les lamines et la chromatine proviennent d'analyses biochimiques à partir de préparations de lamines nucléaires de cellules HeLa (131). Il a ensuite été montré que les lamines A/C avaient la capacité de se lier aux chromosomes mitotiques (132) et aux nucléosomes (133). Cette interaction avec les nucléosomes semble être supportée par le domaine C-terminal non hélicoïdal des lamines et les queues N et C-terminales des histones (134). L'interaction directe des lamines avec l'ADN semble quant à elle être supportée par un domaine de liaison à l'ADN présent dans la partie C-terminale de la protéine (135).

Des études en FISH (*Fluorescence in situ Hybridization*) ont montré que les chromosomes occupaient des régions spécifiques, appelées « territoires chromosomiques » ou « domaines chromosomiques ». Les chromosomes riches en gènes ont ainsi tendance à se situer au centre du noyau alors que ceux pauvres en gènes sont plus proches de la périphérie du noyau et donc proches des lamines nucléaires (136)(137). Ces « domaines associés aux lamines » (ou LAD pour « *Lamina-associated domains* ») du génome sont enrichis en gènes transcriptionnellement inactifs et en modifications post-traductionnelles des histones associées à l'hétérochromatine. Cette organisation spatiale du génome en lien avec les lamines est conservée dans les cellules de mammifères (138).

Le génome humain contient plus de 1300 LADs de taille comprise entre 10 kb et 10 MB soit près de 40% du génome. Ces LADs sont caractérisés par une expression génique faible, un environnement répressif de la chromatine et sont encadrés par des sites de liaison pour le répresseur transcriptionnel CTCF (138).

Enfin la régulation négative de la lamine B1 (139), des lamines A/C (140) ou de la lamine de *C. elegans* (141) sont associées à une réorganisation de la chromatine. Ces changements dans l'organisation de la chromatine peuvent être associés à des altérations épigénétiques. Une baisse des marques H3K9me3 et H3K27me3, associées à

l'hétérochromatine, et une augmentation de la marque H4K20me3 ont ainsi été mises en évidence dans le cas de la progeria (142).

De plus, les protéines de la membrane nucléaire interne interagissant avec les lamines semblent également impliquées dans la liaison à l'hétérochromatine et dans la répression de l'expression des gènes.

4.2 Organisation de l'enveloppe nucléaire

Ce rôle des lamines de type A dans l'organisation de l'enveloppe nucléaire a été mis en évidence en observant la perte de l'intégrité de l'enveloppe nucléaire dans des cellules exprimant une forme tronquée de lamine A en faible quantité (143). On observe dans le noyau de ces cellules (fibroblastes embryonnaires murins) une perte des lamines de type B et de LAP2 et une délocalisation de l'émerine et des nesprines dans le réticulum endoplasmique (143–147). Ces altérations sont également retrouvées dans des cellules humaines n'exprimant pas les lamines A/C (148).

La lamine nucléaire permet également l'ancrage des pores nucléaires et leur maintien dans des conditions d'espacement convenables. Ainsi, l'expression de lamines mutées a pour conséquence une anomalie de la distribution des pores nucléaires au niveau de l'enveloppe nucléaire (149–151).

4.3 Définition des propriétés mécaniques du noyau et des cellules

Les lamines nucléaires, à la manière des filaments intermédiaires du cytosquelette pour la cellule entière, sont un déterminant essentiel du soutien mécanique du noyau. Pour preuve, les noyaux de fibroblastes embryonnaires de souris inactivés pour le gène *Lmna* montrent une déformabilité accrue et une viabilité diminuée dans un contexte de stress mécanique comparés aux noyaux de fibroblastes contrôles (152). Cette déformabilité accrue est également retrouvée dans des cellules souches embryonnaires humaines dépourvues de lamines A (153). De plus, les cellules dépourvues de lamines nucléaires ou exprimant une forme mutée ont des noyaux déformés (154–158).

Des analyses protéomiques ont montré que les lamines A contribuent à la viscosité du nucléoplasme, empêchant une déformation du noyau, alors que les lamines de type B

contribuent à son élasticité, permettant ainsi un retour à une forme normale en cas de déformation. Cependant, des études plus récentes ont montré que des fibroblastes de patients atteints d'une forme autosomique dominante de leucodystrophie, causée par une duplication du gène *LMNB1* et donc une augmentation de l'expression de la lamine B1 (31), présentent une rigidité nucléaire augmentée. Ceci suggère donc que la lamine B1 contribue également à rigidité nucléaire (159).

Ainsi, les différences de niveau d'expression tissulaire de la lamine A détermine la protection du noyau contre le stress mécanique : le niveau d'expression faible des tissus mous avec peu de contraintes mécaniques (tissus adipeux, cerveau) ne protège pas le noyau contre le stress mécanique qui peut déstabiliser la chromatine alors que le niveau d'expression élevé des tissus au sein desquels une contrainte mécanique peut être élevée (muscles, os) permet de diminuer la déformation du noyau. La lamine A est un facteur crucial dans la régulation de la rigidité des noyaux et à la préservation des territoires chromosomiques, notamment dans les tissus soumis à un stress mécanique intense tel qu'il existe dans les muscles (160).

Ce lien entre rigidité nucléaire et expression des lamines nucléaires est également en rapport direct avec la migration cellulaire. En effet, une expression de lamine A augmentée dans les neutrophiles réduit leur migration (161). De la même façon, les propriétés migratoires des cellules hématopoïétiques sont inversement corrélées avec un ratio de lamine A/lamine B élevé (162). Cependant, les cellules sans ou avec un niveau d'expression très faible de lamine A ont une fragilité accrue avec un risque de rupture augmenté (163).

4.4 Mécanotransduction

4.4.1 Support et preuves sous-jacentes

La lamine nucléaire est connectée au cytosquelette via un complexe de protéines regroupées sous le nom de « complexe LINC » pour *Linker of Nucleoskeleton to Cytoskeleton* (31). Ce complexe est constitué de plusieurs composants protéiques : (i) des protéines de la membrane nucléaire externe avec les nesprines et leur domaine C-terminal KASH (Klarsicht, ANC-1, Syne homology), (ii) des protéines de la membrane

nucléaire interne avec les protéines à domaines SUN. Ces protéines SUN interagissent quant à elles avec les lamines nucléaires, les complexes du pore nucléaire et la chromatine (164) (cf. Figure 20). La composition du LINC complexe et les protéines qui lui sont associées varient en fonction du type cellulaire.

Du côté cytoplasmique, les nesprines peuvent interagir entre elles et avec les composants du cytosquelette. Les isoformes 1 et 2 des nesprines (nesprine-1 et nesprine-2) peuvent se lier aux filaments d'actines grâce à un domaine N-terminal (*actin binding-domain*) (165), aux moteurs moléculaires associés aux microtubules que sont la kinésine (166) et la dynéine (167). L'isoforme 3 (nesprine-3) peut se lier aux filaments intermédiaires du cytosquelette via la plectine (168). Enfin, l'isoforme 4 (nesprine-4) interagit avec la kinésine-1 (169) (cf. Figure 20).

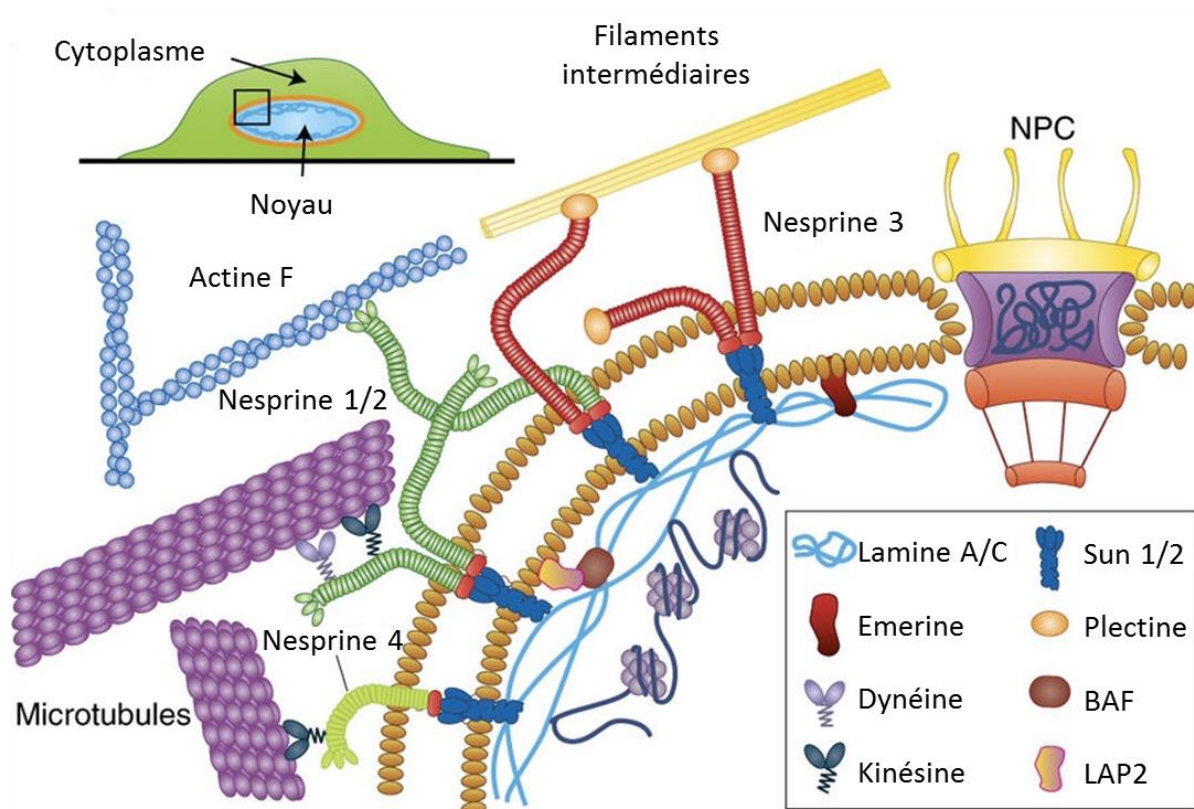


Figure 20. Représentation schématique des protéines de l'enveloppe nucléaire impliquées dans la transmission de force au noyau.

La transmission de la force au noyau implique l'interaction d'éléments cytosquelettiques (filaments d'actine, microtubules) avec des protéines nesprines au niveau de l'enveloppe nucléaire interne et via les protéines à domaine SUN sur l'enveloppe nucléaire interne à la lamina nucléaire. Modifié d'après Kirby et Lammerding, 2018 (170).

Bien que la transmission des forces extérieures au noyau puisse se faire indépendamment du complexe LINC, dans la plupart des cas, la transmission des forces entre le cytosquelette et le noyau nécessite son intégrité. Ainsi, la diminution de l'expression ou l'expression de variants dominant-négatifs de nesprines ou de protéines SUN altèrent sévèrement la mécanotransduction et l'expression de gènes sensibles à ce couplage (171).

Cette relation intime entre le cytosquelette, le nucléosquelette et l'environnement est particulièrement importante pour les cellules musculaires squelettiques et cardiaques. Ces cellules contractiles possèdent un cytosquelette très organisé avec un réseau périnucléaire spécialisé dans le maintien de la place des noyaux. Par exemple, la desmine est un filament intermédiaire spécifique du muscle qui interagit avec l'enveloppe nucléaire via la plectine 1 (Figure 21) (172). Cette interaction est particulièrement importante pour le maintien des fibres musculaires (173).

Le complexe LINC remplit également des fonctions cruciales dans la physiologie de la cellule musculaire. Il est particulièrement important pour le mouvement et le positionnement des noyaux dans la fibre musculaire (174–176). Pour preuve, la perte de l'intégrité du complexe LINC est la cause de nombreuses dystrophies musculaires (31). De plus, cette hypothèse est également supportée par le fait que des mutations dans le gène *LMNA* associées à une dystrophie musculaire ou à une cardiomyopathie conduisent à un dysfonctionnement du couplage entre le cytosquelette et le nucléosquelette alors que celles associées avec une lipodystrophie n'ont que peu de répercussions sur la mécanotransduction (177–179).

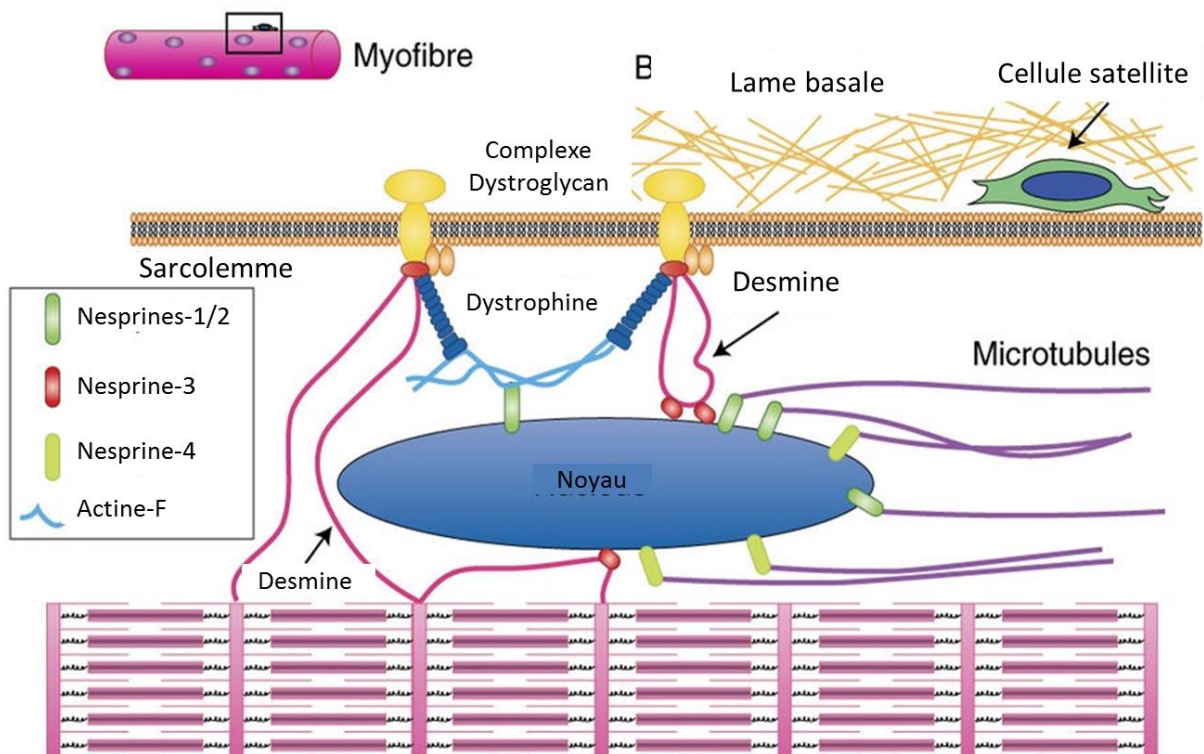


Figure 21. Organisation particulière dans les cellules musculaires.

Les noyaux sont positionnés à la périphérie de la cellule, où ils interagissent avec des protéines spécifiques du muscle telles que la dystrophine (à travers les filaments d'actine) et la desmine. Des protéines supplémentaires, telles que les protéines du complexe LINC et les lamines peuvent être impliqués dans l'ancrage des myonucléi ainsi que la génération et la transmission de forces entre le noyau et cytosquelette. Modifié d'après Kirby et Lammerding, 2018 (170).

4.4.2 Mécanismes potentiels sous-jacents à la mécanotransduction

L'effet délétère de mutations dans le gène *LMNA* ou d'une désorganisation du complexe LINC est maintenant bien documenté (31) mais les mécanismes moléculaires sous-jacents ne sont pas encore entièrement compris. Les forces mécaniques externes sont transmises via le cytosquelette au noyau où ces dernières sont responsables d'une déformation (180). Ceci peut ainsi modifier l'activité transcriptionnelle du noyau et l'organisation de la chromatine à travers différents mécanismes.

Un des mécanismes potentiels de cette modulation de l'activité transcriptionnelle par les forces agissant sur le noyau est la modification physique de l'organisation de la chromatine. L'organisation spatiale de l'ADN dans le noyau n'est pas le résultat d'une organisation au hasard : on parle de « nucléome 4D » pour faire référence à l'organisation du génome en trois dimensions en ajoutant le temps comme quatrième dimension (181). Comme évoqué plus tôt, l'hétérochromatine, qui correspond à un état « fermé » de la chromatine et donc inaccessible à la machinerie transcriptionnelle, est plutôt localisé à la périphérie du noyau (140). Cette périphérisation est plutôt en faveur d'une absence de l'expression des gènes, alors que son repositionnement au centre du noyau facilite généralement son activation, bien que d'autres voies régulatrices existent (90). Ainsi, l'hypothèse d'une altération de l'expression des gènes par déformation du noyau et donc modification de la localisation du gène peut être formulée. Cette dernière est supportée par les modifications de l'architecture nucléaire, de la distribution de la chromatine et de l'expression de certains gènes observées dans des cellules cultivées sur des substrats micropatternés (182). Cependant, il n'est pas encore clair si les modifications dans l'expression des gènes observées sont la conséquence directe des modifications des forces s'exerçant sur le cytosquelette et le noyau ou si elles sont la conséquence de la modification de l'activité de voies de signalisation sensibles à l'organisation du cytosquelette.

En parallèle de ce changement dans la position des gènes dans le noyau, la transmission des forces peut modifier l'organisation et l'état de condensation de la chromatine. Des expériences *in vitro* ont montré que des forces de 5 pN étaient suffisantes pour provoquer une décondensation de la chromatine (183). De la même façon,

l'application de forces à la surface de la cellule se traduit instantanément (< 30 secondes) par un étirement de la chromatine et une initiation rapide de la transcription d'un transgène situé dans la région étirée (184). La perturbation du complexe LINC est d'ailleurs responsable d'un arrêt de l'initiation de la transcription du transgène en réponse à l'application des forces (184). Cette modification quasiment instantanée suggère que le mécanisme sous-jacent est une modification de l'accessibilité de la chromatine à la machinerie transcriptionnelle plutôt qu'une modification épigénétique du locus.

Enfin, des études récentes ont montré que le stress mécanique pouvait induire des changements conformationnels et post-traductionnels, comme des phosphorylations, des protéines de l'enveloppe nucléaire (160,185–187). L'application de forces au noyau est responsable d'une modification de la conformation de la lamine C entre le pôle apical et le pôle basal du noyau, comme le montre le masquage de certains épitopes situés en N ou en C-terminal dans des conditions de stress mécanique (186). Par exemple, l'exposition de noyaux isolés à des forces de cisaillement conduit au démasquage d'un résidu cystéine cryptique (Cys552) dans le domaine *Ig-like* des lamines A/C qui est normalement pas accessible dans des conditions de stress mécanique faible (160). De la même façon, il a été montré que la culture de cellules sur un substrat mou induisait une augmentation de la phosphorylation des lamines A/C qui est associée à une augmentation de leur solubilité et de leur dégradation (160,187). A l'inverse, l'augmentation des tensions appliquées au cytosquelette induisait une diminution de cette phosphorylation et une diminution du niveau d'expression des lamines A/C (187). Bien que les voies de signalisation potentiellement altérées par ce changement de statut de phosphorylation ne soient pas encore connues, ces résultats montrent l'implication des protéines de l'enveloppe nucléaire, et notamment celle des lamines A/C, dans la modulation de l'activité transcriptionnelle.

D'autres mécanismes sont proposés pour expliquer la réponse du noyau au stress mécanique, parmi lesquels :

- (i) L'enveloppe nucléaire étant en continuité avec le réticulum endoplasmique, l'application de forces sur l'enveloppe nucléaire peut augmenter les tensions au niveau du réticulum endoplasmique (188). Ceci pourrait donc modifier l'organisation du réticulum endoplasmique granuleux et la distribution des protéines associées. Par exemple, les polysomes sont enrichis dans les feuillettes plutôt que dans les tubules du réticulum endoplasmique, ainsi la réduction de la courbure de la membrane pourrait augmenter leur exposition au cytosol (189,190).
- (ii) La translocation de l'émerine à la membrane nucléaire interne afin de renforcer le réseau d'actine et faciliter le remodelage de la chromatine peut survenir en cas de stress mécanique prolongé (191).
- (iii) Le stress mécanique peut potentialiser certaines voies en étant à l'origine d'une ouverture du pore nucléaire et d'une augmentation de sa perméabilité (192). Ceci peut être la cause d'une modification de la localisation et de l'activité de facteurs de transcription tels que les facteurs YAP et MKL1 (193-195). De la même façon, il a été montré que les lamines A/C pouvaient séquestrer certains facteurs de transcription tels que les protéines Rb ou Fos à la périphérie du noyau (196,197).
- (iv) Le recrutement de cPLA2 (phospholipase A2 nucléoplasmique) à la membrane nucléaire interne.

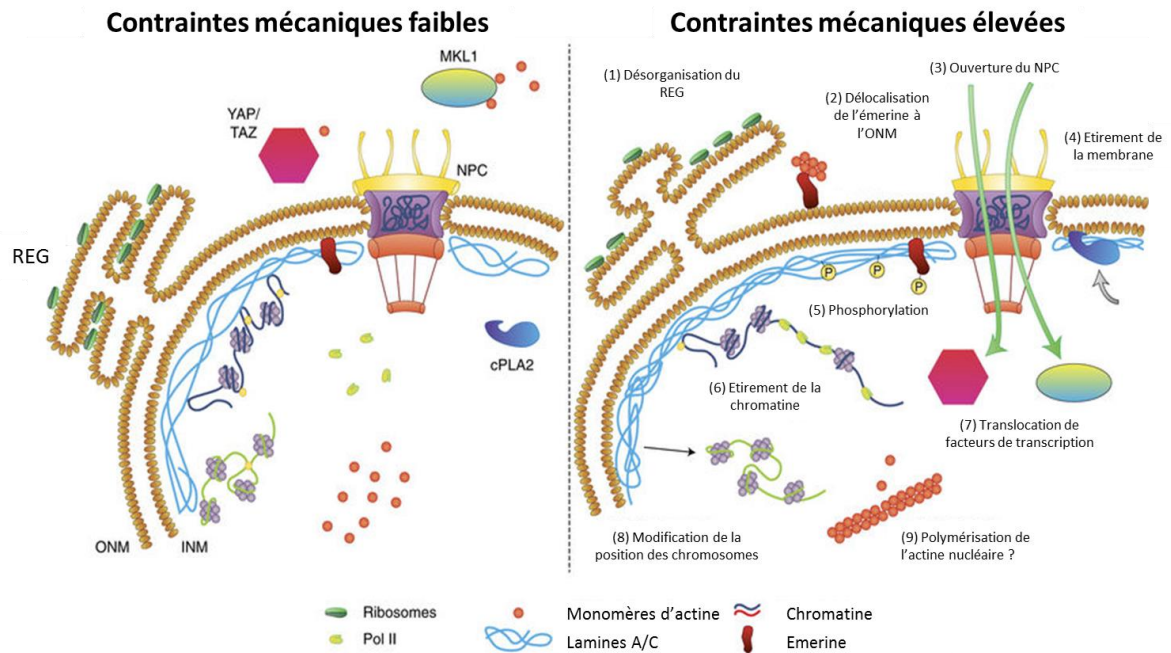


Figure 22. Récapitulatif des mécanismes proposés dans la mécanotransduction.

- (1) L'étirement de la membrane nucléaire pourrait modifier la conformation du réticulum endoplasmique rugueux (REG), exposant davantage de ribosomes au cytoplasme.
 - (2) L'application de forces favorise la translocation de l'émerine de l'INM (membrane nucléaire interne) à l'ONM (membrane nucléaire externe), modulant l'organisation de la chromatine et facilitant la polymérisation de l'actine à la membrane nucléaire externe.
 - (3) L'augmentation de la tension membranaire pourrait ouvrir des pores nucléaires (NPC) et moduler leur perméabilité.
 - (4) L'étirement de la membrane nucléaire entraîne le recrutement de cPLA2 (phospholipase A2 nucléoplasmique) à la membrane nucléaire interne.
 - (5) La transmission de forces au noyau entraîne des modifications post-traductionnelles et une modification de la dynamique des lamines A/C et de protéines de l'enveloppe nucléaire interne, telles que l'émerine (voir aussi (2)), qui peuvent moduler les propriétés mécaniques du noyau et induire une modification des voies de signalisation en aval.
 - (6) Des forces externes peuvent induire un étirement de la chromatine, modifiant l'accessibilité de la polymérase (Pol II) et l'activité de facteurs de transcription.
 - (7) L'ouverture et la séquestration des pores nucléaires au niveau de l'enveloppe nucléaire peuvent moduler la localisation et l'activité de facteurs de transcription.
 - (8) Les forces agissant sur le noyau peuvent repositionner des domaines de la chromatine et modifier ainsi leur activité transcriptionnelle.
 - (9) La polymérisation de l'actine nucléaire peut moduler l'exportation et l'activité du régulateur de transcription MKL1 et affecter d'autres processus nucléaires qui nécessitent des monomères d'actine.
- Modifié d'après Kirby et Lammerding, 2018 (170).

4.5 Positionnement du noyau

Un positionnement anormal du noyau peut conduire à un dysfonctionnement de la physiologie cellulaire pouvant notamment impacter la viabilité cellulaire. Dans le cas du muscle, la position des noyaux dans la myofibre est important pour le fonctionnement musculaire (198). Ces mouvements nucléaires impliquent différents éléments du cytosquelette comme les microtubules, les moteurs moléculaires du type dynéine et kinésine, l'actine ou encore le complexe LINC (199).

Ainsi les lamines, en maintenant les protéines SUN à la membrane nucléaire interne, peuvent jouer un rôle dans la migration et la position des noyaux au sein de la cellule. Pour preuve, dans les myotubes, en l'absence de prélamine A farnésylée, le positionnement des noyaux est sévèrement affecté et n'atteint pas le stade de maturation plus tardif. Le positionnement du noyau est sous la dépendance du recrutement de la protéine SUN1 à l'enveloppe nucléaire via la prélamine A farnésylée (200).

4.6 Support de différentes voies de signalisation

Les lamines de type A sont le support et participent à la régulation de nombreuses voies de signalisation tels que:

- MAP Kinases (201),
- Akt/mTor (202,203),
- TGFb (204,205),
- BMP (206),
- YAP (193),
- Ainsi que les voies d'apoptose (207).

La dérégulation de ces voies participant largement à la physiopathologie des troubles associés aux laminopathies, leurs défauts seront développées plus tard (cf 5.4.3 Mécanismes physiopathologiques).

4.7 Réplication et réparation de l'ADN

Plusieurs preuves sont en faveur du rôle des lamines dans la réplication de l'ADN. Dans des cellules en culture, les sites de réplication peuvent être visualisés comme des foci dans le nucléoplasme, détectables par l'incorporation de bromodeoxyuridine (Br-dU) ou par la localisation en immunofluorescence de protéines associées à la réplication comme la protéine PCNA (56).

Il a tout d'abord été montré que la lamine B1 et lamines A/C étaient localisées dans ces foci (208,209). De plus, la réplication est inhibée par la déplétion de lamine B3 ou par l'expression d'un variant dominant-négatif de lamine B3 dans des noyaux de *Xenopus in vitro* (56). Comme évoqué plus haut, le domaine *Ig-fold* des lamines A/C permet la liaison au PCNA, assurant ainsi leur rôle dans la régulation de la réplication de l'ADN (56).

Les lamines nucléaires sont également impliquées dans la réparation de l'ADN, même si les mécanismes précis de cette implication ne sont pas encore complètement clairs. Les premières évidences de ce rôle ont été obtenues par l'expression de mutants du gène *LMNA* qui était à même d'altérer la formation des foci de réparation de l'ADN (210,211). Une évidence supplémentaire est l'observation de défauts télomériques et de défauts dans la réparation de l'ADN dans la progéria, syndrome de vieillissement accéléré causé par des mutations dans le gène *LMNA* (212).

Enfin, plus récemment, une interaction des lamines A/C avec la protéine 53BP1 a été mise en évidence dans des fibroblastes cutanés humains, protéine importante pour la réparation de l'ADN après cassure double brin. Cette interaction ne semble avoir lieu qu'en l'absence de dommage de l'ADN (213). De plus, il a été montré qu'en l'absence de lamines A/C, 53BP1 est instable (214). Ainsi, il a été proposé que les lamines A/C permettaient de conserver 53BP1 dans le nucléoplasme afin d'être rapidement recruté dans les foci de réparation de l'ADN (213).

4.8 Transcription

Ce rôle des lamines a été mis en évidence par la capacité d'inhibition de l'ADN polymérase de type II dans ces cellules de hamster ou des noyaux isolés d'embryons de xénopes d'une forme dominant-négative délétée en son domaine N-terminal de lamine A (215). De la même façon, dans des cellules HeLa, la surexpression des lamines A/C ou la déplétion en lamine B1 conduisent à une diminution significative de l'activité de l'ARN polymérase de type II (216).

Les lamines s'associent avec de nombreux facteurs de transcription tels que :

- (i) Oct-1 pour les lamines B1. Une diminution de l'expression des lamines B1 conduit à une dérégulation de l'expression de gènes dépendant d'Oct-1 et à une augmentation des espèces réactives de l'oxygène (217),
- (ii) c-Fos pour les lamines A/C. L'interaction entre les lamines A/C et c-Fos à l'enveloppe nucléaire semble empêcher la liaison de AP-1 (*activating protein 1*) à l'ADN et son activité transcriptionnelle dépendant de la voie ERK 1/2 (*Extracellular signal-regulated kinase*) (218),
- (iii) MOK2 pour les lamines A/C (219). Cette protéine est capable, via des motifs en doigts de zinc, de se lier à la fois à l'ADN et à l'ARN et est donc impliquée dans la régulation de la transcription et de modifications post-transcriptionnelles de gènes cibles,
- (iv) SREBP1 (*sterol response element binding protein 1*), un facteur de différenciation adipocytaire, pour les lamines A/C (220),
- (v) En complément de ces interactions directes, les lamines peuvent également interagir avec des facteurs de transcription via ses partenaires tels que l'émerine, la protéine Rb et les LAP.

5 Les laminopathies

5.1 Description générale

La première mutation dans le gène *LMNA* a été identifiée en 1999 par l'équipe de K. Schwart dans une grande famille française atteinte de dystrophie musculaire d'Emery-Dreifuss (EDMD) (221). Depuis, des centaines de mutations dans le gène *LMNA* ont été identifiées et reconnues comme causales de plusieurs affections cliniques rares regroupées sous le terme de « laminopathies » (31) (Figure 23 et Figure 24). On retrouve sous ce terme des pathologies multisystémiques comme le syndrome d'Hutchinson-Gilford ou Progeria, syndrome de vieillissement accéléré, mais également des pathologies tissus-spécifiques (222,223).

Ces pathologies affectent :

- (i) les nerfs périphériques avec une neuropathie périphérique de type Charcot-Marie-Tooth de type 2 (CMT2A),
- (ii) le tissu adipeux avec des lipodystrophies partielles familiales de type Dunnigan (FPLD),
- (iii) le muscle tant squelettique que cardiaque avec des phénotypes cardiaques comme dans la cardiomyopathie dilatée avec défauts de conduction (DCM-CD), des phénotypes musculaires comme dans la dystrophie musculaire congénitale (L-CMD) ou la dystrophie musculaire des ceintures de type 1B (LGMD1B) mais également des phénotypes mixtes comme dans la dystrophie musculaire d'Emery-Dreifuss (EDMD).
- (iv) Enfin, des patients peuvent présenter des phénotypes mixtes, suggérant un continuum clinique entre ces pathologies.

De façon plus générale, ces laminopathies appartiennent au groupe des « envelopathies nucléaires », rassemblant les maladies causées par des mutations dans les gènes codant d'autres protéines de l'enveloppe nucléaire (31) (Figure 25).

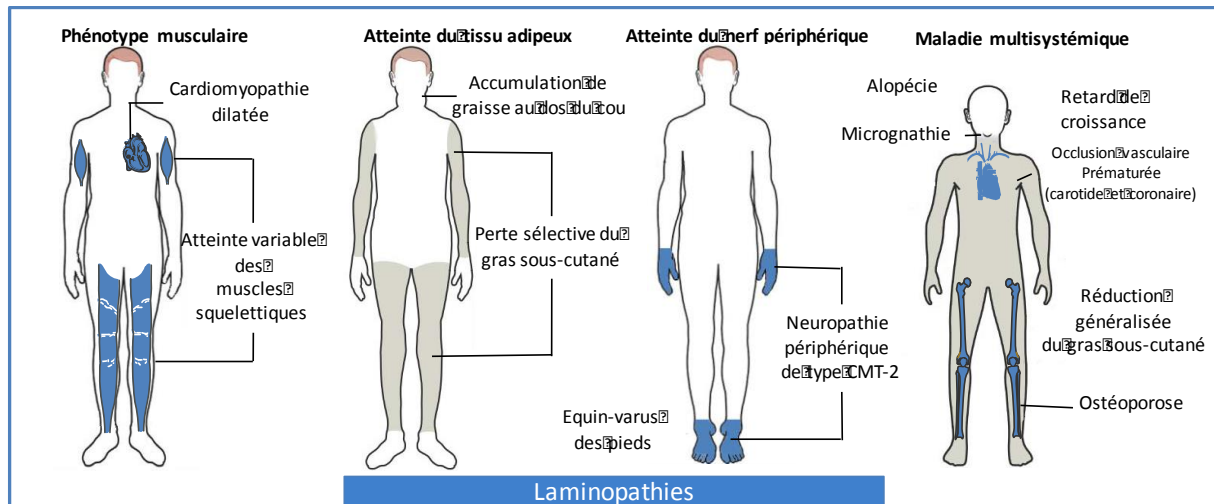


Figure 23. Les mutations dans le gène *LMNA* sont responsables de pathologies appelées « laminopathies ».

Légende de la figure 24, page suivante :

Les couleurs indiquent le tissu préférentiellement atteint. En rouge sont indiquées les pathologies avec une implication préférentielle des muscles squelettique et cardiaque, qui vont des dystrophies musculaires aux anomalies de la conduction cardiaque. En bleu, sont indiquées les lipodystrophies qui affectent spécifiquement le tissu adipeux. En jaune sont indiquées les neuropathies qui affectent les neurones moteurs et sensoriels du système nerveux périphérique. En vert sont indiquées les laminopathies « systémiques », qui sont des désordres hétérogènes impliquant plusieurs systèmes. En violet sont indiquées les mutations associées à des troubles du vieillissement prématuré.

Les mutations affectant les acides aminés 1 à 566 affectent à la fois les isoformes des lamines A et C, alors que les mutations trouvées dans les acides aminés carboxy-terminaux de 566 à 664 sont spécifiques à la lamine A. Modifié d'après Dittmer et Misteli, 2011 (51).

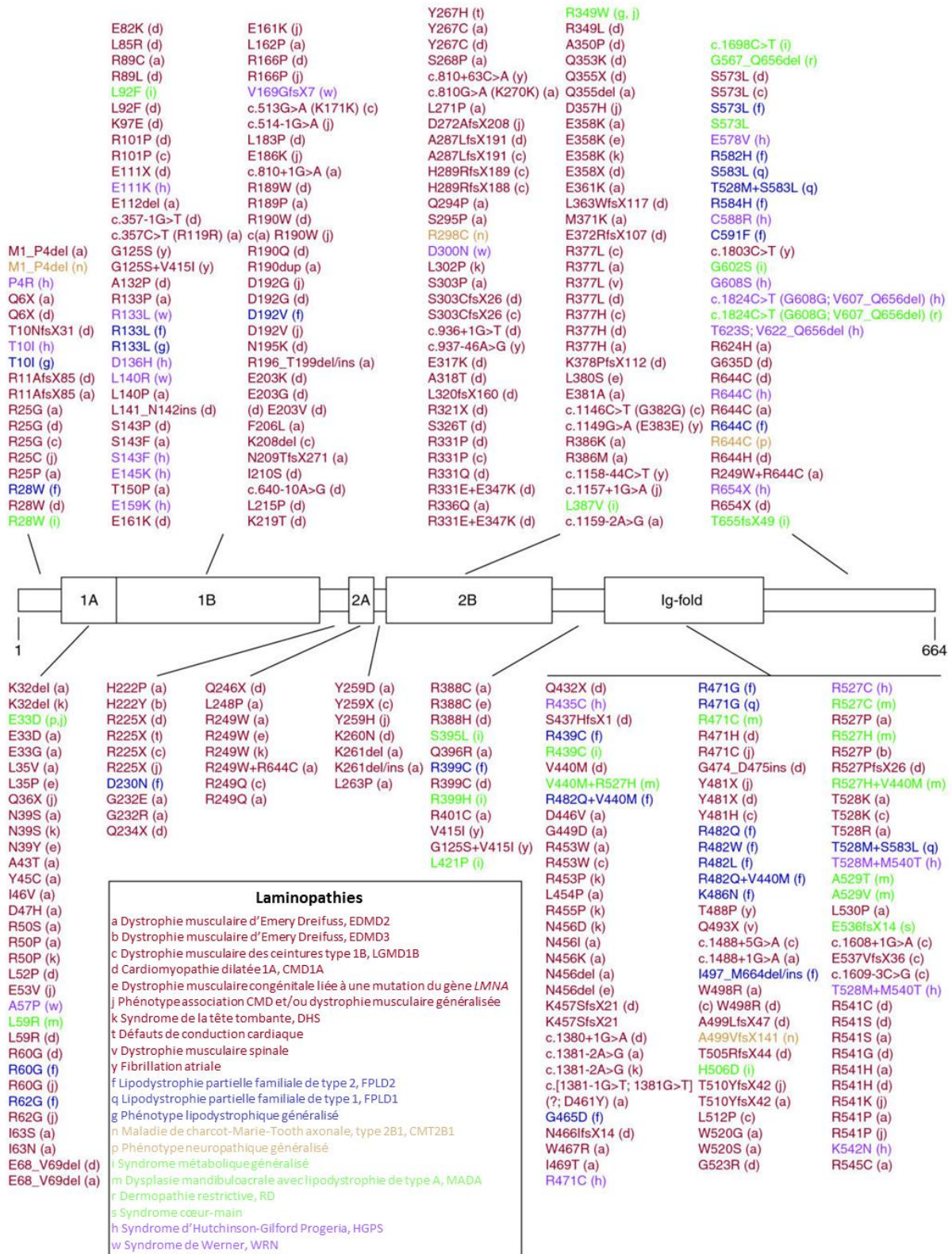


Figure 24. Localisation des mutations du gène *LMNA* en fonction du diagnostic et du tissu atteint.

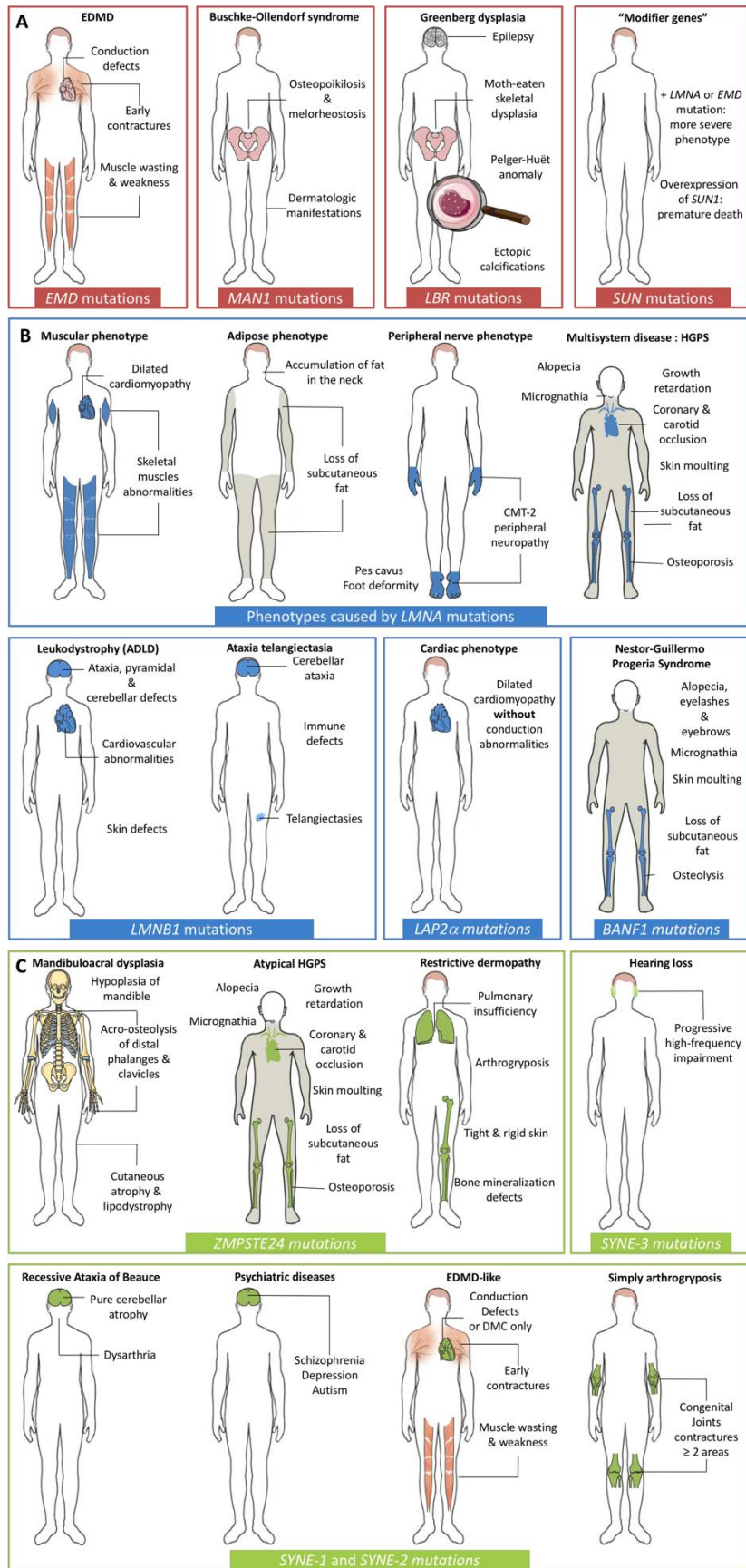


Figure 25. Pathologies causées par des mutations dans des gènes codant des protéines de l'enveloppe nucléaire.

Malgré l'expression ubiquitaire des lamines, la plupart des laminopathies sont des pathologies tissu-spécifiques, affectant souvent les muscles squelettiques et le cœur. Cependant, les mécanismes conduisant à la tissu-spécificité des mutations dans le gène *LMNA* sont encore mal connus et la corrélation entre le génotype et le phénotype reste difficile. Ainsi, plusieurs hypothèses, non mutuellement exclusives, ont été formulées :

- (i) Une hypothèse dite « structurale » est basée sur le rôle structurant des lamines nucléaires et suggère que, en l'absence de lamines A/C ou en présence de lamines A/C avec une fonctionnalité altérée, les cellules sont plus susceptibles de subir des dommages mécaniques. Ces dommages induiraient alors la mort des cellules, notamment des tissus très sujets à ce type de stress comme le tissu musculaire.
- (ii) Une hypothèse basée sur l'interaction des lamines avec des facteurs de transcription propose que l'expression d'une forme mutée de lamines A/C modifierait leurs interactions avec des régulateurs de la transcription tissu-spécifique (207).
- (iii) Une troisième hypothèse est basée sur le fait que, à l'exception des neuropathies périphériques, les tissus principalement atteints dans les laminopathies dérivent tous d'une origine mésenchymateuse. Ainsi, il a été proposé que les mutations dans le gène *LMNA* perturberaient le fonctionnement et leur maintien des cellules souches d'origine mésenchymateuse (225).
- (iv) Plus récemment, une quatrième hypothèse, basée sur le rôle des lamines de type A dans l'export nucléaire des ARN, a été proposée. Le phénotype de vieillissement accéléré observé chez des drosophiles exprimant une forme mutée de lamine C, mimant ainsi les syndromes progéroïdes humains, a été lié à un défaut d'export nucléaire des ARN responsable d'une perte de l'intégrité mitochondriale (226).

Légende de la figure 25, page précédente :

La diversité des phénotypes induits par les mutations dans les gènes codant pour les composants de l'enveloppe nucléaire est illustrée et organisée en fonction de la localisation de la protéine mutée : (a) membrane nucléaire interne, (b) lamina nucléaire, et (c) composants de la membrane nucléaire externe. EDMD : dystrophie musculaire d'Emery-Dreifuss, HGPS : syndrome de Hutchinson-Gilford Progeria, CMT : maladie de Charcot-Marie-Tooth, ADLD : leucodystrophie autosomique dominante. Modifié d'après Janin *et al.* 2017 (31).

5.2 Atteinte du nerf périphérique

5.2.1 Description clinique et génétique

La maladie de Charcot-Marie-Tooth (CMT) est la neuropathie périphérique congénitale la plus fréquente avec une prévalence estimée de 1/2500. L'électroneuromyogramme permet de distinguer deux types de CMT : une forme myélinique (CMT1) et une forme axonale (CMT2). Une très forte hétérogénéité génétique est retrouvée dans cette pathologie avec, par exemple, quinze gènes ou loci décrits pour les CMT2. La CMT de type 2B1 est une neuropathie sensitive caractérisée par une faiblesse musculaire distale associée à une atrophie. Une atteinte proximale peut progressivement être observée. L'âge d'apparition ainsi que son évolution sont très variables. La CMT2B1 est transmise selon un mode autosomique récessif (227).

La mutation p.Arg298Cys (ou R298C), située au niveau du *rod domain* des lamines de type A, a été associée, à l'état homozygote, à ce phénotype de CMT2B1 (228). Cette substitution n'a été retrouvée que chez des familles atteintes de CMT2B1 provenant d'une région limitée du nord-ouest de l'Afrique (nord-ouest de l'Algérie et est du Maroc) (229).

5.2.2 Physiopathologie

L'étude des nerfs sciatiques des souris inactivées pour le gène *Lmna* (*Lmna*^{-/-}) a montré des altérations similaires à celles retrouvées chez des patients atteints de neuropathies axonales périphériques : élargissement et réduction de la densité des axones associés à un défaut de myélinisation (228).

Pour compléter et afin de mieux déchiffrer les mécanismes physiopathologiques sous-jacents, un modèle murin *knock-in* porteur de la mutation p.Arg298Cys sur le gène *Lmna* a été généré. Chez ce modèle, aucune anomalie apparente au niveau des nerfs périphériques n'a pu être mise en évidence. Cependant, au niveau transcriptionnel, une diminution de l'expression du gène *Lmna* dans le muscle tant squelettique que cardiaque et dans le tissu nerveux (nerf périphérique, moelle épinière et tronc cérébral) associée à une augmentation de l'expression de *Pmp22*, composant majeur de la myéline, dans les nerfs sciatiques uniquement ont été mises en évidence (230). Or, la duplication du chromosome 17, qui contient le gène *PMP22*, est la cause la plus fréquente de CMT chez l'Homme (231). *PMP22*, glycoprotéine transmembranaire, est exprimée dans la portion

compacte de la majorité des fibres myélinisées du système nerveux périphérique et est un facteur important pour la croissance et la différenciation des cellules de Schwann.

Ainsi, ce modèle murin *knock-in* met en évidence une relation possible entre *Pmp22* et *Lmna*, mais les mécanismes précis et les liens de causalité restent encore obscurs.

5.3 Atteinte du tissu adipeux

5.3.1 Description clinique et génétique

L'association de mutations du gène *LMNA* à une atteinte du tissu adipeux du type lipodystrophies partielles familiales de type Dunnigan (FPLD pour *Dunnigan-type Familial Partial Lipodystrophy*) a été faite en 2000 (232–234). Cette pathologie, de transmission autosomique dominante, est caractérisée par une perte de tissu adipeux aux extrémités et apparaît au moment de la puberté. Elle est également souvent associée à des défauts métaboliques avec une insulino-résistance, un diabète, une hypertriglycémie voire une stéatose hépatique. La majorité des mutations du gène *LMNA* identifiées (90% environ) dans cette pathologie sont des mutations faux-sens dans l'exon 8 du gène et conduit à un changement de charge à la surface du domaine *immunoglobulin-like*, comme la mutation p.Arg382Trp (58).

Des mutations faux-sens ont également été décrites au niveau du domaine de l'*Ig-fold* dans des dysplasies mandibulo-acrales de type A (MAD-A) associant un diabète, une lipodystrophie partielle, des anomalies dermatologiques (de type papules leucomélanodermiques), des anomalies congénitales squelettiques et une cardiomyopathie hypertrophique (235,236).

5.3.2 Physiopathologie

5.3.2.1 Perte de l'activité du facteur de transcription SREBP1

En 2014, L'équipe du Dr Brigitte Buendia a montré l'impact des lamines de type A sur la fonction de SREBP1 (126). Des études *in vitro* ont montré que SREBP1 et les lamines A/C interagissaient à la fois à la périphérie du noyau et dans le nucléoplasme via le domaine *Ig-fold* des lamines de type A. *In vitro*, SREBP1, les lamines de type A et les séquences cis-régulatrices de réponse aux stéroïdes forment un complexe ternaire. De plus, la surexpression de la mutation p.Arg482Trp du gène *LMNA* dans des préadipocytes primaires humains diminue l'interaction LMNA-SREBP1 et est associée à une augmentation de l'expression des gènes cibles de SREBP1. Des résultats similaires ont été observés dans des fibroblastes de patients souffrant de FPLD et porteurs de la mutation p.Arg482Trp. Ainsi, cette augmentation de l'activité de SREBP1 pourrait contribuer à l'inhibition de la différenciation adipocytaire observée par l'expression de lamines A portant la mutation p.Arg482Trp (237) ainsi que l'induction de la sénescence prématurée observée des fibroblastes (238).

5.3.2.2 Rôle du facteur de transcription PPAR γ

PPAR γ (*peroxisome proliferator-activated receptor*) est un facteur transcription crucial dans la conversion adipogénique. Il est, entre autres, régulé par une protéine de la membrane nucléaire interne et partenaire des lamines A/C, l'émerine (218).

Il a été montré une accumulation de PPAR γ dans le noyau de fibroblastes inactivés pour le gène *EMD* (*emerine-null*) associée à une augmentation de l'activité de la β -caténine. La dérégulation de la voie Wnt – β -caténine – PPAR γ pourrait contribuer à l'apparition des défauts métaboliques observés chez les patients souffrant de lipodystrophie causée par une mutation dans le gène *LMNA*.

5.4 Atteinte du tissu musculaire strié

5.4.1 Description clinique

Trois phénotypes principaux, basés sur la distribution de la faiblesse musculaire et l'âge d'apparition, ont été associés à des mutations dans le gène *LMNA* : la dystrophie musculaire d'Emery-Dreifuss, la dystrophie musculaire congénitale et la dystrophie musculaire des ceintures (cf. Tableau II). Cependant, ces trois entités cliniques peuvent être causées par la même mutation du gène *LMNA* et coexistées au sein d'une même famille. De plus, compte tenu du chevauchement clinique entre ces trois pathologies, ces phénotypes doivent être considérés comme un continuum clinique (240).

Parmi les caractéristiques communes (240), on peut citer :

- (i) Une atteinte cardiaque quasi systématique et pouvant précéder l'apparition de la faiblesse musculaire,
- (ii) Une activité sérique de la créatine kinase normale ou peu élevée (souvent inférieure à 5 fois la borne supérieure des valeurs usuelles),
- (iii) Un apport diagnostique faible de l'électromyographie, montrant une atteinte myopathique non spécifique,
- (iv) Une biopsie musculaire avec un aspect dystrophique,
- (v) Une IRM musculaire pouvant aider au diagnostic différentiel avec les autres myopathies. Les atteintes liées à une mutation du gène *LMNA* sont caractérisées par une infiltration adipocytaire, notamment au niveau du gastrocnémien.

5.4.1.1 Dystrophie musculaire d'Emery-Dreifuss

La dystrophie musculaire d'Emery-Dreifuss, abrégée EDMD, fut la première laminopathie décrite (221). Elle est caractérisée sur le plan clinique par trois symptômes principaux (31) :

- (i) Des rétractions précoces touchant d'abord les muscles fléchisseurs du coude, le tendon d'Achille puis les muscles cervicaux conduisant à une rigidité spinale. Ces symptômes apparaissent le plus souvent au début de l'adolescence.

- (ii) Une atrophie et une faiblesse musculaires atteignant les membres supérieurs et inférieurs (d'abord du haut des bras et du bas des jambes puis des épaules et des hanches)
- (iii) Une cardiomyopathie avec troubles de la conduction et du rythme cardiaque. Le pronostic de l'EDMD est lié à cette atteinte cardiaque.

Cette pathologie appartient au groupe des pathologies associées à des mutations dans des gènes codant des protéines de l'enveloppe nucléaire (ou « *envelopathies* » en anglais) telles que les lamines ou les protéines associées aux lamines comme l'émerine. La prévalence est estimée entre 0,13 et 0,2/100000 (31).

Historiquement, la première « enveloppathie » décrite et associée à un défaut musculaire squelettique est une EDMD causée par une mutation dans le gène *EMD*, codant l'émerine et appelée plus tardivement EDMD de type 1 (EDMD-1) ou liée à l'X (XL-EDMD). La forme de dystrophie musculaire d'Emery-Dreifuss liée à des mutations dans le gène *LMNA* est découverte plus tardivement et est alors appelée EDMD de type 2 (EDMD-2) ou autosomique dominante (AD-EDMD).

Cette forme est le plus souvent associée à des mutations faux-sens hétérozygotes du gène *LMNA* et donc à une expression d'une forme mutée de lamines A/C avec un effet dominant négatif. Des mutations non-sens du gène *LMNA* mais également des délétions ou des duplications de plus ou moins grande taille associées à une perte de fonction ont également été décrites (241,242). Ces mutations sont réparties sur la totalité de la séquence du gène *LMNA*.

Les symptômes musculaires décrits par les patients atteints d'AD-EDMD sont moins typiques que ceux décrits par les patients atteints d'XL-EDMD. Certains d'entre eux présentent un phénotype intermédiaire avec une expression tardive de la pathologie et une progression lente de la faiblesse musculaire et des rétractions alors que d'autres présentent un phénotype plus sévère avec une atrophie et une faiblesse musculaires généralisées et donc une perte de la marche très probable (242). Des problèmes de déglutition sont également décrits par certains patients.

Les symptômes cardiaques sont plus variables et plus difficiles à prédire dans la forme d'EDMD à transmission autosomique dominante et ne sont pas corrélés à l'atteinte musculaire squelettique. Chez les patients pour lesquels l'atteinte musculaire est plus discrète, la découverte d'une arythmie cardiaque voire d'une insuffisance cardiaque est le premier symptôme de l'EDMD et le diagnostic est suspecté en premier lieu par le cardiologue. Bien que les troubles de la conduction et les troubles du rythme supraventriculaires soient retrouvés dans les deux types de dystrophies musculaires d'Emery-Dreifuss, une cardiomyopathie, souvent dilatée mais pouvant être parfois restrictive, associée à un défaut de contractilité du ventricule gauche et à une diminution de la fraction d'éjection se développe dans les cas d'AD-EDMD. Cette cardiomyopathie peut conduire à une insuffisance cardiaque de progression rapide et nécessiter une transplantation cardiaque. Ainsi, les patients souffrant d'EDMD-2 sont à haut risque de mort subite à cause de cette arythmie ventriculaire pouvant précéder l'apparition de la cardiomyopathie proprement dite (242).

5.4.1.2 Dystrophie musculaire congénitale

Des mutations dans le gène *LMNA* ont également été associées à un phénotype de dystrophie musculaire congénitale (CMD). Cette pathologie, d'évolution très variable, est caractérisée par l'association d'un retard dans le développement moteur, d'une hypotonie congénitale et d'une faiblesse musculaire d'apparition progressive. On retrouve à la biopsie musculaire un aspect dystrophique caractéristique.

Historiquement, les patients souffrant de dystrophie musculaire congénitale avaient été initialement diagnostiqués comme atteints d'une forme d'apparition précoce d'EDMD-2. Cependant, certains symptômes caractéristiques de la dystrophie musculaire d'Emery-Dreifuss étant absents, ces cas ont été re-classifiés comme les premiers cas décrits de dystrophie musculaire congénitale causés par une mutation dans le gène *LMNA* (abrégés « L-CMD » pour « *LMNA-related congenital muscular dystrophy* ») (241,243).

Ensuite, en 2008, l'équipe de Susana Quijano-Roy rapporte 15 cas d'enfants non apparentés souffrant d'une dystrophie musculaire congénitale d'apparition précoce (dans la première année de vie) et portant une mutation hétérozygote *de novo* au sein du gène *LMNA* (223). Tous les enfants développaient le syndrome dit « de la tête tombante » (ou

« *dropped-head syndrome* ») au cours de leur première année causé par une faiblesse musculaire et axiale importante. Chez trois de ces enfants, une forme sévère de la pathologie était retrouvée avec une diminution des mouvements fœtaux *in utero*, un développement moteur retardé voire absent, une hypotonie sévère, une faiblesse musculaire axiale et des membres. Ces derniers ont finalement nécessité une ventilation mécanique et une arythmie cardiaque a été mise en évidence chez deux d'entre eux. Les douze autres enfants ont d'abord eu un développement moteur normal avec l'acquisition du contrôle de la tête et du tronc. Cependant, l'apparition d'une faiblesse des muscles extenseurs du cou était ensuite responsable de ce syndrome de la tête tombante.

Malgré cette sévérité variable, un tableau clinique commun à l'ensemble de ces enfants peut être décrit associant une faiblesse musculaire axiale sélective avec une perte des muscles cervico-axiaux, une rigidité rachidienne avec une lordose lombaire précoce et une insuffisance respiratoire nécessitant une ventilation mécanique pour dix d'entre eux. L'activité sérique de la créatine kinase (CK) était élevée dans tous les cas de L-CMD, témoin de l'atteinte musculaire. La biopsie musculaire réalisée chez tous les patients montrait une atrophie associée à une dispersion des fibres lentes oxydatives (dites de type 1).

5.4.1.3 Dystrophie musculaire des ceintures (LGMD-1B)

La dystrophie musculaire des ceintures de type 1B, abrégée « LGMD-1B » pour « *Limb-Girdle Muscular Dystrophy type 1B* », diffère de l'EDMD-2 par la distribution de l'atrophie et de la faiblesse musculaire qui est prédominante au niveau des ceintures scapulaire et pelvienne (244). Cependant, dans les stades tardifs de la maladie, le diagnostic différentiel entre ces deux pathologies peut être compliqué par l'apparition d'une faiblesse musculaire pelvienne dans les cas d'EDMD.

De plus, l'âge d'apparition de la dystrophie musculaire des ceintures est souvent plus tardif que dans l'EDMD avec un début des symptômes entre la troisième et la quatrième décennie (31,240).

	EDMD-2	LGMD-1B	L-CMD
Age d'apparition	2 ^{ème} -3 ^{ème} décade	3 ^{ème} -4 ^{ème} décade	< 2 ans
Faiblesse musculaire	Distribution scapulo-humero-péronéale	Ceintures scapulaires et pelviennes	Syndrome de la tête tombante
Rétractions	Fréquentes, épaules +++	Relativement fréquentes	Fréquentes (rachis, hanches, genoux et tendons d'Achille)
Atteinte cardiaque	Constante avec l'âge, après l'atteinte musculaire. Troubles de la conduction cardiaque +/- cardiomyopathie dilatée	Constante avec l'âge	Troubles de la conduction cardiaque
Insuffisance respiratoire	Rare	Rare	Très fréquente
Perte de la marche	Rare et tardive	Rare et tardive	Très fréquente
Atteinte axiale	Fréquente	Rare	Fréquente
Atteinte faciale	Rare	Très rare	Rare
Scoliose	Fréquente	Rare	Fréquente

Tableau II. Comparaison des phénotypes musculaires liés à des mutations dans le gène *LMNA*.

EDMD-2 : Dystrophie musculaire d'Emery-Dreifuss de type 2 ou à transmission autosomique dominante, LGMD-1B : Dystrophie musculaire des ceintures de type 1B, L-CMD : Dystrophie musculaire congénitale liée au gène *LMNA*. Modifié d'après Janin et Gache, 2018 (37).

5.4.1.4 Atteinte cardiaque

Des mutations dans le gène *LMNA* ont également été associées à des cas de cardiomyopathies dilatées familiales caractérisées par une transmission autosomique dominante (245). L'expressivité des symptômes est variable et comprend des blocs auriculo-ventriculaires d'apparition précoce, des arythmies ventriculaires et supraventriculaires ainsi que des cardiomyopathies dilatées (240). Ainsi, le terme de « *lamin A/C heart diseases* » (ou *LHD*) est utilisé pour décrire l'ensemble de ces symptômes. La mise en évidence de ces pathologies cardiaques liées à des mutations dans le gène *LMNA* est importante car le taux de mort subite cardiaque atteint 46% en l'absence de prise en charge avec notamment la pose d'un défibrillateur implantable (246).

Une étude européenne récente montre que, parmi les cardiomyopathies familiales, 6,2% d'entre elles sont dues à une mutation sur le gène *LMNA*. L'âge de la première consultation est de 42 +/- 16 ans et 46% des patients sont des femmes. La pénétrance est élevée (supérieure à 60%) et le phénotype sévère avec une forte incidence de transplantation cardiaque. Le quart des patients environ décèdent ou nécessitent une transplantation dans les 8 premières années de suivi. De plus, la progression est rapide avec une incidence annuelle de nouveaux symptômes de 9% après la diagnostic génétique (247).

En cas de suspicion de *LHD*, une étude familiale sur plusieurs générations est nécessaire à la recherche d'une histoire familiale de cardiomyopathies dilatées, de troubles progressifs de la conduction cardiaque, de morts subites inexplicées, de transplantations cardiaques ou de pathologies neuromusculaires. Le premier niveau d'investigation doit inclure un électrocardiogramme et un holter sur 24 heures. L'échocardiographie doit permettre de rechercher une dilatation même moyenne. Si le diagnostic est confirmé, la recherche de troubles neuromusculaires, endocriniens et/ou métaboliques doit être effectuée (248) (cf. Figure 26).

Atteinte	Exemples
Troubles de la conduction	Défaut de conduction intraventriculaire, diminution de l'amplitude de l'onde P, Bloc de branche gauche/droit, Bradycardie sinusale de repos, Sick sinus syndrome, Bloc auriculo-ventriculaire, arrêt sinusal
Troubles du rythme supraventriculaire	Tachycardie sinusale, fibrillation atriale, Flutter atrial, extrasystoles auriculaires
Troubles du rythme ventriculaire	Extrasystoles ventriculaires, bigéminisme, trigéminisme, tachycardie ventriculaire
Cardiomyopathie dilatée	Dysfonction ventriculaire gauche, élargissement du ventricule gauche
Dilatation atriale	Dilatation gauche et/ou droite
Complications thromboemboliques	Accident ischémique transitoire, Accident Vasculaire Cérébral, Embolie pulmonaire
Atteinte multisystémique	Augmentation de l'activité sérique des créatines kinases, Myopathie, Dystrophie musculaire, Rétractions des tendons et des articulations, Rigidité spinale, résistance à l'insuline, lipodystrophie, syndrome de vieillissement accéléré
Histoire familiale	Mort subite cardiaque, troubles de la conduction, cardiomyopathie dilatée, troubles du rythme, atteintes musculaires

Phénotype au diagnostic	Probabilité (basée sur une étude de la littérature)
Cardiomyopathie dilatée	Jusqu'à 5%
Cardiomyopathie dilatée et histoire familiale	5 à 10%
Cardiomyopathie dilatée et troubles de la conduction cardiaque	5%
Cardiomyopathie dilatée, histoire familiale de CMD et troubles de la conduction cardiaque	33%
Troubles de la conduction cardiaque seuls	0% (1 seule étude, 60 cas étudiés)
Troubles de la conduction cardiaque et histoire familiale de troubles de la conduction	25 à 80% (2 études : 1 cas sur 4 et 4 cas sur 5)
Fibrillation atriale	0,4%
Augmentation des CK et cardiomyopathie dilatée	0% (1 seule étude, 9 cas étudiés)

Figure 26. Critères diagnostiques dans les pathologies cardiaques liées au gène *LMNA*.

Certaines des probabilités rapportées ici sont basées sur de petites études publiées, les données peuvent ne pas être généralisables. La littérature sur les attributs lors de la première présentation et le statut génétique a été extraite à l'aide d'une recherche bibliographique PubMed sur les associations génotype-phénotype chez des patients porteurs de mutations du gène *LMNA*. Modifié d'après Captur *et al*, 2018 (248).

5.4.2 Modèles murins disponibles

Afin d'étudier les fonctions des lamines A/C, plusieurs modèles murins ont été générés tels que des souris inactivées pour le gène *Lmna* mais également des souris porteuses de mutations faux-sens.

En 1999, un premier modèle de souris inactivées pour le gène *Lmna* a été développé (143). Bien que n'ayant aucun phénotype à la naissance, ces souris *Lmna*-null développent une perte musculaire squelettique et une atteinte cardiaque proche de celle observée dans les cas humains d'EDMD. Ces souris décèdent entre six et huit semaines. Ce premier modèle a permis de mettre en évidence le rôle des lamines A/C dans l'intégrité nucléaire, l'organisation de la chromatine et la régulation de la transcription. Cependant, plus récemment, il a été montré que ces souris exprimaient une forme tronquée des lamines A/C, appelée lamine $\Delta 8-11$, qui peut être toxique pour la cellule en restant farnésylée (249).

Ces souris *Lmna* ^{$\Delta 8-11$} ont été également croisées avec une lignée de souris appelée « Immortomouse™ ». Les cellules musculaires de cette souris, tout comme ses autres types de cellules, ont la caractéristique d'être immortalisées de façon conditionnelle en exprimant une forme thermosensible de l'antigène large T du virus SV-40 sous le contrôle d'un promoteur sensible à l'interféron gamma (IFN γ). Ces myoblastes, appelées cellules H-2K, peuvent être gardées en prolifération avec un milieu de culture contenant de l'IFN γ et à +33°C pour respecter la thermosensitivité de l'antigène large T. Elles peuvent être différenciées en myotubes lorsqu'elles sont cultivées avec un milieu de culture pauvre en sérum et ne contenant pas d'IFN γ et à +37°C, l'antigène large T n'étant pas stable à cette température (250,251). Ce modèle, utilisé dans notre étude, permet d'obtenir un grand nombre de myoblastes et présente l'avantage d'un contrôle fin du passage de la prolifération en différenciation permettant une étude plus simple de cette étape (252).

D'autres modèles de souris inactivées pour le gène *Lmna* ont été décrits. Ces modèles, qui sont de réels modèles de souris *null*, présentent des phénotypes plus sévères liés à l'absence totale d'expression des lamines A/C. Parmi ces modèles, on trouve deux modèles pour lesquels les souriceaux meurent avant leur naissance (*Lmna*^{GT-/-} (253) et *Lmna* ^{Δ/Δ} (254)) et un modèle pour lequel les souriceaux décèdent avant leur dix-huitième jour de vie (*Zp3-Lmna* (140)).

Des modèles animaux *knock-in* ont été développés dans l'optique d'étudier les mécanismes physiopathologiques sous-jacents des laminopathies. Contrairement à l'homme chez qui les laminopathies sont des pathologies autosomiques dominantes et où donc les mutations sont trouvées à l'état hétérozygote, certaines mutations doivent être à l'état homozygote chez la souris pour obtenir un phénotype. On trouve ainsi :

- (i) La souris *Lmna*^{H222P/H222P} comme modèle de l'EDMD (204),
- (ii) La souris *Lmna*^{ΔK32/ΔK32} comme modèle des dystrophies musculaires congénitales (255,256). Il est à noter que ces souris présentent un phénotype à l'état homozygote (décès à deux semaines) mais également à l'état hétérozygote (décès après un an),
- (iii) La souris *Lmna*^{N195P/N195P} comme modèle de la cardiomyopathie dilatée (257).

5.4.3 Mécanismes physiopathologiques

Les lamines ainsi que les protéines qui leur sont associées jouent un rôle crucial dans le maintien de voies de signalisation impliquées dans le développement et l'homéostasie des muscles dont notamment la myogenèse embryonnaire et postnatale, dans la régénération musculaire et dans la réponse au stress mécanique.

5.4.3.1 Activation de la voie des MAP kinases

La sur-activation de la voie des MAP kinases a été mise en évidence dans le cœur des souris *Lmna*^{H222P/H222P} et concerne plus spécifiquement les kinases JNK, p38 α et ERK1/2. Cette activation aberrante a pu être détectée avant toute dysfonction cardiaque, suggérant ainsi que celle-ci était la conséquence d'une altération des lamines de type A (201,202,258).

Les voies des MAP kinases jouent un rôle central dans le contrôle de l'expression des gènes en réponse à la fixation sur des récepteurs présents à la surface des cellules de mitogènes extracellulaires, de facteurs de croissance ou de cytokines. Elles sont également activées indépendamment de ces récepteurs de surface par le stress osmotique, mécanique ou chimique tels que les espèces réactives de l'oxygène (ROS).

Elles permettent ainsi le contrôle de programmes cellulaires complexes tels que l'embryogénèse, la différenciation, la prolifération et la mort cellulaire.

Bien que cette hyperactivation de la voie ERK1/2 (*extracellular signal-regulated kinase*) ait été mise en évidence dans les cœurs de souris *Lmna*^{H222P/H222P} avant toute dysfonction cardiaque, les preuves permettant de faire le lien entre cette hyper-activation et l'altération du fonctionnement cardiaque restent peu nombreuses (259). Très récemment, il a été montré qu'une des conséquences de cette hyper-activation était la modulation de la dynamique du réseau d'actine par la cofiline 1 après liaison de la forme phosphorylée de ERK1/2 (pERK1/2) et phosphorylation sur le résidu Thr25 de la cofiline 1. Cette phosphorylation active sa fonction de dépolymérisation du réseau d'actine-F et influence ainsi l'organisation du sarcomère *in vitro*. Ainsi, il semble que la phosphorylation de la cofiline 1 par pERK1/2 joue un rôle important dans le développement de l'atteinte ventriculaire gauche dans les laminopathies et que la mise en évidence de drogues pouvant rétablir cette dynamique de l'actine soit une piste thérapeutique intéressante (259).

5.4.3.2 Altération de la réponse au stress mécanique

Comme déjà évoqué plus haut, dans les fibroblastes murins inactivés pour le gène *Lmna* ou pour le gène *Emd*, le stress mécanique est responsable de modification de l'expression de gènes cibles tels que *Egr1* et *Lex1* et d'augmentation de la fréquence de la mort cellulaire par apoptose (145,260).

De plus, chez les souris *Lmna*^{-/-}, les cardiomyocytes présentent une architecture nucléaire altérée et une perte de résistance au stress mécanique axial (144). Etant soumis à un stress mécanique axial continu du fait de la contraction cardiaque, cette fragilité nucléaire entraîne un risque de rupture nucléaire et donc une apoptose augmentée (144).

Il a également été montré que la voie de signalisation YAP (*yes-associated protein*) était activée de façon anormale dans des myoblastes de patients qui présentaient une altération de leur mécanosensitivité (193).

5.4.3.3 Dérégulation de la voie de signalisation pRb-MyoD

Les lamines de type A jouent un rôle crucial dans le contrôle du cycle cellulaire grâce à un de leur partenaires protéiques : le produit du gène rétinoblastome (*RB-1*) ou protéine Rb (pRb). Des expériences de co-immunoprécipitation sur des lysats de cellules en interphase et des études de liaisons *in vitro* ont permis de montrer que les lamines de type A, LAP2a et la forme hypophosphorylée de pRB formaient un complexe ternaire (116,261).

En l'absence de signaux mitogènes, la protéine pRb est hypophosphorylée. Elle peut ainsi se lier à E2F et permettre aux cellules de quitter le cycle cellulaire en inhibant la transcription des gènes cibles de E2F.

A l'inverse, en présence de signaux mitogènes, des kinases cycline-dépendantes vont hyperphosphoryler la protéine pRb. Elle ne pourra donc plus lier E2F qui deviendra libre d'activer la transcription de ses gènes cibles et le cycle cellulaire pourra alors se poursuivre.

Cependant, les données sur les conséquences de l'absence de lamines A/C sont contradictoires puisque des études rapportent une inhibition de la prolifération cellulaire (119,148,262) alors que d'autres rapportent une stimulation de la prolifération cellulaire (263,264).

Le mécanisme par lequel les lamines A/C et LAP2 α contrôlent la fonction de la protéine pRb reste mal compris. Cependant, plusieurs hypothèses ont été formulées (261) (Figure 27) :

- (i) Il a été montré qu'en l'absence de lamines A/C, la protéine pRb était dégradée par le protéasome (263). Ainsi, les lamines A/C pourraient permettre une stabilisation de la protéine pRb.
- (ii) Les lamines A/C pourraient jouer le rôle de plateforme de phosphorylation de pRb par pp2A.
- (iii) Le complexe ternaire entre LAP2 α , lamines A/C et la forme hypophosphorylée de la protéine pRb pourrait jouer un rôle important dans l'inhibition de l'expression des gènes cibles de E2F.
- (iv) L'interaction de pRb avec les lamines pourrait être important pour le maintien de la protéine Rb dans son état hypophosphorylé.

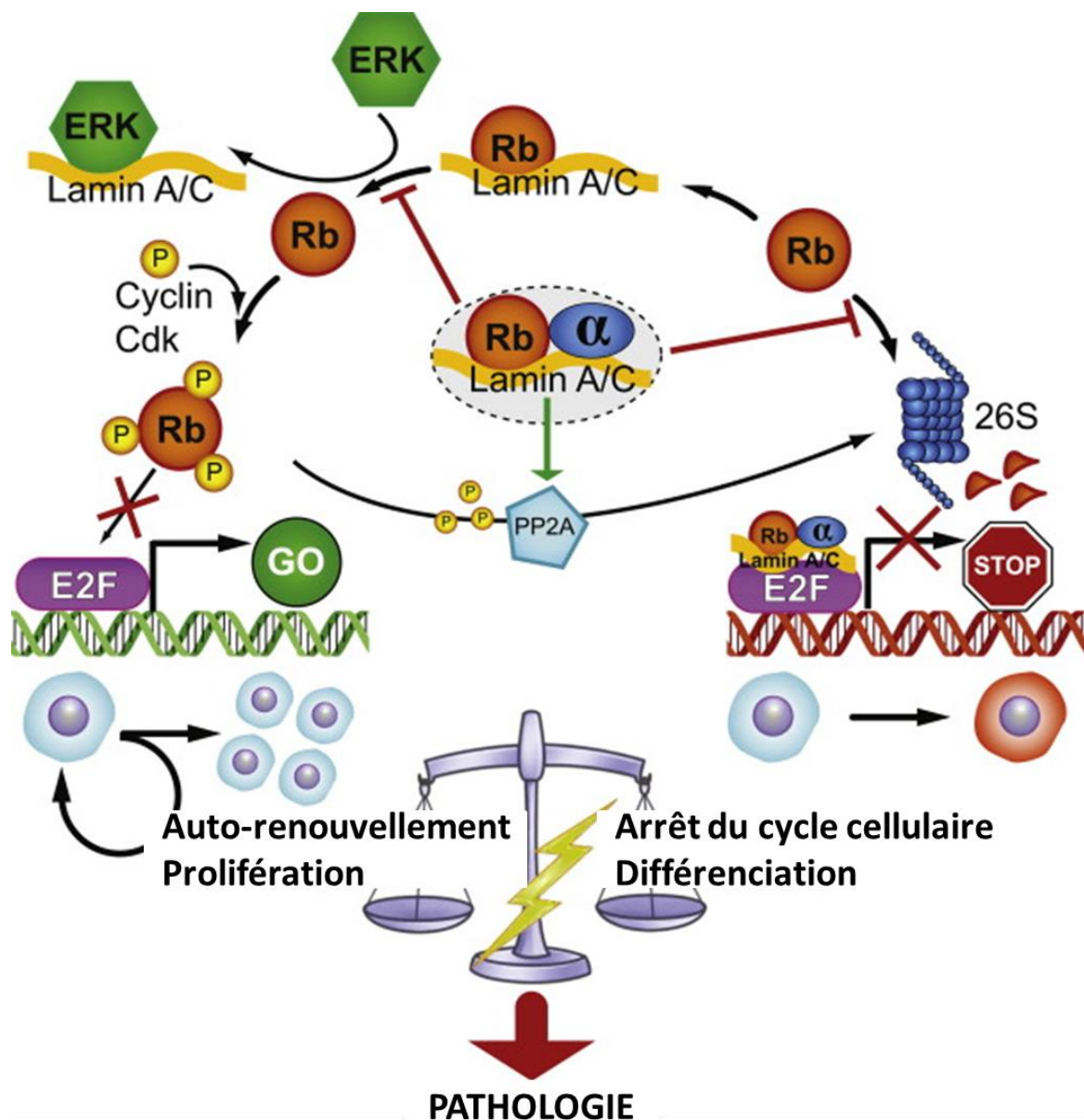


Figure 27. Les lamines de type A et LAP2a affectent la fonction de pRb dans le contrôle du cycle cellulaire par plusieurs mécanismes.

Les lamines de type A et LAP2 α affectent les fonctions de régulation du cycle cellulaire par la forme phosphorylée de la protéine Rb par plusieurs mécanismes équilibrant ainsi la prolifération et l'auto-renouvellement avec la différenciation des cellules souches adultes. Les perturbations des lamines A/C et/ou LAP2 α peuvent entraîner un déséquilibre entre ces destins cellulaires et être responsable de pathologies. Modifié d'après Gesson *et al.* 2014 (261).

Dans le contexte de la différenciation musculaire, la forme active hypophosphorylée de la protéine Rb forme un complexe ternaire avec les lamines de type A et LAP2 α . Ce complexe va permettre l'activation de gènes cibles de MyoD, facteur de transcription myogénique crucial. A l'inverse, la forme hyperphosphorylée de pRb ne permet pas la formation de ce complexe, la myogénèse est alors inhibée. Ainsi, dans les souris *Lmna*-null, il a été montré que ces cellules avaient une prolifération augmentée et que cette voie pRb/MyoD était dérégulée et responsable d'une dérégulation de l'expression de MyoD, desmine et M-cadhérine (265).

5.4.3.4 Diminution de l'activation de la voie de signalisation WNT/ β -caténine

Il y a de plus en plus de preuves sur l'implication des lamines A/C dans la régulation de la voie de signalisation WNT/ β -caténine.

En 2015, le contrôle du niveau de β -caténine intranucléaire par les lamines A/C pendant la différenciation mésenchymale des cellules souches est démontré (266).

Ensuite, une dérégulation de la voie est objectivée dans des fibroblastes primaires embryonnaires et adultes isolés d'un modèle murin de progeria de Hutchinson-Gilford (ou HGPS pour « *Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome* »), la souris *Lmna*^{L530P/L530P} également appelée *Lmna* ^{$\Delta 9/\Delta 9$} (267,268).

De plus, deux protéines interagissant avec les lamines A/C jouent un rôle dans la régulation de cette voie :

- La nesprine 2 est cruciale pour la localisation nucléaire de la β -caténine et donc agit comme un activateur de la voie (269),
- L'émerine interagit avec la β -caténine, contrôle son export nucléaire et agit donc comme un inhibiteur de la voie (239). Il a également été montré que des mutations dans le gène *EMD* étaient responsables d'une hyper-activation de la voie WNT/ β -caténine dans le cœur (270).

En 2017, l'équipe d'Antoine Muchir a montré que la voie WNT/ β -caténine est dérégulée dans le cœur des souris *Lmna*^{H222P/H222P} et l'expression des protéines WNT et β -caténine est diminuée. Cette diminution est corrélée à l'augmentation de l'expression des protéines solubles *Frizzled-related* qui sont des inhibiteurs extracellulaires de la voie. Ils ont également montré que l'expression de la connexine 43, protéine des disques

intercalaires des cardiomyocytes, était plus faible tout comme son niveau de phosphorylation. De plus, l'activation pharmacologique de la voie WNT/ β -caténine par le 6-bromoindirubin-3'-oxime améliore la contractilité cardiaque des souris et leur conduction intraventriculaire ainsi que l'expression myocardique de la connexine 43 (271).

5.4.3.5 Altération de la voie de signalisation TGF β

Les preuves de l'altération de cette voie de signalisation sont de plus en plus nombreuses et ont été obtenues à partir de plusieurs modèles différents de laminopathies :

- (i) Chez la souris *Lmna*-null, la phosphorylation des Smad2 et Smad3, messagers intracellulaires de la voie de signalisation TGF β en réponse à la fixation extracellulaire du ligand présente une cinétique altérée dans les fibroblastes embryonnaires (264),
- (ii) chez les souris *Lmna*^{H222P/H222P}, des niveaux de phosphorylation augmentés de Smad2 et Smad3 ont été décrits dans les noyaux de muscles squelettiques mais également dans le muscle cardiaque. Ceci s'accompagne d'une translocation nucléaire du complexe effecteur de la voie, pSmad2/3-Smad4, dans le noyau de ces cellules (204),
- (iii) enfin, dans le modèle de myoblastes conditionnellement immortalisés dérivés de la souris *Lmna* ^{Δ 8-11} (myoblastes H-2K), un niveau augmenté d'expression des Smad2 et 3 a également été rapporté et associé à une distribution anormale dans la cellule avec une translocation nucléaire augmentée. La voie ne semble également plus répondre à une stimulation par ajout de TGF β dans le milieu de culture. De plus, l'inhibition de la voie de signalisation permet de réduire la mort cellulaire et d'augmenter la fusion des myoblastes (205).

Il semble alors qu'une expression altérée des lamines A/C soit à l'origine d'une dérégulation des voies de signalisation Smads-dépendantes, comme la voie TGF β . Le mécanisme moléculaire sous-jacent pourrait être lié à l'incapacité de MAN1 à se lier et donc à réguler les Smads lorsque l'intégrité de l'enveloppe nucléaire est atteinte (272).

5.5 Atteinte multisystémique : le vieillissement accéléré

Le dernier groupe de laminopathies implique des défauts dans des organes multiples et mime un vieillissement accéléré. Plusieurs pathologies sont regroupés dans ce groupe dont le syndrome d'Hutchinson-Gilford (*HGPS* pour « *Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome* ») qui provoque les phénotypes les plus graves (273,274).

Les enfants atteints paraissent normaux à la naissance, les premiers symptômes du vieillissement accéléré apparaissent pendant les premières années de vie : retard de croissance, alopecie, dermatopathie restrictive, dentition retardée et atteinte cardiovasculaire sévère avec athérosclérose coronaire progressive. Cette composante cardiovasculaire est très souvent responsable d'un décès prématuré, en moyenne à l'âge de 13 ans (31,222,275).

Le principal mécanisme physiopathologique sous-jacent est un épissage anormal des transcrits primaires du gène *LMNA* dû à la présence d'une mutation ponctuelle *de novo* située dans l'exon 11 du gène : p.Gly608Gly (NM_170707.2:c.1824C>T). Cette mutation aboutit à l'activation d'un site cryptique d'épissage induisant un épissage altéré et la délétion de 50 acides aminés du domaine C-terminal de la lamine A. Ceci induit l'accumulation d'une forme tronquée d'un précurseur des lamines A, appelée « progérine » (275,276) (Figure 28).

Plus récemment, une forme atypique agressive d'HGPS néonatale sans accumulation de progérine a été décrite. L'étude moléculaire a permis de mettre en évidence l'association de deux mutations ponctuelles hétérozygotes *de novo* : p.Glu55Lys (NM_170707.2:c.163G>A) et p.Glu55Gly (NM_170707.2:c.164A>G) (277).

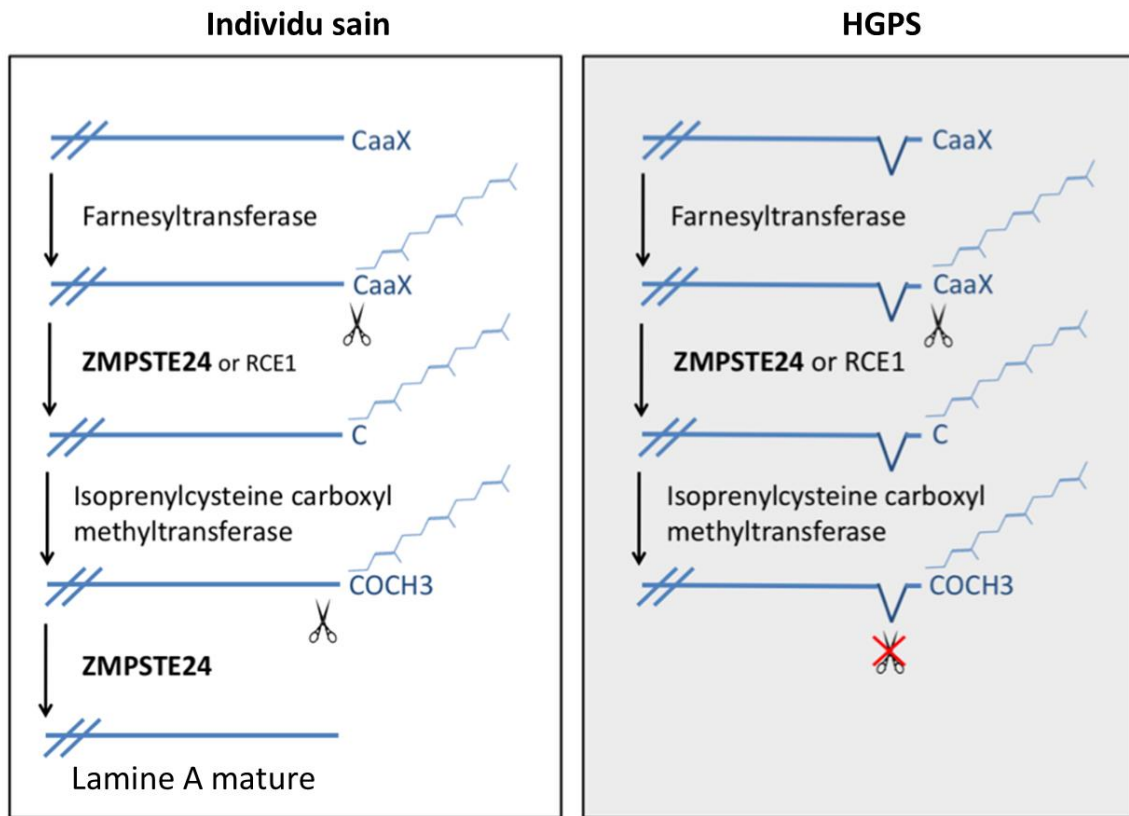


Figure 28. Représentation schématique de la maturation anormale des lamines A dans le syndrome d'Hutchinson-Gilford.

La maturation de la prélamine A est une succession de réactions enzymatiques conduisant à une forme mature de la lamine A. La première étape est la farnésylation d'un résidu cystéine pour obtenir une forme farnésylée de la prélamine A. Ensuite, une protéase (ZMPSTE24 ou RCE1) coupe les résidus aaX de la queue C-terminale. Enfin, la protéase ZMPSTE24 coupe les 15 derniers résidus de l'extrémité C-terminale pour obtenir une lamine A mature. Chez les cellules de patients atteints du syndrome de Hutchinson-Gilford Progeria (HGPS), le dernier clivage par ZMPSTE24 n'a pas lieu, ce qui entraîne une accumulation anormale de lamine farnésylée. Modifié d'après Janin *et al.* 2017.

6 La voie de signalisation BMP (*Bone Morphogenetic Protein*)

6.1 La superfamille du TGF β

La voie de signalisation TGF β (pour *Transforming Growth Factor β*) joue un rôle central chez les métazoaires depuis les premiers stades du développement embryonnaire jusqu'au maintien et à la régénération des tissus adultes matures. Cette voie exerce son contrôle sur un large panel de processus biologiques grâce à la régulation de la transcription de gènes cibles qui contrôlent la prolifération, la différenciation, la mort, l'adhésion, le mouvement et le positionnement cellulaire (278–280).

Identifiée au début des années 1980 (281–283), le mécanisme de transduction du signal n'a été décrit que dans le début des années 1990 (284–286). Ce nom de « facteur de croissance transformant » a été choisi parce que le TGF β a été identifié parmi les protéines sécrétées par des fibroblastes transformés. Le facteur identifié était capable d'induire un échappement aux contrôles cellulaires de la prolifération et donc d'induire un phénotype cellulaire « transformé ». Il a ainsi été conclu que le TGF β était sécrété spécifiquement par les cellules cancéreuses (281).

Depuis, il y a plus de 33 membres décrits dans cette superfamille du TGF- β incluant ainsi le TGF β lui-même, les protéines de la famille des BMP (*Bone Morphogenetic Proteins*), les protéines de la famille des GDF (*Growth and Differentiation Factors*) ou encore les activines et la myostatine (cf. Figure 29). Les différences structurales principales entre les membres de la superfamille du TGF β résident dans le nombre et la localisation des résidus cystéines dans la structure de la protéine matures. Par exemple, le TGF β , l'inhibine β et les activines possèdent neuf résidus cystéines alors que les BMPs, les GDFs et l'inhibine α n'en possèdent que sept. Quoiqu'il en soit, un de ces résidus entre dans la formation de pont disulfure permettant la dimérisation des ligands (287).

NON LIBRE DE DROIT

Figure 29. Arbre phylogénique des membres de la superfamille du TGF chez l'homme.

L'arbre a été construit sur la base d'un alignement des domaines C-terminaux matures (288).

Les ligands sont synthétisés sous la forme de pré-pro-peptides inactifs puis clivés dans l'appareil de Golgi pour donner un peptide mature dimérique. Dans la cellule, ce peptide mature est séquestré par la protéine LAP (pour « *latency associated protein* ») pour former un complexe appelé SLC pour « *small latent complexe* ». Le SLC est lui-même séquestré par des protéines LTBP (pour « *latent TGF- β binding proteins* ») qui peuvent se lier à des protéines de la matrice extracellulaire formant ainsi un complexe retrouvé dans les vésicules sécrétoires appelé LLC pour « *large latent complexe* » (cf. Figure 30). Le TGF β est secrété sous la forme d'un complexe LLC inactif et est donc séquestré dans le tissu conjonctif, formant ainsi un réservoir de TGF β inactif (289).

Son activation peut être réalisée :

- (i) par des protéases de type élastase (290) et calpaïne (291)
- (ii) par clivage de la protéine LAP par des métalloprotéases BMP1-like (292)
- (iii) par interaction de la protéine LAP avec des protéines de la matrice extracellulaire (293) ou des intégrines présentes à la surface des cellules voisines (294).

Ce cycle d'activation/inactivation est un mécanisme de contrôle spatial et temporel de l'activité du TGF β . Bien qu'étudié essentiellement dans la sous-famille du TGF β , ce mécanisme demeure largement incompris. On sait qu'il concerne également BMP7, GDF11 et la myostatine (295,296), les autres ligands étant aussi synthétisés sous la forme de pré-pro-peptides dimériques mais directement clivés et maturés dans la cellule et donc secrétés sous une forme mature (297).

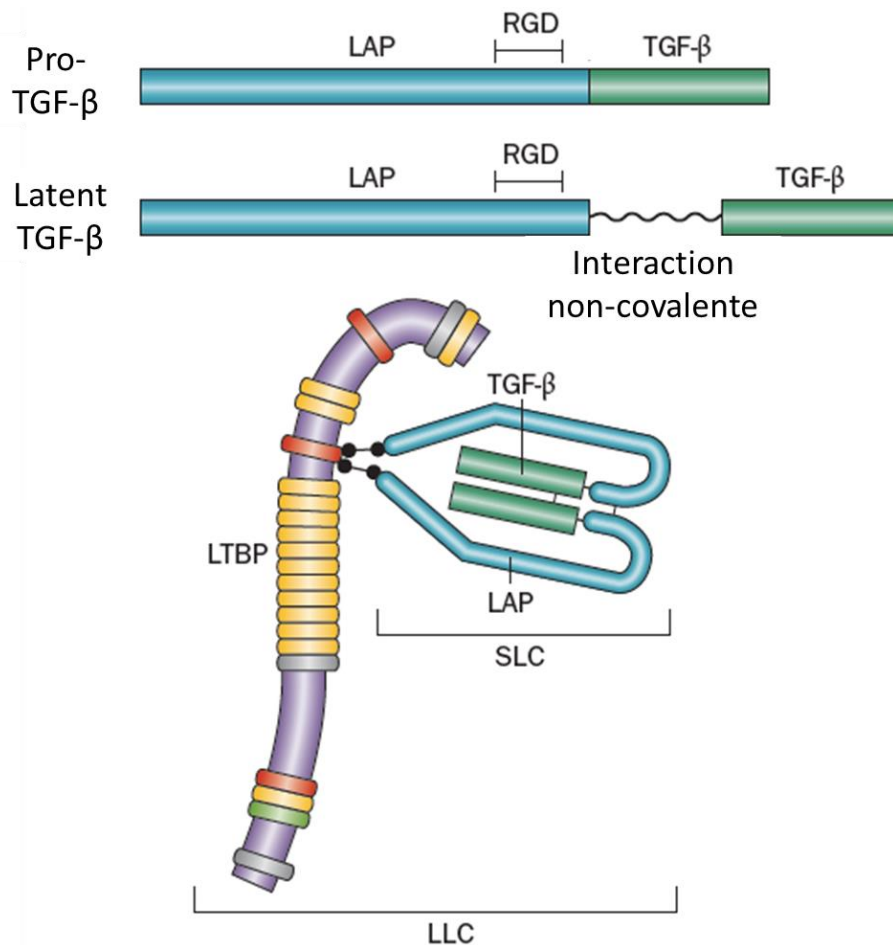


Figure 30. Maturation et séquestration du TGF- β .

Le pro-TGF- β est clivé de manière intracellulaire par une protéase à furine. Dans la cellule, ce peptide mature est séquestré par la protéine LAP pour former un complexe appelé SLC qui est lui-même séquestré par des protéines LTBP qui peuvent se lier à des protéines de la matrice extracellulaire formant ainsi un complexe retrouvé dans les vésicules sécrétoires appelé LLC. Le TGF β est secrété sous la forme d'un complexe LLC inactif et est donc séquestré dans le tissu conjonctif, formant ainsi un réservoir de TGF β inactif. Abréviations: LAP, propeptide associé à la latence; LLC, grand complexe latent; LTBP, protéine de liaison au TGF- β latente; RGD, motif Arg - Gly - Asp; SLC, petit complexe latent; TGF- β , facteur de croissance transformant- β . Modifié d'après Lafyatis, 2014 (289).

6.2 Les voies de signalisation canoniques du TGF β et des BMP

La transduction du signal passe tout d'abord par la fixation sur un complexe de récepteurs dont la structure comprend un domaine extracellulaire variable mais riche en cystéines, un unique domaine transmembranaire et un domaine intracellulaire très conservé à activité sérine-thréonine kinase (298).

On distingue deux classes fonctionnelles de récepteurs :

- (i) les récepteurs de type 1, au nombre de sept et qui sont également appelés *Alks* (pour « *Activating receptor-like kinases* »)
- (ii) les récepteurs de type 2, au nombre de cinq. Les ligands de la superfamille du TGF β peuvent se lier sélectivement à différentes combinaisons de récepteurs (299) (Tableau III).

En l'absence de ligands, les récepteurs de type I et de type II demeurent sous la forme d'homodimères à la surface de la cellule. La fixation du ligand induit la formation d'un complexe hétérotétramérique stable composé de deux récepteurs de chaque type. Ceci induit la phosphorylation de nombreux résidus sérines et thréonines appartenant à un domaine GS (pour « *Gly-Ser rich* ») situé juste au-dessous du domaine transmembranaire du récepteur de type I par l'activité kinase constitutive du récepteur de type II, provoquant ainsi son activation (287,300) (Figure 31).

La transduction intracellulaire du signal est médiée par la phosphorylation d'une famille de protéine appelée R-SMADs (pour « *Receptor-regulated SMADs* ») par le récepteur de type I activé sur deux résidus sérines situés à leur extrémité C-terminale. Les SMADs sont des facteurs de transcription qui naviguent sans cesse entre le cytoplasme et le noyau de la cellule. On trouve huit SMADs, classés en trois catégories :

- (i) cinq R-SMADs que sont les SMAD1, SMAD2, SMAD3, SMAD5 et SMAD8,
- (ii) un Co-SMAD qui est le SMAD4,
- (iii) deux I-SMADs (pour « *Inhibitory SMAD* ») que sont les SMAD6 et SMAD7 (287,297,301) (Figure 31).

La phosphorylation sélective des R-SMADs par les récepteurs de type I permet la création d'un site de liaison pour le Co-SMAD, SMAD4, et donc la formation d'un complexe hétérotrimérique composé de deux phospho-R-SMADs et d'un SMAD4. Ce complexe va ainsi être capable de transloquer dans le noyau et donc, via l'interaction avec des facteurs de transcription, des complexes de remodelage de la chromatine (le complexe SW1-SNF par exemple) ou encore des histone acétyltransférases (p300 et CBP par exemple), de réguler la transcription de gènes cibles (302–304).

Parmi les éléments cis-régulateurs, on retrouve deux séquences distinctes en fonction des voies mises en jeu. Pour le R-SMAD3, la séquence cis-régulatrice est appelée SBE (pour « *Smad-Binding Element* ») et est une séquence palindromique de 8 pb (5'-GTCTAGAC-3'). Les R-SMAD1/5/8 se lient quant à eux préférentiellement à des séquences riches en GC appelées BRE (pour « *BMP-Responsive Element* »). Pour exemple, une séquence BRE a été identifiée au niveau de gènes cibles de la voie BMP tels que *ID1* (pour « *Inhibitor of Differentiation* » ou « *Inhibitor of DNA binding* ») ou *SMAD6* (305,306). De plus, des expériences de gène rapporteur ont permis d'établir que le BRE identifié au niveau du promoteur du gène *ID1* n'était capable de répondre qu'à une stimulation par la voie de signalisation BMP spécifiquement et non à une stimulation par la voie du TGF- β (307). Le niveau de transcription du gène *ID1* constitue donc un excellent rapporteur d'activité de la voie de signalisation BMP spécifiquement.

Voie	BMP	GDF		Activines	TGFβ	Inhibiteurs
Ligands	BMP2, 4 BMP5, 6, 7 BMP8A, 8B BMP9, 10	GDF5, 6, 7 GDF9b GDF10, 11 GDF15	GDF1 GDF3 GDF8 GDF9	Inhibine βA Inhibine βB Nodal	TGFβ1 TGFβ2 TGFβ3	BMP3 Inhibine α Inhibine βC, Inhibine βE, LEFTYA, LEFTYB
Récepteurs de type I	BMPR1A (ALK3) BMPR1B (ALK6) ALK1 ALK2	BMPR1A (ALK3) BMPR1B (ALK6) ALK2	ActRIB (ALK4) ALK7 TβRI (ALK5)	ActRIB (ALK4) ALK7	TβRI (ALK5)	N/A
Récepteurs de type II	BMPRII	BMPRII ActRIIA, ActRIIB		ActRIIA, ActRIIB	TβRII	N/A
R-SMADs	SMAD1, 5, 8	SMAD1, 5, 8	SMAD2, 3	SMAD2, 3	SMAD2, 3	N/A
Co-SMAD	SMAD4	SMAD4		SMAD4	SMAD4	N/A
I-SMAD	SMAD6	SMAD6, 7		SMAD7	SMAD7	N/A

Tableau III. Classification des ligands, des récepteurs de type I et de type II et des SMADs parmi les différentes familles des voies TGFβ.

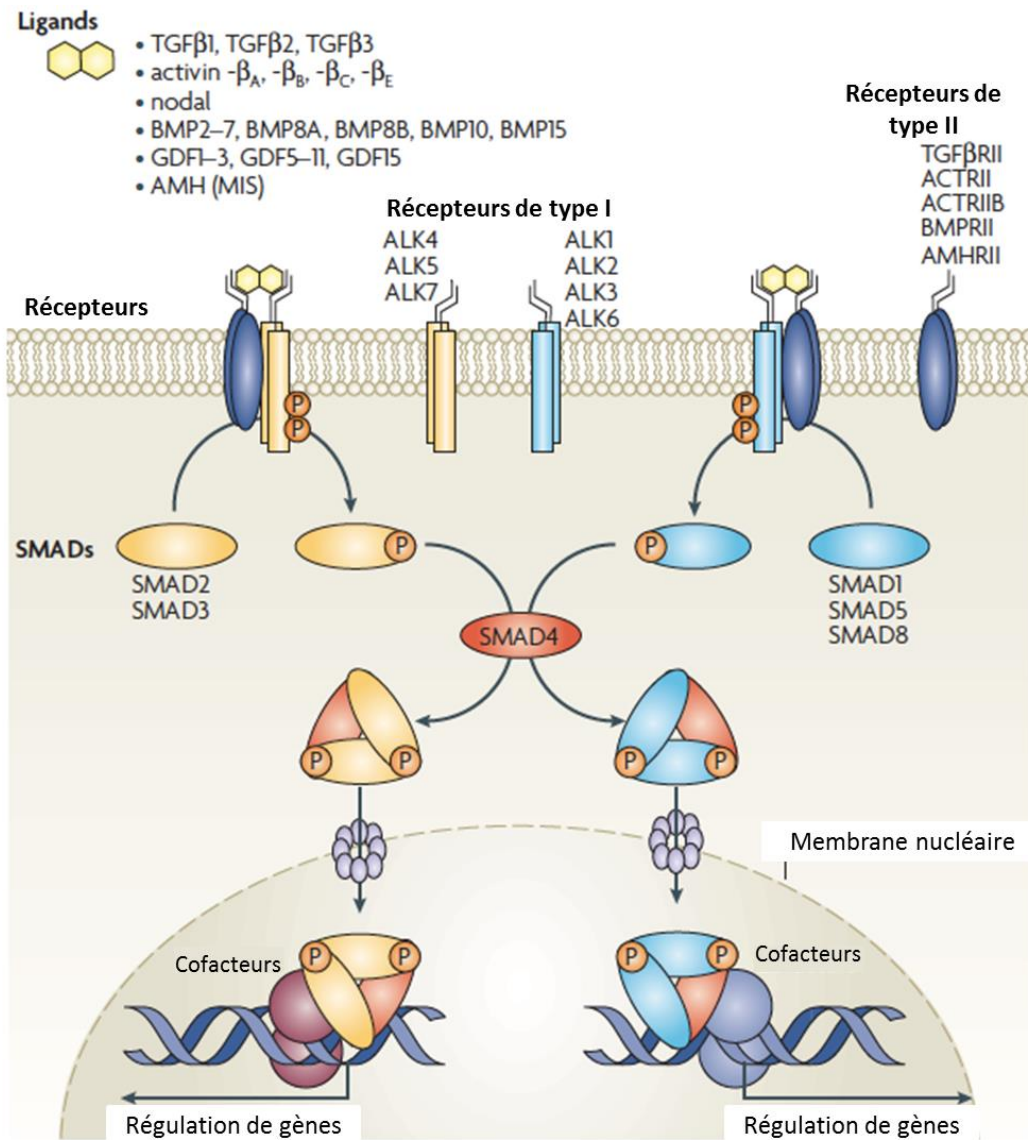


Figure 31. Les voies de signalisation de la superfamille du TGFβ SMAD-dépendantes.

La liaison des ligands aux récepteurs de type II et le recrutement de récepteurs de type I impliquent une complexité combinatoire élevée. Traditionnellement, les ligands ont été divisés en deux groupes: les TGFβ activant SMAD2 et SMAD3, les activines et les nodales, et les BMP, les GMP et l'AMH activant SMAD1, SMAD5 et SMAD8. Cependant, la voie se divise uniquement en deux branches distinctes en aval des récepteurs de type I: ALK4, ALK5 et ALK7 phosphorylent spécifiquement les SMAD2 et SMAD3, alors que ALK1, ALK2, ALK3 et ALK6 phosphorylent spécifiquement les SMAD1, SMAD5 et SMAD8. La formation de complexes des SMAD phosphorylés avec SMAD4 provoque l'accumulation nucléaire de complexes SMAD actifs, qui régulent directement la transcription des gènes en conjonction avec des facteurs de transcription, des complexes de remodelage de la chromatine et des enzymes modifiant l'histone. ACTR, récepteurs d'activine; ALK, kinase apparentée au récepteur de l'activine; AMH, hormone anti-muellerienne; BMP, protéines morphogénétiques osseuses; GDF, facteurs de croissance et de différenciation; TGFβs, ligands du facteur de croissance transformant-β. Modifié d'après Schmierer et Hill, 2007 (297).

6.3 Les voies de signalisation non canoniques du TGF β et des BMP

L'identification de la signalisation intracellulaire médiée par les SMADs ne résout pas complètement la question sur la façon dont il pouvait exister des fonctions aussi diverses de la superfamille du TGF β avec un modèle intra-cellulaire aussi simple.

Bien que la compréhension fine de cette superfamille soit encore incomplète, il y a de plus en plus de preuves montrant que la diversité des fonctions attribuées à la superfamille du TGF β résulte en partie de la multitude de combinaisons possibles entre les ligands, les récepteurs membranaires, les SMADs ou encore les facteurs de transcriptions mis en jeu. Cette diversité résulte également de l'interaction avec d'autres voies de signalisations et de la capacité des ligands de la superfamille du TGF β d'activer d'autres voies de signalisations qui n'utilisent pas les SMADs comme support de transduction intracellulaire. Ces autres voies de signalisation pouvant être activées par les ligands de la superfamille du TGF β sont qualifiées de « voies de signalisation non canoniques du TGF β » (pour « *non-canonical TGF- β pathways* ») ou « voies de signalisation indépendantes des SMADs » (pour « *Smad-independent TGF- β pathways* »). Ces voies sont activées par les récepteurs décrits plus haut soit par phosphorylation soit par interaction directe (308–310).

Les mécanismes de la balance entre la voie canonique et les voies non-canoniques ainsi que les mécanismes de contrôle de cette balance demeurent obscurs. Parmi ces voies de signalisation non canoniques du TGF β , on retrouve, de façon non exhaustive (311) :

- (i) La voie des MAP kinases (« *mitogen-activated protein kinases* ») : MAPKs p38, ERK and JNK (312,313) ;
- (ii) La voie des petites GTPases Rho-like ;
- (iii) La voie JAK/STAT ;
- (iv) La voie PI3K/Akt.

6.4 La voie de signalisation BMP : physiologie

6.4.1 Du concept de « *Bone Morphogenetic Proteins* » à celui de « *Body Morphogenetic Proteins* »

L'activité ostéogénique des facteurs BMP a été identifiée pour la première fois en 1965 mais, les protéines responsables de l'induction osseuse ne seront connues qu'à la fin des années 1980 avec la purification et le séquençage du BMP3 bovin et avec le clonage de la forme humaine de BMP2 et de BMP4 (314–316).

Depuis, plus de vingt protéines appartenant à cette famille BMP ont pu être identifiées (Tableau IV). Elles sont caractérisées par des profils d'expression différents en terme de temporalité et de tissu-spécificité et sont donc impliquées dans des processus morphogénétiques distincts (317), comme :

- (i) Le contrôle de l'architecture tissulaire depuis le stade embryonnaire jusqu'aux cellules souches (318,319),
- (ii) La régulation de la prolifération, de la différenciation et de l'apoptose (320,321),
- (iii) La régénération et l'homéostasie tissulaire notamment au niveau articulaire (322), de la réparation osseuse après une fracture (323,324), du remodelage vasculaire (325), de l'hématopoïèse ou encore au niveau du métabolisme du fer (326,327).

Ainsi, lors du premier workshop sur la voie de signalisation BMP organisé à Berlin en 2009, il a été suggéré de modifier la signification de l'acronyme BMP en « *body morphogenetic proteins* » (328).

Ligand	Synonyme	Récepteurs	Expression tissulaire
BMP-2	BMP-2A	ALK-3,-6; Endogline; TGFP-RIII; Act-RIIA, -RIIB	Os, vaisseaux sanguins, muscle, cartilage, dents, foie, Cœur, sperme, follicules pileux
BMP-3	Ostéogénine	ALK-4, Act-RIIB	Poumons, rein, os, cartilage, dents
BMP-4	BMP-2B	ALK-3, -6; Act-RIIA; BMPR-II; TGFP-RIII	Os, muscle, utérus, cartilage, dents, rein, intestine, glandes salivaires, foie, pancréas, poumons, Cœur, ovaires, sperme, follicules pileux
BMP-5	-	-	Os, cartilage, rein, uretère, pancréas, poumon, cœur
BMP-6	Vgr-1	ALK-2, -3, -6; Act-RIIA,-RIIB; BMPR-II	Cœur, cartilage, uretère, pancréas, ovaires, épiderme, foie
BMP-7	Op-1	ALK-3, -6; Act-RIIA,-RIIB; BMPR-II	Rein, os, synovie, Œil, glande salivaire, foie, pancréas, poumon, Cœur, ovaires, sperme, épiderme
BMP-8	Op-2, BMP8b	-	Os, ovaires, sperme
BMP-9	GDF-2	ALK-1, -2; Act-RIIA,-RIIB; BMPR-II; Endogline	Foie, système nerveux central
BMP-10	-	ALK-1,-3, -6; Act-RIIA,-RIIB; BMPR-II	Cœur
BMP-11	GDF-11	ALK-4, -5, -7; Act-RIIA,-RIIB	Système nerveux central
BMP-12	GDF-7, CDMP-3	ALK-3, -6; Act-RIIA; BMPR-II	Tendons, cartilage, système nerveux central
BMP-13	GDF-6, CDMP-2	ALK-3, -6; BMPR-II	Tendons, cartilage
BMP-14	GDF-5, CDMP-1	ALK-6; Act-RIIA, -RIIB; BMPRII; TGFP-RIII	Cartilage, synovie, œil
BMP-15	GDF-9B	ALK-6; Act-RIIA; BMPR-II	Ovaires

Tableau IV. Tableau récapitulatif des ligands de la famille BMP, leurs récepteurs et leurs expressions tissulaires.

Activin receptor-like kinase (ALK) ; Récepteur BMP de type II (BMPR-II) ; Récepteur à l'activine de type II (ActRII) ; transforming growth factor receptor III (TGF-RIII) ; inconnu (-). Modifié d'après Krause *et al*, 2011 (329).

6.4.2 La régulation extracellulaire de la voie de signalisation BMP

Les molécules de la famille des BMP sont des morphogènes et peuvent induire des réponses cellulaires différentes en fonction de leur concentration (330,331). Ainsi, la voie de signalisation BMP est très régulée tant au niveau extracellulaire qu'au niveau intracellulaire.

Différentes molécules solubles ont été décrites comme des antagonistes de la voie de signalisation BMP. Elles ont la capacité de se lier directement aux ligands et donc de réguler leur diffusion et leur fixation aux récepteurs cibles. Ces régulateurs solubles présentent des spécificités plus ou moins importantes et peuvent donc se lier aux différents ligands avec des affinités propres.

D'abord, la follistatine peut se lier aux molécules BMP2, BMP4 et BMP7. Cette glycoprotéine monomérique forme ainsi un complexe ternaire non fonctionnel avec le ligand BMP et son récepteur (332). Ce mécanisme est par exemple mis en jeu dans la détermination dorso-ventrale chez l'embryon ou dans la croissance musculaire embryonnaire (333). Cette molécule a une spécificité faible de la voie BMP car elle peut également se lier à d'autres ligands de la superfamille du TGF β puisque elle présente un maximum d'affinité pour l'activine (334) et une forte affinité pour la myostatine (335).

La noggine, un second antagoniste de la voie BMP, a également été décrit dans la formation de l'axe dorso-ventral (336). Cette glycoprotéine homodimérique peut se lier à BMP2 et à BMP4, mais également aux BMP5, BMP6, BMP7, BMP13 et BMP14 avec une affinité plus faible, et ainsi bloquer l'interaction avec leurs récepteurs (329). De plus, grâce à son interaction avec les héparanes sulfates présents dans la matrice extracellulaire, la noggine permet le stockage et la réalisation de gradients de BMP.

La chordine, comme la noggine, est un antagoniste de la voie des BMP par liaison direct aux BMP2, BMP4 et BMP7. Elle joue un rôle crucial pendant le développement embryonnaire (337).

Enfin, la gremline (Grem1) peut également inhiber la voie des BMP. Cette glycoprotéine peut s'associer aux BMP2 et BMP4 et est impliquée dans la croissance embryonnaire (338,339).

6.4.3 La régulation intracellulaire de la voie de signalisation BMP

Le rétrocontrôle négatif de la voie BMP passe par les deux SMADs inhibiteurs (également appelés I-Smads) que sont SMAD6 et SMAD7. Alors que SMAD7 agit comme répresseur à la fois des voies de signalisation TGF β et BMP, SMAD6 agit préférentiellement sur la voie BMP (305,340,341). En effet, les formes phosphorylées des SMAD2 et SMAD3 augmentent l'expression du gène *SMAD7* (342) alors que celles des SMAD1 et SMAD5 augmentent l'expression du gène *SMAD6* (305).

Ces I-SMADs peuvent inhiber la voie BMP par deux mécanismes : (i) interaction directe avec les récepteurs de type 1 ou (ii) interaction avec le Co-SMAD, SMAD4. Par exemple, l'activité inhibitrice de SMAD6 repose sur plusieurs mécanismes (Figure 32) :

- (i) SMAD6 peut se lier aux récepteurs de type 1 et ainsi inhiber la phosphorylation des SMADs 1, 5 et 8 (343,344) ;
- (ii) SMAD6 peut se lier à SMAD1 et interférer dans la formation du complexe avec SMAD4 (345) ;
- (iii) SMAD6 peut recruter Smurf1 (*Smad ubiquitin regulatory factor 1*), une E3 ubiquitine ligase au niveau du complexe des récepteurs membranaires et induire la dégradation des récepteurs de type 1 et des SMADs 1, 5 et 8 par la voie ubiquitine-protéasome (346)
- (iv) SMAD6 peut directement interagir avec certains facteurs de transcriptions et les histones désacétylases HDAC1 et HDAC3 pour inhiber la transcription de gènes cibles tels que CtBP (*C-terminal Binding Protein*) (347).

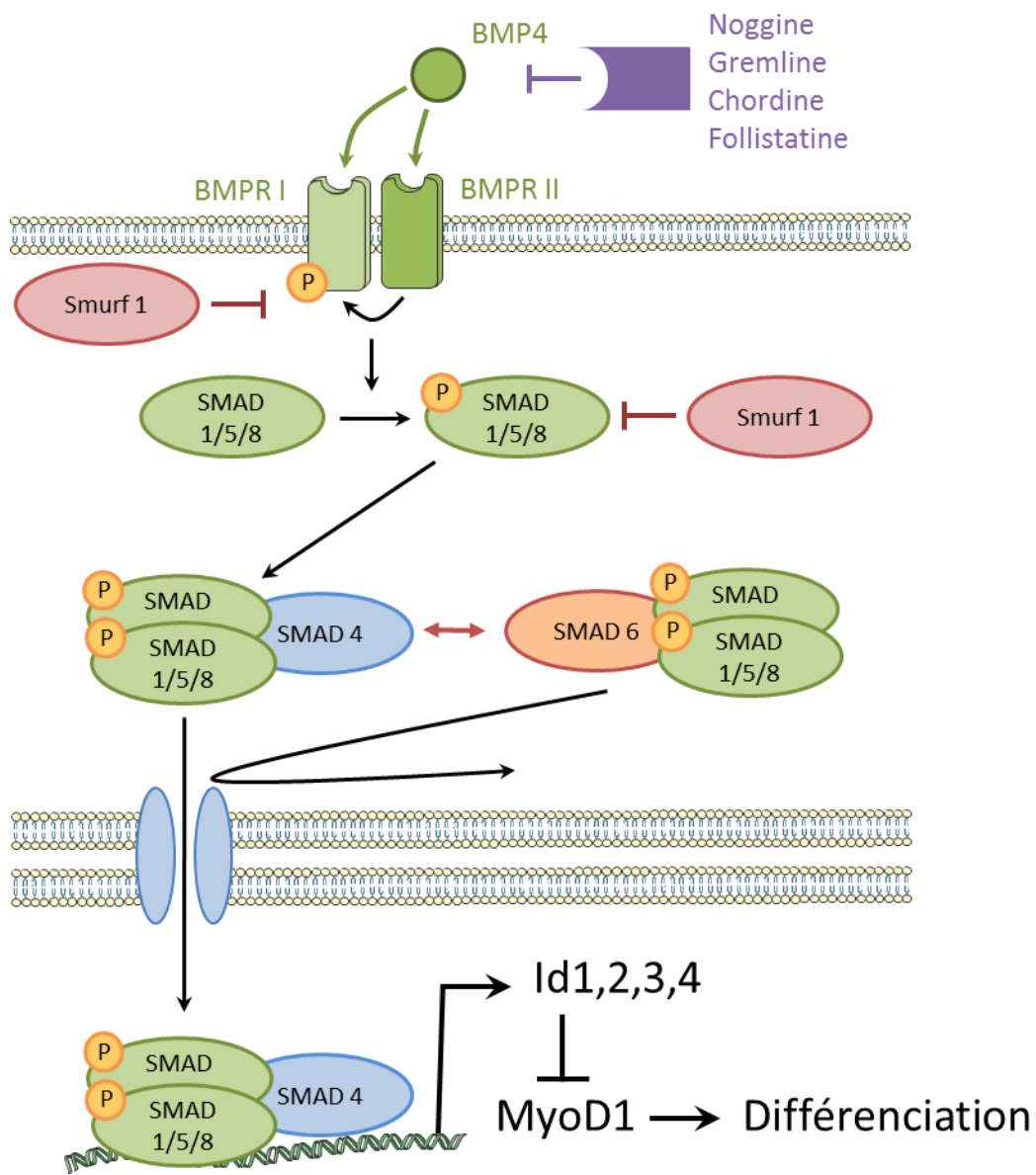


Figure 32. Mécanismes d'action du répresseur intracellulaire, SMAD6.

6.5 La voie de signalisation BMP : rôle dans le développement musculaire

6.5.1 Description initiale dans la formation osseuse

La voie BMP doit son nom à sa description initiale comme cruciale dans la formation du cartilage et de l'os quand un ligand de la voie était injecté dans le muscle (314). L'effet ostéogénique des BMPs a ensuite été étudié *in vitro* dans des cellules C2C12 et dans des lignées de myoblastes primaires. Lors de stimulations par de fortes doses de BMP, les cellules entrent rapidement dans le processus de différenciation ostéoblastique (348,349).

Plus tardivement, l'identification d'une mutation gain de fonction au sein du gène *ALK2* associée à une forme constitutionnellement active du récepteur de type I (ActR-1A) dans une pathologie congénitale appelée fibrodysplasie ossifiante progressive (ou FOP pour *Fibrodysplasia Ossificans Progressiva*) a renforcé l'hypothèse du rôle des BMPs dans la formation osseuse. Cette pathologie induit une ossification hétérotopique des tissus mous, y compris les muscles squelettiques (350,351).

Cependant, il a été plus tardivement montré que, malgré la réponse des précurseurs myogéniques à des doses fortes de BMP, leur contribution aux ossifications hétérotopiques était faible (< 5%) et les cellules subissant une trans-différenciation dans le muscle étaient en fait des précurseurs des cellules endothéliales (352).

Le rôle des BMP dans le développement du muscle squelettique reste une piste de recherche naissante et est étudié par peu de groupes. Cependant, les preuves d'un rôle central dans la myogenèse embryonnaire et post-natale sont de plus en plus nombreuses.

6.5.2 Rôle dans la myogenèse embryonnaire

Pendant la différenciation embryonnaire des somites, le neurotube dorsal et les cellules mésodermiques de la plaque latérale produisent un gradient de concentration de BMP permettant ainsi le maintien de la population des précurseurs myogéniques alors que le contre-gradient de noggine, un antagoniste de la voie BMP, permet leur entrée dans la voie de différenciation myogénique. De la même façon, il a été décrit que la voie de signalisation BMP empêchait l'activation des facteurs de transcription *MyoD* et *Myf5* chez les cellules Pax3+ alors que la noggine permet l'entrée de ces mêmes cellules Pax3+ dans la voie de différenciation myogénique (333,335,353–356)

De plus, dans le membre en développement de l'embryon de poulet, il a été montré qu'une sécrétion spatio-temporelle formant deux gradients contraires de BMP et de noggine était nécessaire pour la régulation du développement des muscles (Figure 33) (357).

Parallèlement, il a été montré, chez la souris inactivée pour la noggine, que l'initiation de la myogenèse n'était pas affectée alors que la fusion des myoblastes et la maturation de la fibre musculaire étaient altérées. Des fibres plus fines et désorganisées associées à une réduction de la masse musculaire chez les souris nouveau-nés ont été décrits (358).

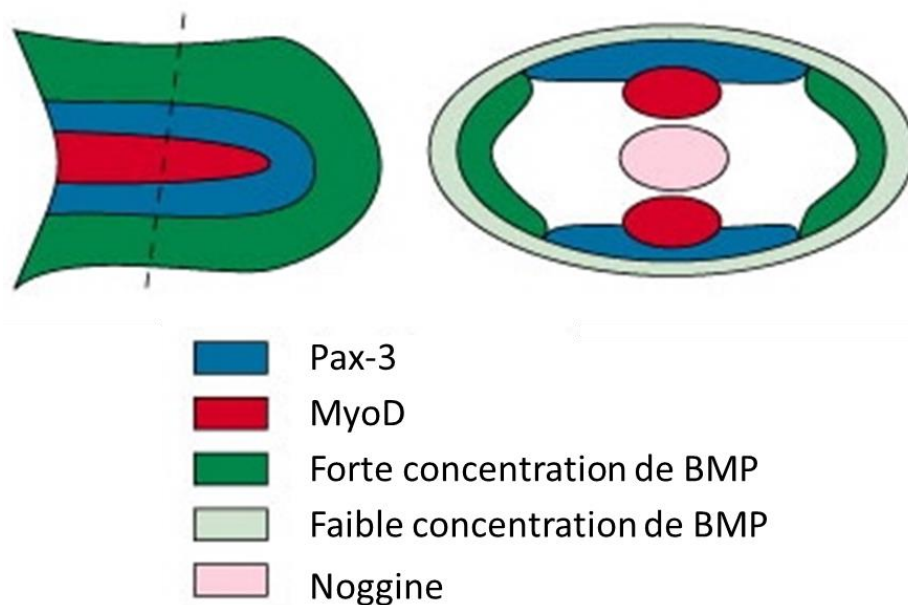


Figure 33. Schéma récapitulatif de l'expression de Pax3, MyoD, BMP et Noggine au niveau du bourgeon embryonnaire de l'aile chez l'embryon de poulet.

Diagramme résumant l'expression d'un gène dans une monture entière d'un embryon au stade 25. Le panneau de droite montre une section de la monture entière prise à la position indiquée par la ligne pointillée. Modifié d'après Amthor *et al*, 1998 (357).

6.5.3 Rôle dans la myogenèse foétale

Plus récemment, le rôle de la voie BMP dans la régulation de la croissance musculaire pendant la vie foétale a été décrit. Alors que, chez le poulet, l'activation ectopique de la voie BMP dans le membre est responsable d'une augmentation du nombre de progéniteurs musculaires foétaux et donc du nombre de fibres, son blocage diminue leur nombre et induit la formation de muscles plus petits. Il a également été montré que la voie BMP régule le nombre de cellules satellites pendant le développement (353).

Enfin, dans cette même étude, la voie BMP était active, mise en évidence par la présence des formes phosphorylées des Smads 1, 5 et 8, dans une sous-population de progéniteurs musculaires foétaux et dans les cellules satellites à l'extrémité des muscles (353) (Figure 34).

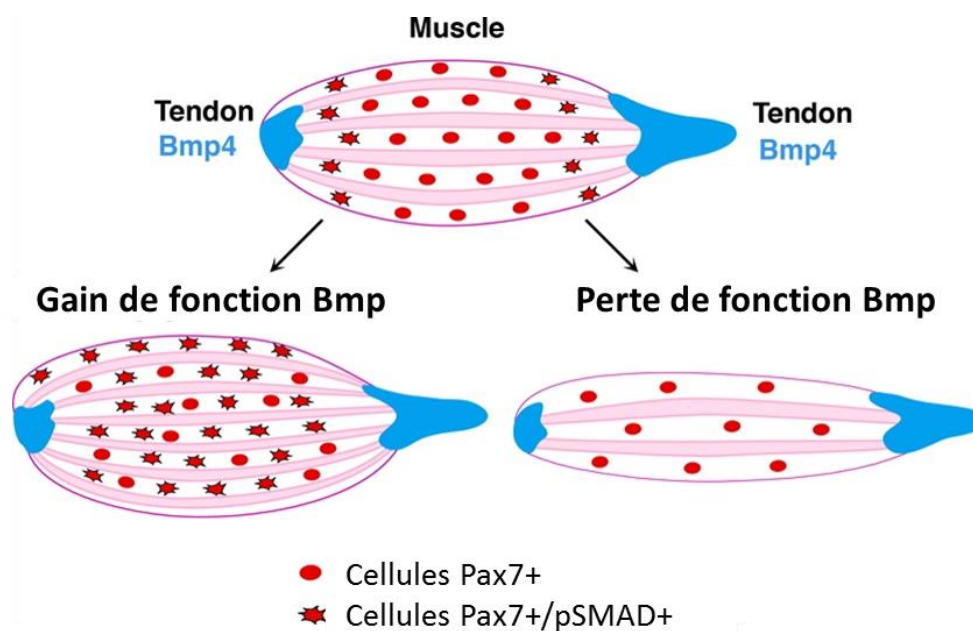


Figure 34. Représentation schématique de la fonction de la voie BMP pendant la myogenèse foétale.

Dans des conditions normales, un signal Bmp produit par les tendons agit sur une sous-population de cellules Pax7 + situées à l'extrémité du muscle. L'activation de la signalisation Bmp dans ces progéniteurs musculaires activera leur prolifération et induira leur différenciation. Cela permettra une croissance musculaire longitudinale. Les expériences de gain de fonction de Bmp entraînent une augmentation du nombre de progéniteurs et de fibres musculaires, tandis que les expériences de perte de fonction de Bmp entraînent une diminution du nombre de progéniteurs et de fibres musculaires. Modifié d'après Wang *et al.* 2010 (353).

6.5.4 Rôle dans la myogenèse post-natale

Dernièrement, le rôle de la voie BMP dans l'expansion de la population de cellules satellites activées en prévenant leur différenciation musculaire prématurée a été montré (359). Cette étude a été conduite *in vitro* sur des fibres isolées et sur des myoblastes primaires dérivés de cellules satellites. En effet, pendant l'activation et la prolifération, les cellules satellites expriment à la fois BMPR1A et les formes phosphorylées des Smads 1, 5 et 8, témoins de l'activation intracellulaire de la voie BMP. Alors que pendant la différenciation, la noggine est activée à son tour (359).

Le traitement des cellules satellites par du BMP4 recombinant est alors à même de maintenir leurs divisions et de réduire leur différenciation. L'inhibition de la voie BMP par un traitement par de la noggine recombinante, par l'inhibition de la phosphorylation des Smads 1, 5 et 8 par la dorsomorphine ou par la diminution de l'expression de Smad4 ou de Smad5 par ARN interférant induit quant à elle une différenciation prématurée. De la même façon, l'activation et l'inactivation de la voie BMP affectent le niveau d'expression d'*Id1*, un inhibiteur connu de la différenciation, témoin du mécanisme sous-jacent probable de la prévention de la différenciation prématurée par la voie BMP (359). La même année, une autre étude sur le rôle de la voie BMP dans le contrôle de la balance entre prolifération et différenciation des cellules satellites activées a été publiée (360).

Il a également été montré que la voie BMP jouait un rôle important dans la régénération musculaire *in vivo*. Dans l'étude d'Ono et collègues, 3 jours après l'injection de cardiotoxine, 97% des myoblastes MyoD+ expriment la forme phosphorylée des Smads 1,5 et 8, témoin d'une activation intracellulaire de la voie BMP. Après une blessure causée par la cardiotoxine, l'inhibition de la voie BMP, par l'injection de dorsomorphine ou par l'injection d'un récepteur BMPR1A soluble, empêche une régénération musculaire normale et aboutit à la formation de fibres musculaires plus petites et à une fibrose augmentée (359). L'implication de la voie BMP dans le phénomène de régénération musculaire avait déjà été montrée (353,361). L'injection de noggine dans le muscle en régénération est à même de réduire le niveau de phosphorylation des Smads1, 5 et 8, et de diminuer l'expression d'*Id1* et d'*Id3*. Parallèlement, chez la souris *Id1^{+/-}Id3^{-/-}*, le nombre de cellules en prolifération Pax7+ est réduit après une blessure musculaire (361).

Ces données suggèrent que la voie de signalisation BMP régule l'expression des gènes *Id* dans les cellules satellites et permet ainsi le maintien de leur prolifération et la prévention de leur différenciation myogénique (353,359,361).

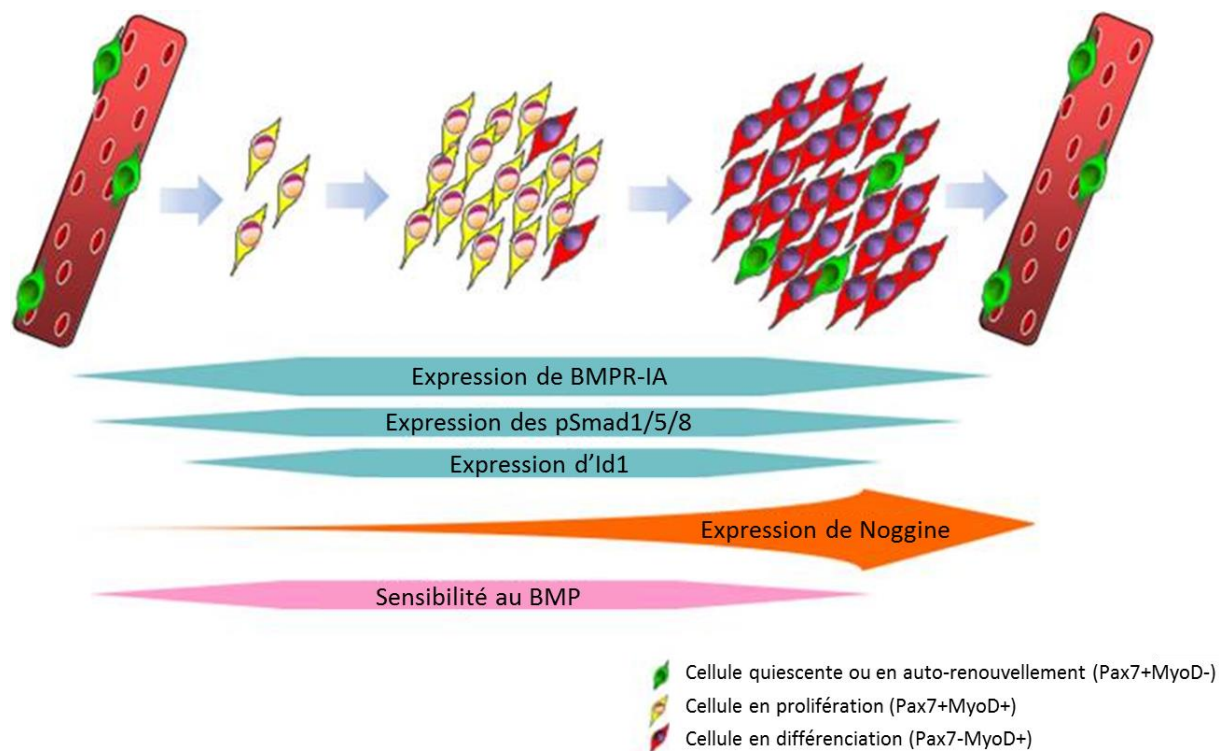


Figure 35. Rôle de la voie de signalisation BMP pendant la progression de la différenciation des cellules satellites.

Au cours de la réparation et de la régénération musculaires, les cellules satellites Pax7+ au repos sont activées pour co-exprimer Pax7 et MyoD. Les myoblastes dérivés de ces cellules satellites prolifèrent considérablement avant que de nombreuses cellules ne régulent ensuite négativement Pax7 et se différencient pour réparer les fibres musculaires endommagées ou fusionner pour générer de nouvelles myofibres. D'autres cellules satellites maintiennent l'expression de Pax7 mais perdent MyoD et se renouvellent d'elles-mêmes pour maintenir un compartiment viable de cellules souches. Une signalisation BMP normale via la phosphorylation de BMPR-1A et des Smad1/5/8 est nécessaire pendant la réparation et la régénération musculaire pour permettre à la population de myoblastes dérivés de cellules satellites de s'étendre en empêchant la différenciation précoce. La signalisation BMP fonctionne par le contrôle des niveaux d'Id, un régulateur négatif de MyoD et la différenciation myogénique. À mesure que les cellules satellites se différencient, l'expression de noggine est régulée positivement pour antagoniser le signal BMP, facilitant ainsi l'entrée dans le programme de différenciation myogénique. Modifié d'après Ono *et al*, 2011 (359).

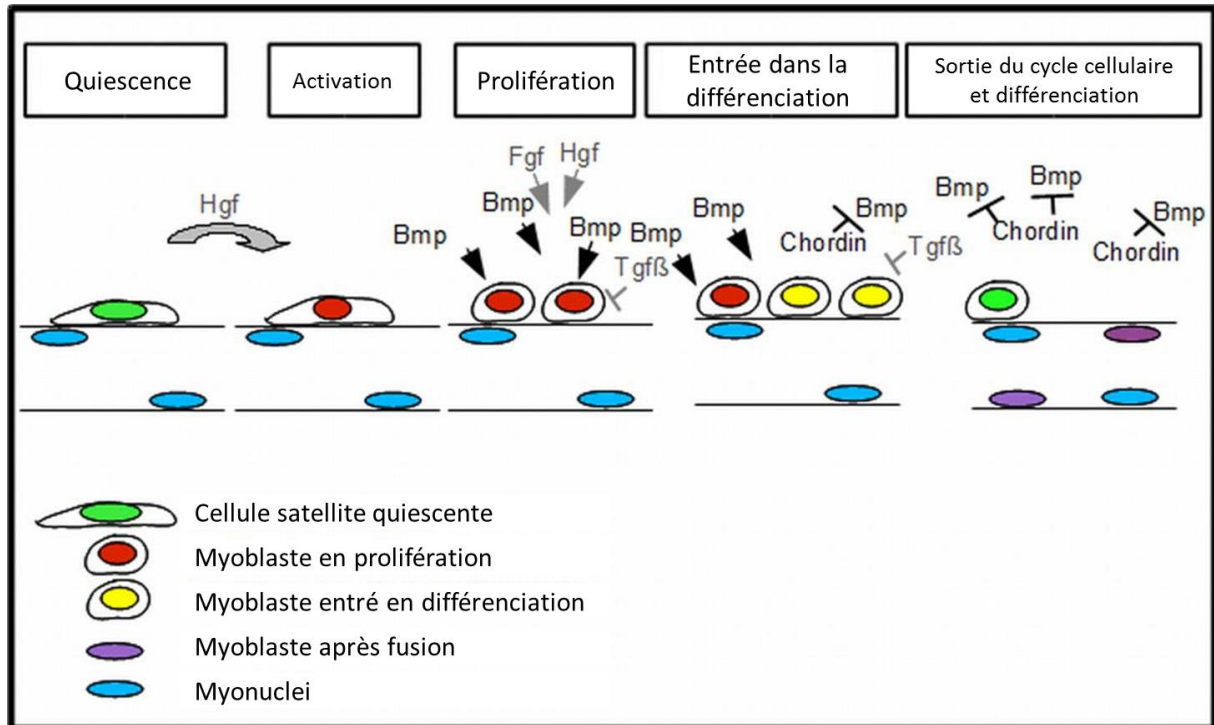


Figure 36. Modèle proposé par Friedrichs *et al.* pour le rôle de la voie BMP pendant la différenciation des cellules satellites.

Les cellules satellites quiescentes (vert) ne répondent pas aux signaux BMP. Lors de l'activation, les cellules satellites expriment MyoD et répondent aux signaux BMP avec phosphorylation des Smad (rouge). Ceci empêche alors une différenciation prématurée. Lorsque les descendants des cellules satellites sont engagés dans la différenciation (en jaune), ils expriment la myogénine et la chordine, antagoniste de la voie BMP. Lors de l'inhibition de la signalisation BMP, les myoblastes quittent le cycle cellulaire, fusionnent en myotubes et subissent une différenciation terminale (violet). Les myonuclei postmitotiques (bleus) perdent irrévérablement la capacité de répondre aux signaux BMP. Modifié d'après Friedrichs *et al.*, 2011 (360).

Chapitre 2 : PRÉSENTATION DU PROJET DE RECHERCHE

Plusieurs modèles, notamment murins, ont été générés dans le but d'étudier le rôle potentiel des lamines dans le muscle squelettique (134,249,251,253,356–358). Grâce à ces derniers et aux découvertes qu'ils ont permises, plusieurs hypothèses ont pu être proposées pour expliquer le phénotype musculaire observé dans les laminopathies : une plus grande sensibilité aux dommages mécaniques (193,365), un défaut de recrutement des noyaux à la jonction neuromusculaire (362), une altération de l'expression des gènes ou de voies de signalisation (193,205,366,367) ou encore une altération des capacités de différenciation des cellules satellites (265).

Des études précédentes avaient permis de montrer que la souris *Lmna*^{Δ8-11}, d'abord décrite comme un modèle de souris inactivée pour le gène *Lmna*, était un modèle pertinent pour identifier les mécanismes physiopathologiques sous-jacents aux mutations dans le gène *Lmna* (364). Plus particulièrement, il a été suggéré que la perte des lamines de type A était responsable d'une altération de la cinétique de différenciation musculaire et que ceci était en partie due à une diminution de l'expression de facteurs de différenciation cruciaux pour la différenciation myogénique (265).

Cependant, les études de différenciation des cellules musculaires *Lmna*^{-/-} ont été jusqu'à ce jour limitées par le nombre restreint de cellules souches obtenues à partir de souris mutantes difficiles à reproduire. Afin de disposer d'un modèle de différenciation en culture robuste et reproductible, de nouvelles lignées de myoblastes sauvages et *Lmna*^{-/-} pouvant être maintenues de manière conditionnelle et contrôlée en prolifération, ont été utilisées. Ces lignées cellulaires proviennent du croisement entre deux souris génétiquement modifiées : la première est invalidée pour le gène d'intérêt, le gène *Lmna* par exemple, et la seconde exprime un mutant thermosensible de l'antigène large T de SV40 (TAg) sous contrôle du promoteur H2K inducible par l'ajout d'interféron gamma (IFN γ). Ces souris sont appelées « immortomouse » car toute cellule souche isolée de ces animaux peut être cultivée à 33°C en présence d'IFN γ ce qui induit l'expression du large T de SV40 et le maintien de ces cellules souches en prolifération. On parle « d'immortalisation conditionnelle ». Une fois suffisamment amplifiées, ces cellules peuvent être induites à se différencier en les cultivant à 37°C en absence d'IFN γ , ce qui inhibe l'expression du large T de SV40. Ainsi, après croisement, nous obtenons une souris dont les cellules satellites sont inactivées pour le gène *Lmna* et peuvent être maintenues

en prolifération de manière conditionnée grâce à l'expression transitoire de l'antigène large T thermosensible. Ces lignées seront appelées « H2K » dans la suite de ce rapport (205,250,251).

Basée sur les données récentes sur le rôle de la voie BMP dans la régulation de la myogenèse embryonnaire et fœtale, dans la promotion de la prolifération myoblastique et dans la prévention de la différenciation musculaire précoce (359,360,368), l'objectif de notre travail est d'identifier une altération potentielle de la voie BMP associée à une modification des capacités de différenciation grâce au modèle de myoblastes conditionnellement immortalisés et inactivés pour le gène *Lmna* et à des myoblastes humains issus de biopsies musculaires et porteurs de différentes variations pathogènes du gène *LMNA* à l'état hétérozygote. Parallèlement, l'objectif de notre travail est de tenter de rétablir un fonctionnement normal de la voie BMP dans le but de récupérer un potentiel et une cinétique de différenciation corrects des myoblastes inactivés pour le gène *Lmna*.

Chapitre 3 : MANUSCRIT

1 Références de l'article

Janin A, Bauer D, Ratti F, Valla C, Bertrand A, Christin E, Chopin E, Streichenberger N, Bonne G, Gache V, Cohen T, Méjat A. SMAD6 overexpression leads to accelerated myogenic differentiation of *LMNA* mutated cells. *Sci Rep.* 2018 Apr 4;8(1):5618. doi: 10.1038/s41598-018-23918-x. PMID: 29618840

2 Résumé

Cet article, publié en 2018 dans *Scientific Reports*, présente la majeure partie des résultats obtenus au cours de ma thèse de doctorat consacrée aux altérations de la voie de signalisation BMP dans un modèle murin de myoblastes inactivés pour le gène *Lmna*. Cette étude utilise un modèle précédemment décrit de myoblastes conditionnellement immortalisés et inactivés pour le gène *Lmna* : le modèle H-2K. Nous avons identifié deux altérations majeurs de la voie de signalisation BMP dans ces myoblastes H-2K inactivés pour le gène *Lmna* (H-2K *Lmna*^{-/-}) : une diminution de l'expression du ligand *Bmp4* et une augmentation de l'expression de l'inhibiteur *Smad6*. Nous avons pu montrer que cette surexpression de *Smad6* induit une séquestration cytoplasmique des formes phosphorylées des *Smad1*, *5* et *8*. Cette séquestration est alors responsable d'une diminution de l'expression des gènes cibles de la voie *Id1* et *Id2*. Par conséquent, les myoblastes H-2K *Lmna*^{-/-} montrent une différenciation musculaire prématurée qui peut être récupérée en diminuant l'expression de *Smad6* par des expériences d'ARN interférent.

Enfin, nous avons pu montrer que ces défauts existaient également dans des myoblastes humains porteurs de différentes mutations dans le gène *LMNA* prélevés chez des patients souffrant de laminopathies musculaires.

Ensemble, ces résultats permettent de proposer un nouveau mécanisme physiopathologique pouvant expliquer la diminution du réservoir de cellules satellites et l'atrophie musculaire observées dans les laminopathies musculaires.

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

SMAD6 overexpression leads to accelerated myogenic differentiation of *LMNA* mutated cells

Received: 4 December 2017
Accepted: 22 March 2018
Published online: 04 April 2018

Alexandre Janin^{1,2}, Delphine Bauer¹, Francesca Ratti¹, Camille Valla¹, Anne Bertrand³, Emilie Christin¹, Emilie Chopin⁴, Nathalie Streichenberger^{1,5}, Gisèle Bonne³, Vincent Gache¹, Tatiana Cohen⁶ & Alexandre Méjat¹

LMNA gene encodes lamins A and C, two major components of the nuclear lamina, a network of intermediate filaments underlying the inner nuclear membrane. Most of *LMNA* mutations are associated with cardiac and/or skeletal muscles defects. Muscle laminopathies include Emery-Dreifuss Muscular Dystrophy, Limb-Girdle Muscular Dystrophy 1B, *LMNA*-related Congenital Muscular Dystrophy and Dilated Cardiomyopathy with conduction defects. To identify potential alterations in signaling pathways regulating muscle differentiation in *LMNA*-mutated myoblasts, we used a previously described model of conditionally immortalized murine myoblasts: H-2K cell lines. Comparing gene expression profiles in wild-type and *Lmna*^{Δ8-11} H-2K myoblasts, we identified two major alterations in the BMP (Bone Morphogenetic Protein) pathway: *Bmp4* downregulation and *Smad6* overexpression. We demonstrated that these impairments lead to *Lmna*^{Δ8-11} myoblasts premature differentiation and can be rescued by downregulating *Smad6* expression. Finally, we showed that BMP4 pathway defects are also present in myoblasts from human patients carrying different heterozygous *LMNA* mutations.

LMNA gene encodes lamin A and C, two major components of the nuclear lamina, a network of intermediate filaments covering the inner nuclear membrane. These proteins can assemble into polymers beneath the nuclear envelope where they are crucial for the maintenance of interphase nuclear architecture, integrity of the nuclear envelope and chromatin structure¹⁻⁴. They also interact with chromatin, transcription factors and epigenetic modifiers, thus playing an important role in the regulation of gene expression related to cell proliferation and differentiation, DNA replication and repair, and chromatin organization⁵.

Mutations in *LMNA* gene are associated with at least a dozen of inherited diseases, collectively called laminopathies⁶. Despite *LMNA* ubiquitous expression, most laminopathies involve tissue-specific phenotypes. *LMNA* mutations could lead to accelerated aging syndrome (Hutchinson-Gilford progeria syndrome), to abnormalities in adipose tissue (Dunnigan-type familial partial lipodystrophy), or in peripheral nerve (Charcot-Marie-Tooth type 2). Nevertheless, most of *LMNA* mutations are associated with cardiac and/or skeletal muscles defects⁷. Striated muscle laminopathies include Emery-Dreifuss Muscular Dystrophy (EDMD), Limb-Girdle Muscular Dystrophy 1B, *LMNA*-related Congenital Muscular Dystrophy (L-CMD) and Dilated Cardiomyopathy with conduction defects (DCM-CD). These four diseases are considered as a spectrum of the same pathology because of overlapping clinical features⁸.

¹University of Lyon, University of Lyon1 Claude Bernard Lyon1, Institut NeuroMyoGene, CNRS UMR5310, INSERM U1217, Lyon, France. ²Laboratoire de Cardiogénétique Moléculaire, Centre de Biologie et Pathologie Est, Hospices Civils de Lyon, F-69677, Bron, France. ³Sorbonne Université, INSERM UMRS_974, Center of Research in Myology, 75013, Paris, France. ⁴Centre de Biotechnologie Cellulaire, Centre de Biologie et Pathologie Est, Hospices Civils de Lyon, F-69677, Bron, France. ⁵Centre de Neuropathologie Est, Centre de Biologie et Pathologie Est, Hospices Civils de Lyon, F-69677, Bron, France. ⁶Research Center for Genetic Medicine, Children's National Medical Center, 111 Michigan Avenue NW, Washington, DC, 20010, USA. Correspondence and requests for materials should be addressed to A.J. (email: alexandre.janin01@chu-lyon.fr) or A.M. (email: alexandre.mejat@ens-lyon.fr)

Several mouse models have been generated to investigate the potential roles of lamins in skeletal muscle^{9–15}. Based on findings using these models, several hypotheses have been proposed to explain the muscle phenotype in laminopathies: higher susceptibility to mechanical damages^{16,17}, defective recruitment of nuclei at the neuromuscular junction (NMJ)⁹, alterations of gene expression and signaling pathways^{3,17–19} and impairment of muscle differentiation²⁰. Previous reports have shown that *Lmna*^{Δ8–11} mouse, previously thought to be a *Lmna*-null mouse²¹, represents a pertinent model to identify potential human pathophysiological mechanisms¹⁵. More particularly, based on *Lmna*^{Δ8–11} (hereafter referred to as *Lmna*^{-/-}) primary myoblasts, it has been suggested that A-type lamins deficiency caused an impairment in the muscle differentiation kinetics and that this deficiency is, in part, due to decreased endogenous level of other critical myoblast proteins²⁰.

To avoid issues associated with primary myoblasts accessibility and to tightly control the kinetics of differentiation, we used a previously described model of conditionally immortalized murine myoblasts: wild-type and *Lmna*^{-/-} H-2K cell lines^{18,22,23}.

Comparing gene expression profiles in wild-type and *Lmna*^{-/-} H-2K myoblasts, we identified several alterations of the BMP pathway. BMP (Bone Morphogenetic Protein) proteins were initially found to be crucial for osteogenesis^{24,25}. They were further shown to be implicated in several other biological processes such as hematopoiesis, neuronal development or iron metabolism²⁶. Finally, BMP is also a pivotal pathway regulating embryonic and foetal myogenesis. *In vitro*, this pathway promotes myoblasts proliferation and avoids premature differentiation²⁷. *In vivo*, BMP signaling has been shown to be implicated in muscle growth, maintenance, and the balance between hypertrophy and atrophy by negatively regulating atrogenes such as *Fbx20*²⁸.

Our results identify two major alterations in the BMP pathway in *Lmna*^{-/-} myoblasts: *Bmp4* downregulation and *Smad6* overexpression. We demonstrate that these impairments lead to *Lmna*^{-/-} myoblasts premature differentiation and can be rescued by downregulating *Smad6* expression. Finally, we showed that BMP4 pathway defects are also present in myoblasts from patients carrying different heterozygous *LMNA* mutations.

Material and Methods

Patient biopsies and culture of human myoblasts. Patient muscle samples were obtained from surgical biopsies of the deltoid muscle primarily performed for diagnosis purpose in accordance with principles of Helsinki declaration. All patients signed an informed consent for research. Human myoblasts were derived from four unrelated patients presenting different striated muscle laminopathies (Supplementary Table S1) with the following *LMNA* mutations: *LMNA* p.Lys32del (from 2 different patients, hereafter referred to as ΔK32 and *LMNA* p.Leu380Ser (hereafter referred to as L380S). Those myoblasts were collected and prepared as previously described¹⁷. Muscle samples and associated data from patient (*LMNA* Q310*: Z717 M01 and *LMNA* H222P: M45876) and healthy control (Y327 M01) were obtained from Cardiobiotec Biobank (CRB-HCL, Hospices Civils de Lyon, reference BB-0033–00046), a center for biological resources authorized by the French Ministry of Social Affairs and Health. All samples were collected and used in accordance with the ethical rules of the Biobank and in agreement with French legislation. The protocol was approved by local ethics committee and French Biomedicine Agency (reference DC2015–25–66). All experiments were performed in accordance with relevant guidelines and regulations. Myoblasts with *LMNA* Q310* and H222P mutations were purified by the Cellular Biotechnology Center (Centre de Biologie et Pathologie Est, Hospices Civils de Lyon). The purity of the population was evaluated by the proportion of desmin-positive cells in an immunofluorescence assay (Supplementary Figure S2). Cells were maintained in a HAM-F10 medium supplemented with 20% of FBS and 1% penicillin/streptomycin at 37°C with 5% CO₂.

H-2K Cell culture. H-2K myoblasts²³ were maintained at +33°C and 10% CO₂ in a proliferation medium composed of DMEM High glucose medium (HyClone) supplemented with 20% (v/v) fetal bovine serum (GE Healthcare), 2% (v/v) chick embryo extract (Eurogentec), 2% (v/v) glutamin (HyClone) and 1% (v/v) penicillin/streptomycin (growth medium) and complemented with 0.2% interferon-gamma (Sigma-Aldrich). H-2K were differentiated at +37°C and 5% CO₂ in DMEM High glucose medium supplemented with 2% (v/v) Horse Serum (HyClone) and 1% (v/v) penicillin/streptomycin. Proliferating H-2K myoblasts were grown on 100mm dishes coated with 0.01% gelatin. Differentiating cells were grown on matrigel-coated Nunc™ LAB-TEK® chamber slides (ThermoScientific) for immunofluorescence assays or matrigel-coated plastic dishes for RNA or protein assays.

siRNA-mediated gene knockdown. H-2K cell lines were transfected either with *Smad6* siRNA or with *Lmna* siRNA and negative control siRNA (GeneSolution, Qiagen) at a final concentration of 10nM using lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen), according to the manufacturer's instructions.

RNA isolation, microarrays and real-time quantitative PCR. Total RNA was isolated from H-2K and human myoblasts by column extraction (NucleoSpin RNA kit, Macherey Nagel) according to manufacturer's instructions. Microarray analysis was performed by ProfileXpert facility (www.profilexpert.fr/). For each cell line, a triplicate of total RNA extract was analyzed. Microarray analysis was performed according to manufacturer's instructions, on a MouseWG-6 V2.0 chip using an Illumina™ platform. The differentially expressed genes in wild-type and mutated groups were selected by unpaired t-test with significance level of $p \leq 0.05$. Then, the genes with fold change less than 0.5 downregulated or greater than 2.0 upregulated between any two groups were selected for analysis.

For quantitative PCR, a maximum of 2 μg of total RNA was used for cDNA synthesis by reverse transcription PCR with random primers using the GoScript™ Reverse Transcription system (Promega) according to the manufacturer's instructions. Real Time PCR was carried out with the FastStart Universal SYBR Green Master (Roche) kit using a Rotor-Gene from Corbett Life Science according to manufacturer's instructions. Reactions were run

in duplicate and *Hprt1* was used as housekeeping gene to control variability in expression level. *Ppib* (encoding cyclophilin B) for mouse samples and *GAPDH* and for human samples were also tested as housekeeping gene and the results were comparable. The primer sequences are provided in Supplementary data Table S3. To determine relative expression level, a standard curve based on dilutions of an internal sample of the assay was performed for each run and each gene.

Western Blotting. Cells were maintained in proliferation or differentiation media, washed with PBS and harvested by trypsination and pellet by centrifugation at 1500 rpm during 5 min at +4 °C. After one more wash step, a dry pellet was obtained and stored at -80 °C. To extract proteins, the pellet was dissolved in extraction buffer based on classic RIPA buffer (25 mM Tris-HCL, 50 mM NaCl, 0.5% deoxycholic acid, 2% Nonidet P-40, 0.2% SDS) supplemented with a protease inhibitors cocktail (cOmplete from Roche) and phosphatases inhibitors (PhosSTOP from Roche). The lysis was performed on ice during 30 minutes. After sonication, protein concentration was determined by a Lowry-like assay using the DC protein Assay from BioRad. Dosages were performed according to manufacturer's specifications. An amount of 20 µg of total lysate was loaded onto 12% precasted MiniPROTEAN® TGX gels (Bio-Rad). Transfer was performed onto 0.22 µm PVDF membranes. After being blocked in 5% non-fat dried milk dissolved in TBS 1X, membranes were incubated overnight with primary antibodies (see Supplementary Table S4). After three wash steps with TBS, membranes were probed one hour with appropriate secondary antibodies. Following three new wash steps with TBS, membranes were developed using the ECL reagent (GE Healthcare) or ECL2 reagent (ThermoScientific) on Fuji Medical X-Ray Films (FujiFilm).

Immunostaining. Cells were fixed for 10 minutes in 4% paraformaldehyde diluted in PBS. After three wash steps with PBS, cells were permeabilized for 10 min in PBS 1X with Triton™-X100 0.1% and then blocked in PBS-BSA 1% for 10 minutes. Cells were stained with primary antibodies, diluted in blocking solution, during 2 hours at room temperature. Following three wash steps in PBS, cells were probed with appropriate secondary antibodies, coupled to AlexaFluor probes, diluted in blocking solution for 1 hour at room temperature. Immunofluorescence images were acquired with a Zeiss AxioImagerZ1 microscope equipped with two coolsnap cameras. Images were acquired using Metamorph software and analyzed using ImageJ software.

Statistical analysis. Non parametric Mann Whitney test was performed using GraphPad Prism version 6.00 for Mac (GraphPad Software, La Jolla California USA, www.graphpad.com) (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$).

Data availability. The datasets generated during and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Results

Transcriptomic analysis identifies Bmp pathway alterations in *Lnma*^{-/-} myoblasts. H-2K immortalized myoblasts (MB), isolated from Immortomice™^{22,23}, have been previously shown to be a powerful model combining the ability to obtain a large number of myoblasts and a tight control of their differentiation²⁹. H-2K myoblasts express a thermosensitive form of SV-40 large T antigen under the control of an IFN γ -responsive promoter. They are kept in proliferation at 33 °C in presence of IFN γ or switched to differentiation into myotubes at 37 °C in absence of IFN γ . *Lnma*^{-/-} H-2K myoblasts and their wild-type (WT) littermate controls have been previously obtained by crossing *Lnma*^{-/-} mice and Immortomice™¹⁸.

In order to seek alterations in gene expression induced by *Lnma* inactivation, we performed a transcriptomic analysis on *Lnma*^{-/-} and wild-type H-2K myoblasts (MB). We found 144 downregulated genes and 188 upregulated genes in *Lnma*^{-/-} compared to wild-type MB (p-value < 0.05) displaying at least a two-fold change in their relative expression (Fig. 1A and Supplemental Table S5). ENRICH^{30,31} was used to determine the biological processes associated to these gene sets. Many down-regulated genes are involved in muscle contraction and sarcomere organization as well as in skeletal muscle differentiation (Fig. 1B and Supplemental Table S5). On the other hand, upregulated genes are related to extracellular matrix organization, apoptosis, cell migration or proliferation (Fig. 1C and Supplemental Table S6). Clustergramms based on these gene sets allowed us to identify two impairments that belong to the same pathway: *Bmp4* gene in the downregulated group and *Smad6* in the upregulated group (Fig. 1B and C).

Taken together, these results suggest that Bmp pathway, and more particularly *Bmp4* and *Smad6* gene expression, could be altered in *Lnma*^{-/-} myoblasts.

Loss of Lamin A/C alters Bmp4 secretion but not Bmp receptors expression. According to the transcriptomic data, *Bmp4* expression is decreased by 81% in *Lnma*^{-/-} myoblasts compared to wild-type (Supplementary dataset). To validate this result, we measured *Bmp4* expression by quantitative PCR and western blot. We observed a 78% decrease of *Bmp4* mRNA level relative to *Hprt1* expression in *Lnma*^{-/-} MB (Fig. 2A). This decrease was further confirmed with a second pair of primers (data not shown). Unexpectedly, we could not detect any band corresponding to Bmp4 protein by western blot in proliferating *Lnma*^{-/-} myoblasts (Fig. 2B), suggesting that no Bmp4 is produced by them (Fig. 2B). Moreover, the decrease of *Bmp4* mRNA level relative to *Hprt1* expression was also observed following *Lnma* knock-down using siRNA in H-2K wild-type MB (Supplementary Figure S7). Interestingly, at the opposite, *Lnma* overexpression in H-2K *Lnma*^{-/-} MB is able to restore *Bmp4* expression at levels found in wild-type H-2K MB (Supplementary Figure S8).

Bmp4 binds to type 1 and type 2 transmembrane receptors (respectively BmpR1A, 1B and 2) and activate the downstream cascade²⁴. In order to further explore the pathway, quantitative PCR and western blots were performed to quantify the expression of *Bmp* receptors. Both at the transcriptional and at the protein levels, BmpR1A,

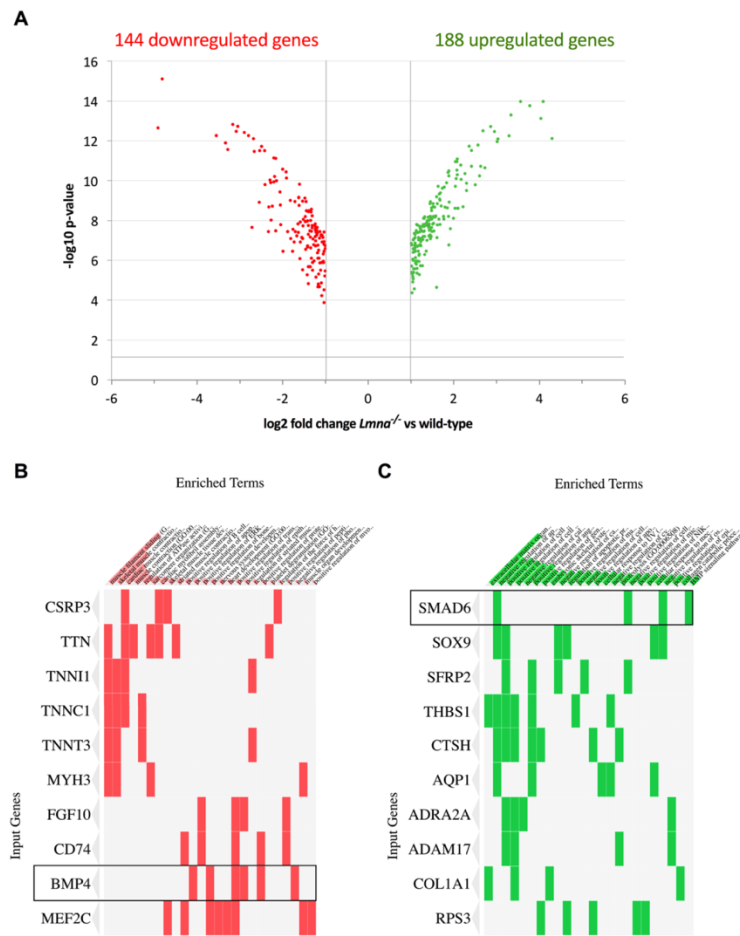


Figure 1. Transcriptomic analysis of *Lmna*^{-/-} versus wild-type H-2K myoblasts expression profiles. (A) Volcano plot displaying the repartition of up- and down-regulated genes in *Lmna*^{-/-} H-2K myoblasts compared to wild-type. Only the genes with a p-value inferior to 0.05 ($-\log_{10}$ p-value superior to 1.3) and at least a twofold change (log₂ fold-change superior to 1) are displayed. (B,C) Clustergram listing downregulated (B) and upregulated (C) genes were generated using ENRICH (http://amp.pharm.mssm.edu/Enrichr/) to identify misregulated genes of interest in enriched GO Biological Process 2017 categories.

BmpR1B and BmpR2 expression levels in *Lmna* null myoblasts are normally expressed in both wild-type and *Lmna*^{-/-} cells (Fig. 2C and D) suggesting that these effectors are not affected by *Lmna* loss.

Smad6 expression is upregulated in *Lmna*^{-/-} myoblasts. The formation of BmpR1 and 2 complexes at the membrane allows the constitutive kinase activity of BmpR2 to phosphorylate BmpR1. After phosphorylation-mediated activation, BmpR1 phosphorylates the Receptor-regulated Smads (R-Smads): Smad1, Smad5 and Smad8 (pSmad1/5/8)³². Phosphorylated R-Smads form a heteromeric complex either with the Common mediator Smad (Co-Smad) Smad4 able to translocate into the nucleus in order to activate Smad-target genes or with Smad6, an Inhibitory Smad (I-Smad), that is retained in the cytoplasm^{26,33,34}.

To further explore potential defects in the Bmp4 pathway, expression of R-Smads (i.e. Smad1, 5 and 8), Co-Smad Smad4 and I-Smad Smad6 were quantified by quantitative PCR and western-blot (when antibodies were available). No defect in R-Smads and Smad4 expression, neither at the transcription level nor at the protein level, could be observed (Fig. 3A and B). However, in line with the transcriptomic data (Fig. 1C), a two-fold increase in *Smad6* expression was measured in *Lmna*^{-/-} compared to wild-type myoblasts. The relative mRNA

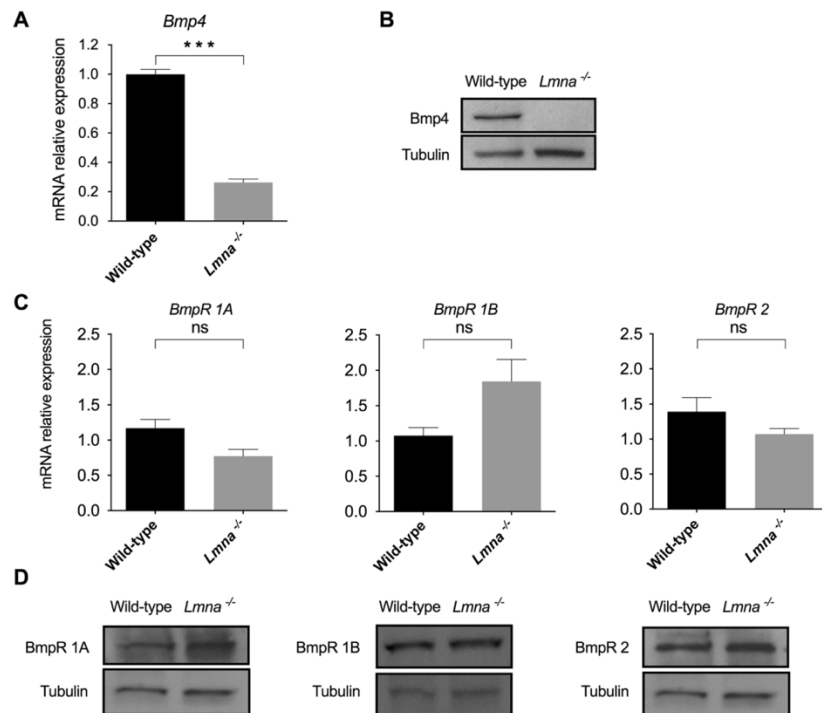


Figure 2. Bmp4 and Bmp receptors (BmpR) expression in *Lmna*^{-/-} vs wild-type H-2K myoblasts. (A,C) Expression of *Bmp4* (A) and Bmp receptors (*BmpR1A*, *1B* and *2*) (C) measured by quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR) in wild-type and *Lmna*^{-/-} H-2K MB. Expression is shown as mean (\pm SEM) of at least three biological replicates and two technical replicates. Values are relative expression normalized to *Hprt1* housekeeping gene expression. (B,D) Protein levels of Bmp4 (B) and Bmp receptors (D) quantified by western blot in *Lmna*^{-/-} and wild-type H-2K MB. Protein levels of tubulin in each sample are provided as normalizer. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$). Full-length blots are presented in Supplementary Figure 2.

level is 1.22 ± 0.08 in WT H-2K versus 2.22 ± 0.15 in *Lmna*^{-/-} H-2K MB (mean \pm SEM) (Fig. 3A). This twofold mRNA level increase translated into an accumulation of Smad6 protein was confirmed by western blot (Fig. 3B).

Moreover, the increase of *Smad6* mRNA level was also observed following *Lmna* knock-down using siRNA in H-2K wild-type MB (Supplementary Figure S7). Interestingly, at the opposite, *Lmna* overexpression in H-2K *Lmna*^{-/-} MB is able to normalize *Smad6* expression compared to wild-type H-2K MB (Supplementary Figure S8).

Overexpressed Smad6 sequesters pSmad1/5/8 in the cytoplasm. The phosphorylation level of R-Smads (phosphorylated Smad1/5/8) was determined by western blot. Interestingly, despite the absence of detectable Bmp4 ligand, the level of phosphorylation of R-Smads is only slightly decreased in H-2K *Lmna*^{-/-} cells (Fig. 3C). This result suggests a possible compensation by other pathways using the phosphorylation of Smads 1, 5 and 8 as cellular transducers.

The inhibitor Smad6 has been shown to compete with Smad4 to interact with the pSmad1/5/8 complex³⁴ resulting in a Smad6-pSmad1/5/8 complex unable to translocate into the nucleus to activate Smad target genes transcription. For this reason, the intracellular localization of Smad6 and phosphorylated R-Smads were evaluated by immunofluorescence (Fig. 3D). In wild-type myoblasts, pSmad1/5/8 were almost exclusively observed in the nucleus of H-2K cells whereas only a faint signal corresponding to Smad6 could be detected in the cytoplasm. In contrast, pSmad1/5/8 were mainly detected in the cytoplasm of *Lmna*^{-/-} myoblasts where they tend to colocalize with Smad6 dots (Fig. 3D). To better characterize these changes in Smad localizations, the intensity (grey value) of each labelling was quantified along a line following the cell main axis (Fig. 3E). This confirmed that in wild-type cells, the labelling (in green) of phosphorylated R-Smads colocalized with the labeling of cell's nuclei (DAPI staining in blue). In *Lmna*^{-/-} myoblasts, phosphorylated R-Smad signals are dispersed throughout the cell and pSmad1/5/8 and Smad6 intensity peaks colocalize (Fig. 3E). These results suggest that Smad6 overexpression leads to a sequestration of Smad6-pSmad1/5/8 complex in the cytoplasm of *Lmna*^{-/-} myoblasts (Fig. 3D and E).

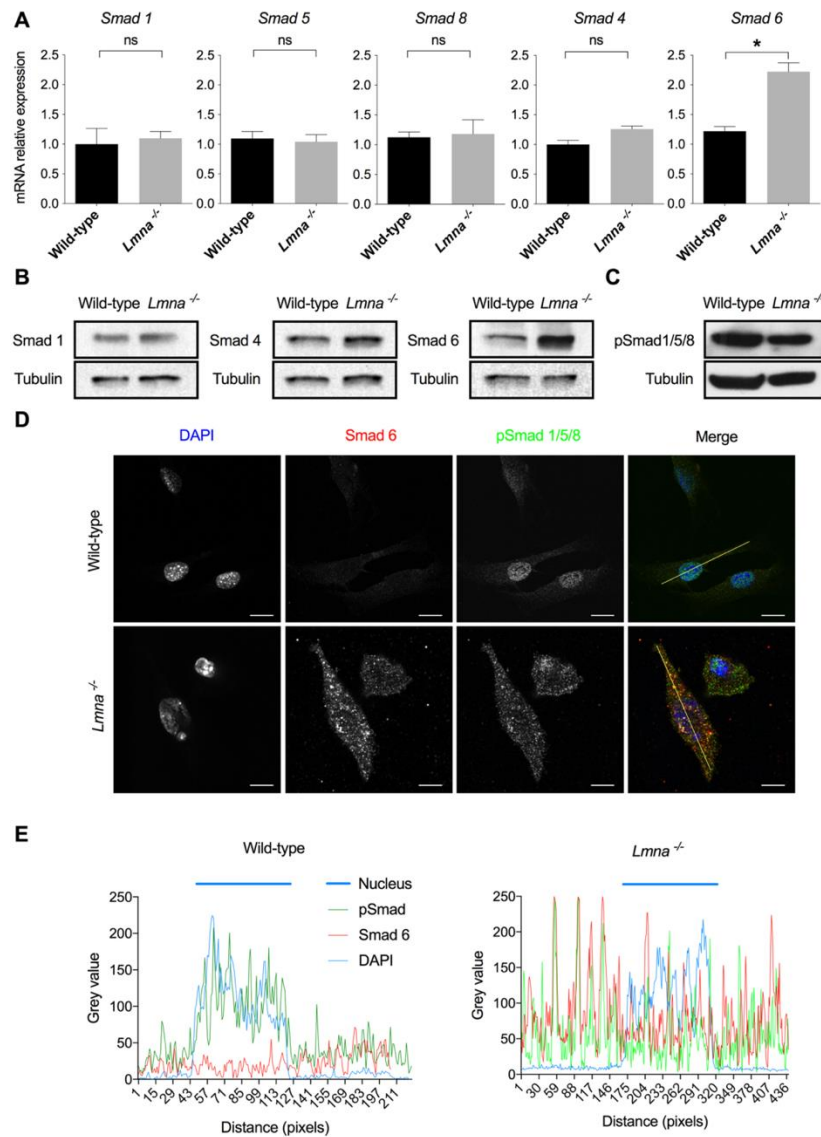


Figure 3. Smads expression and intracellular localization. (A) Expression of *Smad1*, 5, 8, 4 and 6 measured by quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR) in wild-type and *Lmna*^{-/-} H-2K MB, at the proliferative stage. Expression is shown as mean (\pm SEM) of at least three biological replicates and two technical replicates. Values are relative expression normalized on *Hprt1* housekeeping gene expression. (B) Protein levels of Smad1, Smad4 and Smad6 quantified by western blot in *Lmna*^{-/-} H-2K MB versus wild-type, at the proliferative stage. (C) Phosphorylation levels of total Smad1/5/8 measured by western blot. (B,C) Protein levels of tubulin in each sample are provided as normalizer. (D) Immunofluorescence assay in wild type and *Lmna*^{-/-} H-2K MB, at the proliferative stage, showing the intracellular localization of phosphorylated R-Smad and Smad6. Scale bar: 10 μ m. (E) Intensity plots of each dye along the yellow line shown in (D). (* p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001). Full-length blots are presented in Supplementary Figure 3.

Altered Bmp4 pathway leads to accelerated muscle differentiation. After translocation into the nucleus, the Smad4-pSmad1/5/8 complex is able to induce the transcription of target genes such as *Id1* and *Id2* (for Inhibitor of differentiation/DNA Binding)^{35,36}. These proteins bind to ubiquitous E-proteins to form inactive heterodimers. When associated with Id proteins, E-proteins cannot bind and activate muscle-specific transcription factors such as MyoD1, blocking muscle differentiation³⁷. Consequently, Id proteins expression prevents premature activation of differentiation factors. In skeletal muscle, Bmp pathway has been shown to promote muscle progenitors expansion and prevent premature muscle differentiation²⁷.

To evaluate if Bmp4 downregulation and Smad6 overexpression could affect *Lmna*^{-/-} myoblasts differentiation, *Lmna*^{-/-} vs wild-type H-2K cells were fixed and immunolabelled for Myosin Heavy Chain (MyHC, MF-20), a marker of differentiation, forty-eight hours after switching in differentiation conditions.

Phase-contrast photographs and immunofluorescences (Fig. 4A) revealed accelerated differentiation in H-2K *Lmna*^{-/-} myotubes compared to wild-type. H-2K *Lmna*^{-/-} myotubes (MT) appeared longer but thinner than wild-type. The differentiation index (DI), i.e. the percentage of nuclei in MyHC positive myotubes, was calculated for both conditions and this index is significantly increased in H-2K *Lmna*^{-/-} MT: after forty-eight hours in differentiation medium, 79% (DI = 79 ± 2) of nuclei were included in a MT (MyHC positive cells) in the *Lmna*^{-/-} condition versus 44% in the control condition (DI = 44 ± 5) (Fig. 4B).

In order to better characterize this anticipated differentiation process, the expression of Myogenin, a crucial muscle-specific transcription factor, was measured at both the transcriptional and protein levels during differentiation. Whereas Myogenin mRNA only started to be expressed in wild-type myoblasts after 12 hours of differentiation, it could already be detected in proliferating and early differentiating (6 hours) *Lmna*^{-/-} H-2K cells (Fig. 4C). *Myog* expression reached a plateau after 24 hours in *Lmna*-null muscle cells while it still increased in wild-type cells after 48 hours. This precocious expression could also be observed at the protein level where Myogenin was already detectable after 12 hours of differentiation in mutated versus 18 hours in wild-type myoblasts (Fig. 4D). Interestingly, although *Myog* appeared earlier, its expression did not increase with differentiation and remained low compared to WT by 48 hours.

Altered *Myog* expression correlated with the decrease of *Id1* and *Id2* expression, target genes of the Bmp4 pathway, in *Lmna*^{-/-} H-2K cells compared to wild-types during differentiation (Fig. 4E and F). *Id1* expression was already reduced by 50% in proliferating *Lmna*^{-/-} myoblasts and about 70 to 80% during differentiation (Fig. 4E). *Id2* expression was not affected in proliferating myoblasts but immediately declined upon differentiation (Fig. 4F).

Taken together, these results demonstrate that *Lmna*^{-/-} H-2K myoblasts differentiate prematurely and that could be due to Bmp pathway alterations through *Id1* and *Id2* misregulation.

Recombinant murine Bmp4 treatment maintains wild-type MB in proliferation but cannot prevent *Lmna*^{-/-} myoblasts differentiation. As Bmp receptors were normally expressed in *Lmna*^{-/-} myoblasts, we tested whether they could respond to Bmp4 addition.

To determine the best concentration of recombinant Bmp4 to be used, a dose-response experiment was performed in wild-type H-2K MB (Fig. 5A). Increasing concentrations of recombinant Bmp4 induced an increase of R-Smads phosphorylation reaching a maximum level at the concentration of 100 ng/mL. Thus, this concentration has been used for all further experiments.

To evaluate if the addition of Bmp4 could rescue the premature muscle differentiation in *Lmna*^{-/-} H-2K MB, myoblasts were treated with recombinant Bmp4 (100 ng/mL) during 24 hours and then placed into differentiation medium during 48 hours without Bmp4. Cells were fixed, and immunolabelled for MyHC (in green) and DAPI (in blue) (Fig. 5B). Differentiation indexes were calculated for each condition (Fig. 5C). In wild-type myoblasts, the differentiation index decreased of 25% (from DI = 44 ± 5 in “vehicle condition” to DI = 33 ± 3 in “Bmp4-treated cells”), confirming that Bmp4 addition reduces myogenic differentiation. In mutated myoblasts, differentiation index only decreased of 14% (from DI = 79 ± 2 in the “vehicle condition” to DI = 68 ± 2 in the “Bmp4-treated cells”) and was still twice higher than in wild-type cells suggesting that *Lmna* null myoblasts cannot fully respond to Bmp4 and that the Bmp pathway may be blocked by a downstream effector.

Smad6 inactivation is sufficient to prevent *Lmna*^{-/-} myoblasts premature differentiation and to restore their response to Bmp4. Based on the previous observation on Bmp4, we tried to rescue *Lmna*^{-/-} premature differentiation by modulating the pathway with small interfering RNA against Smad6 (SiSmad6). *Smad6* expression decreased of about 75% in presence of SiSmad6, both at the RNA (Fig. 6A) and protein (Fig. 6B) levels, in wild-type and *Lmna*^{-/-} H-2K cells.

As previously, proliferating H-2K myoblasts were incubated during 24 hours with SiSmad6 (or a control siRNA) in combination with recombinant Bmp4 (or its vehicle) and then switched to differentiation without any treatment. After 48 hours of differentiation, cells were fixed and immunolabelled for MyHC (Fig. 6C) to calculate a differentiation index (DI) in each condition (Fig. 6D).

As before, Bmp4 addition significantly reduced (-45%) the differentiation index in wild-type myoblasts (from 28% ± 3 to 15% ± 2). At the opposite, Smad6 inactivation slightly increased the DI, although not significantly, (DI with SiSmad6: 36 ± 3). But the addition of Bmp4, even in presence of SiSmad6, lead to a reduced DI comparable to the one measured with Bmp4 without SiSmad6 (DI: 17 ± 3, -39% compared to SiSmad6 only). These results confirm that, in wild-type cells, Bmp4 acts as a repressor of muscle differentiation whereas Smad6 promotes it.

As expected and previously described in Fig. 5, Bmp4 addition (with control siRNA) had not effect on *Lmna*^{-/-} H-2K differentiation. With or without Bmp4, the differentiation index was similar around 50% (±2 or ±3 respectively) and significantly higher than untreated (siRNA control + vehicle) wild-type cells (DI: 28 ± 3), showing, once again, that *Lmna*-null myoblasts differentiate prematurely and do not respond to Bmp4. However, Smad6 down-regulation in *Lmna*^{-/-} myoblasts lead to a reduced differentiation index (-41%, DI: 30 ± 2) comparable to the untreated wild-type cells (Fig. 6D) and to the formation of large myotubes (Fig. 6C) suggesting that

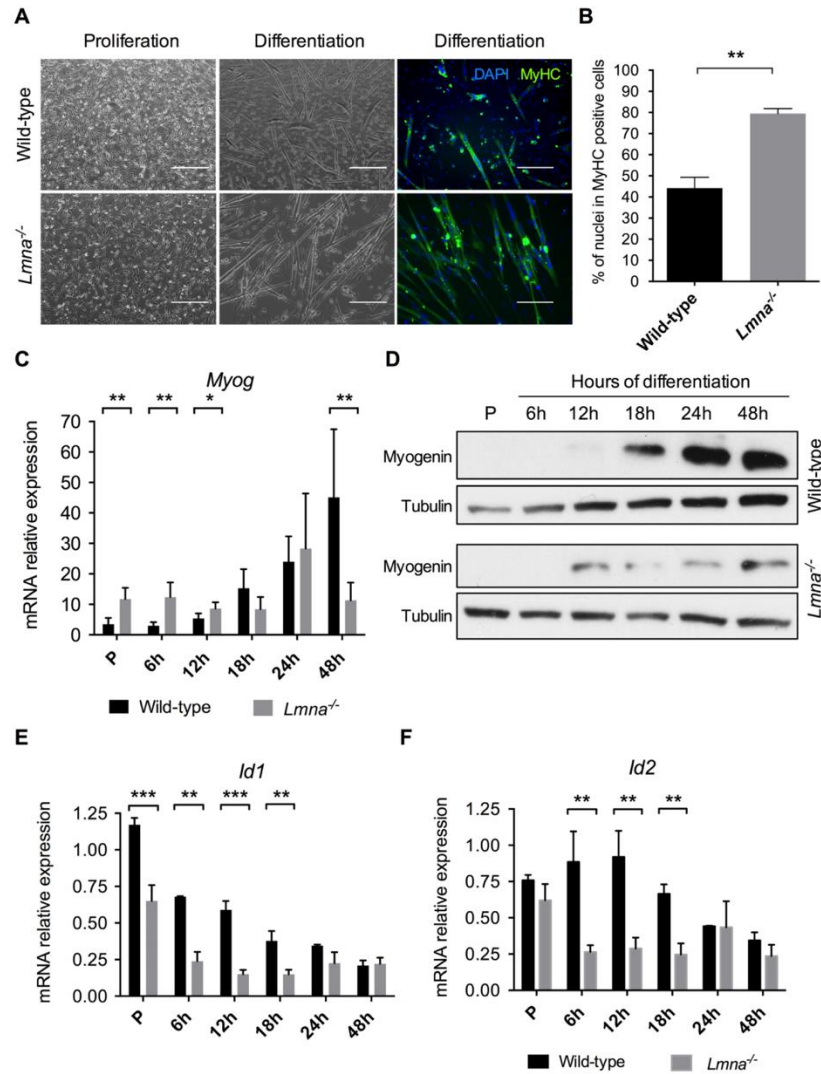


Figure 4. *Lmna*^{-/-} myoblasts premature differentiation. (A) Phase-contrast photographs and immunofluorescence labelling of MyHC (in green) and DAPI (in blue) of wild-type and *Lmna*^{-/-} H-2K MB in proliferation and after 48 hours of differentiation. Scale bar: 400 μ m for proliferation and 200 μ m for differentiation. (B) Quantification of the differentiation index (percentage of nuclei in MyHC positive cells) in wild-type and *Lmna*^{-/-} H-2K myotubes after 48 hours of differentiation. (C,D) Expression of Myogenin measured by quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR) (C) and western blot (D) in wild-type and *Lmna*^{-/-} proliferating myoblasts (P, Proliferation) and during muscle differentiation (from 6 hours to 48 hours of differentiation). (E,F) Expression of *Id1* (E) and *Id2* (F) measured by qRT-PCR in wild-type and *Lmna*^{-/-} proliferating myoblasts (P, Proliferation) and during muscle differentiation (from 6 hours to 48 hours of differentiation). Expression is shown as mean (\pm SEM) of biological replicates (n = 4). Values are relative expression normalized on *Hprt1* housekeeping gene expression. (* p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001, **** p < 0.0001). Full-length blots are presented in Supplementary Figure 4.

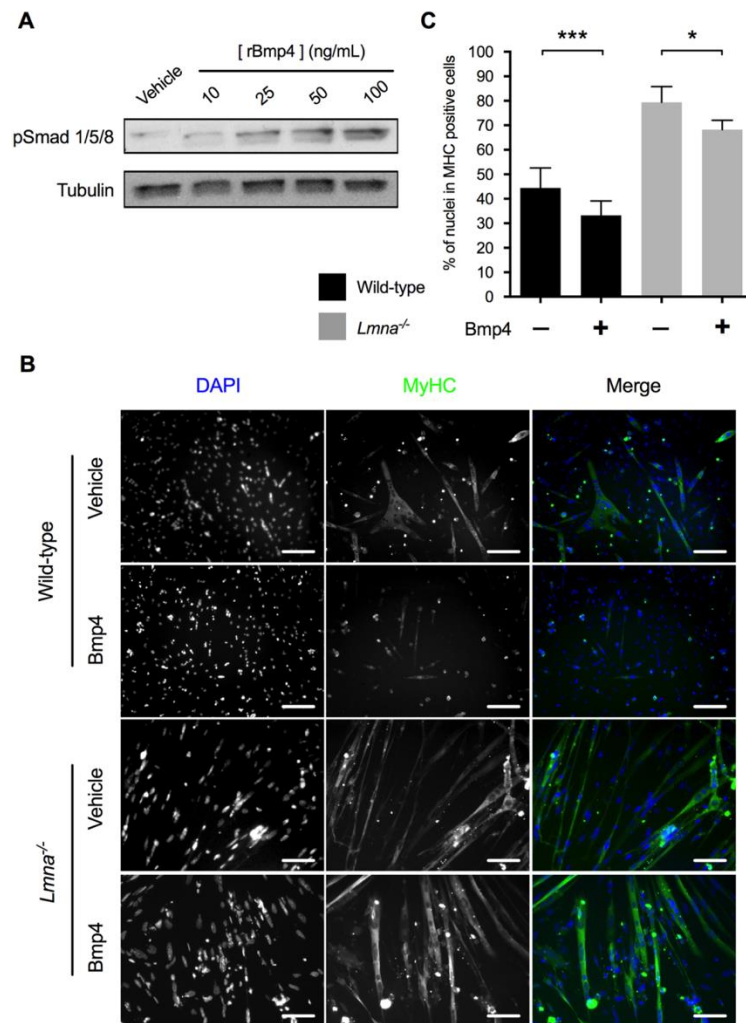


Figure 5. Wild-type and *Lmna*^{-/-} myoblasts response to recombinant Bmp4 addition. (A) Dose-response to recombinant Bmp4 treatment in wild-type H-2K MB measured by R-Smad phosphorylation. (B,C) Wild-type or *Lmna*^{-/-} myoblasts were first incubated during 24 hours in proliferation medium complemented with vehicle (Vh) or recombinant mouse Bmp4 (100 ng/mL) and then switched in differentiation conditions for 48 hours. (B) Immunofluorescence labelling of treated wild-type and *Lmna*^{-/-} H-2K MT after 48 hours of differentiation. Muscle nuclei were stained with DAPI (in blue) and differentiated myotubes were stained with MyHC antibody (in green). (C) Differentiation indexes (percentage of nuclei in MyHC positive cells) quantified in treated wild-type and *Lmna*^{-/-} H-2K. (**p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001, *****p* < 0.0001). Full-length blots are presented in Supplementary Figure 5.

a normal differentiation is restored by Smad6 removal. Moreover, *Lmna*^{-/-} myoblasts treated with both SiSmad6 and Bmp4 showed a differentiation index of 19% (± 1), significantly inferior to Smad6 knock-down only but comparable to wild-type Bmp4-treated cells demonstrating that Smad6 knock-down fully restored the Bmp pathway and response to Bmp4 addition in *Lmna*^{-/-} myoblasts.

These results demonstrate that Smad6 overexpression is responsible for *Lmna*^{-/-} premature differentiation and that timely differentiation can be restored by Smad6 knock-down.

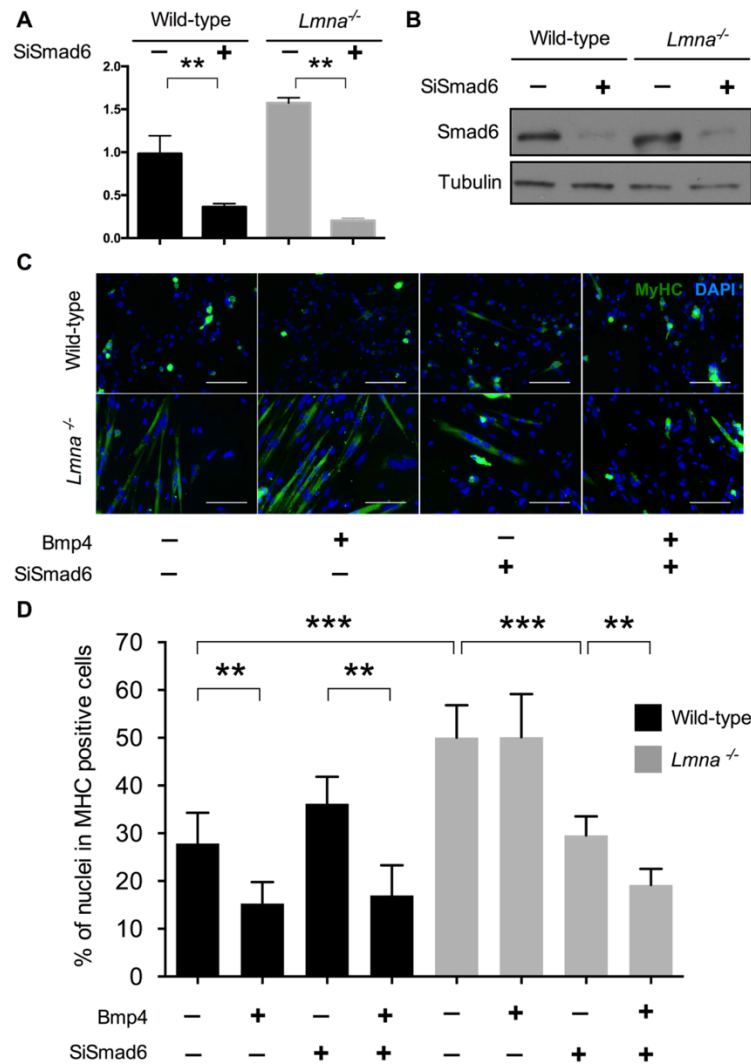


Figure 6. Precocious differentiation rescue in *Lmna*^{-/-} MB by *Smad6* inactivation. (A) Quantification of *Smad6* expression by RT-qPCR in presence of scramble siRNA (SiCtrl) or a siRNA against *Smad6*. Values are relative expression normalized on *Hprt1* housekeeping gene expression. (B) *Smad6* protein levels quantified by western blot in presence of SiCtrl or SiSmad6. Tubulin expression levels are provided as normalizer. (C) Immunofluorescence assay showing MyHC (in green) and DAPI (in blue) of wild-type and *Lmna*^{-/-} H-2K myotubes after 24 hours of treatment with *Smad6*-SiRNA (or SiCtrl) and recombinant Bmp4 (100ng/mL) (or vehicle) followed by 48 hours of differentiation. Scale bar: 200 μ m. (D) Differentiation index (percentage of nuclei in MyHC positive cells) for each condition showing that the double treatment by *Smad6*-SiRNA and recombinant Bmp4 in *Lmna*^{-/-} H-2K MB is able to rescue the phenotype and to prevent the observed premature differentiation. At least 350 nuclei per conditions were analyzed. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$). Full-length blots are presented in Supplementary Figure 6.

BMP4 pathway is also altered in human *LMNA*^{+/-} mutated myoblasts. We sought to verify that BMP4 pathway alterations were also relevant for the human pathology. Hence, the main defects observed in murine *Lmna*^{-/-} myoblasts were probed in human myoblasts from patient carriers of different *LMNA* mutations.

Three already reported mutations were tested: two missense mutations and an in-frame deletion reported in a typical EDMD family (p.H222P)³⁸, and in patients with severe EDMD (p.K32del) or L-CMD (p.K32del and p.L380S)^{39–41}. An additional mutation, not already reported in GnomAD consortium, was also tested. The patient is heterozygous for a nonsense mutation (NM_170707.2: c.928C>T), p.Q310*, located in exon 5 of *LMNA* gene. This 41-year old man suffered from cardiomyopathy associating sinus bradycardia, atrio-ventricular block and ventricular arrhythmia. This cardiac phenotype led to the implantation of a pacemaker. The patient suffered also from a myopathy associating widespread muscle pain, walking difficulties and chronic tiredness. Moving from a squat position to standing was difficult. Electromyogram argued in favor of muscular damages (Supplementary Table S1). The *LMNA* identified mutation leads to *LMNA* haploinsufficiency (Fig. 7A and B). *LMNA* mRNA expression was reduced of 49% (Fig. 7A) and correlated with a decrease of lamin A protein (Fig. 7B) in *LMNA*^{+Q310*} myoblasts compared to myoblasts from an age- and gender-matched healthy control subject (45-year old man, ref Y327 M01).

BMP4 expression was quantified in the *LMNA* mutated-patients and healthy control myoblasts. Surprisingly, *BMP4* mRNA expression was four times higher in *LMNA*^{+Q310*} MB compared to control myoblasts (1.12 ± 0.03 in control MB versus 4.6 ± 0.24 in *LMNA*^{+Q310*} MB, mean \pm SEM) (Fig. 7C). However, at the protein level, a decrease of BMP4 expression was observed (Fig. 7D) suggesting that *LMNA* mutation also affects BMP4 protein stability. In other patient myoblasts, *BMP4* mRNA expression levels were variable but always altered (Supplementary Figure S9).

SMAD6 mRNA was also found to be overexpressed in *LMNA*^{+Q310*} myoblasts (1.06 ± 0.06 in control MB versus 3.07 ± 0.24 in *LMNA*^{+Q310*} MB, mean \pm SEM) although no difference in other SMAD (i.e. *SMAD1* and *SMAD4*) expression was found (Fig. 7E). *SMAD6* overexpression in *LMNA*^{+Q310*} myoblasts was confirmed at the protein level by western-blot (Fig. 7F). In other patient myoblasts, *SMAD6* mRNA expression was increased in *LMNA*^{+p.K32del} and *LMNA*^{+p.L380S} myoblasts but not in *LMNA*^{+H222P} myoblasts (Supplementary Figure S9).

Finally, to determine if the molecular mechanism of the pathway impairments were comparable between H-2K and human myoblasts, an immunofluorescence to localize pSMAD1/5/8 and SMAD6 was performed in *LMNA*^{+Q310*} myoblasts. As in *Lmna*^{-/-} H-2K myoblasts, the overexpression of SMAD6 in *LMNA*^{+Q310*} human myoblasts was responsible for a partial sequestration of phosphorylated R-SMADs in the cytoplasm (Fig. 7H). The quantification of grey levels of each labelling confirmed that, in myoblasts from the healthy control, phosphorylated R-SMADs (in green) were accumulated in the cells nuclei (DAPI staining in blue) whereas, in affected myoblasts, phosphorylated R-SMADs were diffuse in both the cytoplasm and nucleus of the cell, partially colocalizing with overexpressed SMAD6 dots (Fig. 7I). Finally, a premature expression of myogenin was found in proliferative *LMNA*^{+Q310*} human myoblasts compared to those from the healthy control (Fig. 7G).

Altogether, these results demonstrate that the BMP4 pathway is impaired simultaneously in human myoblasts mutated for the *LMNA* gene and in murine *Lmna*^{-/-} myoblasts. In *Lmna*^{-/-} myoblasts, this impairment is responsible for an accelerated differentiation phenotype and Smad6 inactivation is sufficient to restore a normal response to recombinant Bmp4 and a timely differentiation.

Discussion

Nuclear lamins play a crucial role in insuring the integrity of the nuclear envelope and the organization of chromatin regulating gene expression processes. *LMNA* mutations have been associated with several human pathologies, generally only affecting one or few tissues, suggesting that each particular mutation could alter the interaction between lamins A/C and tissue-specific partners⁴². Importantly, more than 80% of currently known mutations lead to skeletal muscle defects⁴³. Lamins A/C have been shown to be necessary for proper muscle differentiation²⁰. Primary *Lmna*-null myoblasts displayed impaired expression of muscle differentiation regulators such as MyoD1, pRB and Desmin and altered differentiation potential. However, it was suggested that the culture conditions required by primary myoblasts, based on FGF complementation, could interfere with the pathological phenotype and limit the identification of the altered signaling pathways in *Lmna*-null myoblasts²⁰. To avoid the issues linked to primary cells culture and to tightly control the proliferation/differentiation transition, we used a previously described model of conditionally immortalized murine myoblasts, the H-2K cell lines, to identify and dissect new potentially altered signaling pathways in *LMNA*-mutated myoblasts¹⁸.

Our results reinforce the central role of muscle stem cells, so called satellite cells, in the muscular forms of laminopathies by showing *Lmna*^{-/-} H-2K myoblasts precocious differentiation due to the alteration of a crucial signaling pathway implicated in the maintenance of stem cells proliferation and the prevention of premature differentiation: the BMP4 pathway. They also identify Smad6 overexpression as the main defect of this pathway as siRNA-mediated Smad6 inactivation restored *Lmna*^{-/-} myoblasts response to Bmp4 and timely differentiation. Finally, these defects were also observed in human primary myoblasts from patients carrying heterozygous *LMNA* mutations, suggesting that BMP4 pathway alterations are relevant in human muscular laminopathies.

Our results on the consequence of BMP4 pathway alterations in *LMNA*-mutated myoblasts are consistent with recent data showing that BMP4 pathway is crucial for preventing premature myogenic differentiation²⁷ and for the induction⁴⁴ and the formation of myotubes⁴⁵. BMP4 pathway is known to be important *in vivo* for muscle mass control: its inhibition is responsible for muscle atrophy and can abolish the hypertrophy observed in myostatin-deficient mice^{28,46}. Moreover, BMPRII receptor has been shown to be enriched at the neuromuscular junction (NMJ) in *Drosophila*⁴⁷ and BMP pathway to be crucial for the differentiation of motor neurons and the successful assembly of NMJ⁴⁸. Finally, BMP pathway is known to be important for heart embryogenesis and morphogenesis^{49,50}. Interestingly, *LMNA* mutations have been associated, both in mice and humans, with muscle wasting³⁸, dysfunctional neuromuscular junctions⁹ and dilated cardiomyopathy with conduction defects^{51,52}. In this context, exploration and *in vivo* modulation of the BMP pathway could represent an interesting approach to rescue the muscle and cardiac phenotypes observed in *Lmna*^{Δ8–11} mice and *LMNA*-mutated patients.

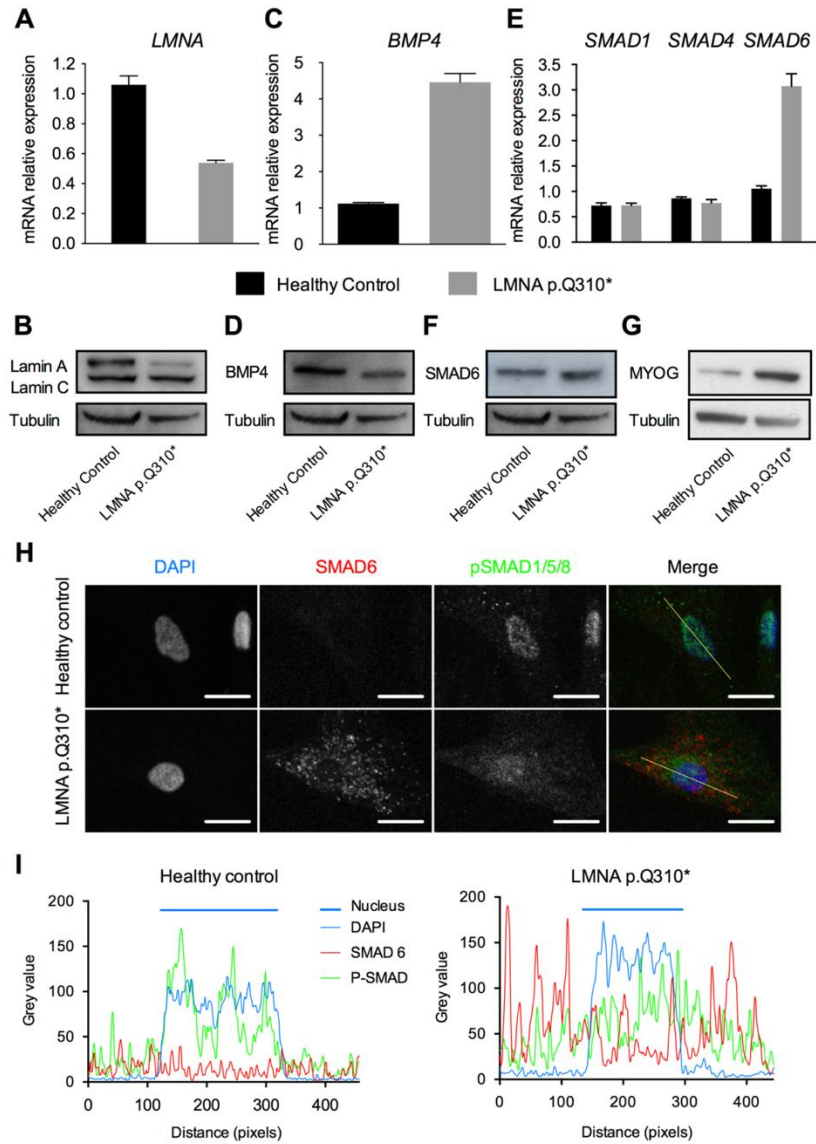


Figure 7. Impaired BMP4 pathway in Human myoblasts carrying a non-sense mutation (*LMNA* p.Q310*). (A,C,E) Expression of *LMNA*, *BMP4*, *SMAD1*, *SMAD4* and *SMAD6* measured by quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR) in MB from a healthy control and *LMNA* p.Q310* carrier. Expression is shown as mean of biological replicates (n = 2). Values are relative expression normalized on *HPRT* housekeeping gene expression. (B,D,F,G) Protein levels of Lamin A and C, BMP4, SMAD6 and Myogenin quantified by western blot in MB from control and patient. Tubulin expression levels are provided as normalizer. (H) Immunofluorescence assay in wild type and mutated MB showing the intracellular localization of phosphorylated R-SMADs and SMAD6. Scale bar: 10 μ m. (I) Intensity plots of each dye along the line shown in (C). Full-length blots are presented in Supplementary Figure 7.

By competing with SMAD4 to interact with phosphorylated R-SMADs, SMAD6, has an inhibitory role on the BMP pathway and avoids the expression of target genes such as *ID1* and *ID2*³⁴. SMADs are common intracellular transducers in at least two distinct activation pathways: the BMP4 pathway and the TGF β pathway¹⁸. Alterations of the TGF β pathway have been previously described in the same model of conditionally immortalized *Lmna*^{-/-} myoblasts. In this study, increased nuclear levels of Smad2/3 have been observed in *Lmna*^{-/-} H-2K MBs. This TGF β pathway alteration was responsible for a delayed activation of the satellite cell. Interestingly, TGF β pathway is relatively close to BMP4 pathway. SMAD2 and SMAD3, phosphorylated in response to the binding of a ligand to its receptor, are able to bind SMAD4 to translocate into the nucleus in order to activate target genes expression^{32,53}. In a similar way, SMAD7, but not SMAD6, is able to compete with SMAD4 to avoid SMAD2/3 intranuclear translocation^{54–56}. In our study, the overexpression of SMAD6 found both at the transcript and at the protein level is the determinant alteration of the BMP4 pathway. Moreover, a slight increase in Smad4 expression was observed in *Lmna*^{-/-} H-2K MBs (Fig. 3A and B)¹⁸. One could postulate that the competition between Smad6 and Smad4 to interact with pSmad1/5/8 would lead to an increased availability of Smad4 to interact with pSmad2/3. As a consequence, modulating Smad6 expression would indirectly affect the TGF β pathway by increasing the intranuclear translocation of Smad4-pSmad2/3 complexes. The overexpression of SMAD6 would then be responsible for an impaired proliferation and a precocious differentiation due to an imbalance between BMP4 and TGF β pathways. Recently, a similar balance between BMP and TGF β pathways has been described as a key regulator of muscle mass⁵⁷. Using AAV-mediated codelivery of activin and myostatin inhibitors, the authors induced a complete inhibition of pSMAD2/3 pathway and an activation of the pSMAD1/5/8 axis leading to a hypertrophy mediated by both an increased protein synthesis and a decreased ubiquitin-dependent protein degradation. It was consistent with the fact that, at the opposite, genetic disruption of Smad7 lead to skeletal muscle growth and regeneration impairment⁵⁸.

The way lamins A/C could regulate Bmp4 and Smad6 expression is currently unclear. Of note, in *Lmna*^{-/-} myoblasts, the expression and the localization of other lamins such as lamin B1 is not affected (Supplementary Figures S10 and S11). Amongst the different hypotheses proposed to explain how ubiquitous lamin mutations could affect muscle tissue is the “structural hypothesis”. This hypothesis postulates that the loss of structural functions of lamins A/C is responsible for a higher cellular susceptibility to suffer from mechanical damages⁵⁸. This hypothesis is supported by evidences on abnormal *LMNA*-mutated myoblasts alignment in a soft-gel matrix associated with an enhance activation of the yes-associated protein (YAP) signaling¹⁷. Data in human mesenchymal stem cells (MSC) and chondrogenesis show that YAP activity is responsible for a decrease in R-SMADs phosphorylation and expression of *ID1* and *ID2*⁵⁹. Moreover, YAP signaling has been shown to enhance the nuclear localization of phosphorylated SMAD2/3, molecular transducers of the TGF β pathway⁶⁰. Altogether, these results suggest that the higher susceptibility to mechanical damages and impaired mechanotransduction could be linked to BMP4 pathway impairments.

In all cases, a recent study investigating the impact of different *LMNA* mutations on MSC differentiation capabilities found that BMP4 expression is often altered in these contexts. Interestingly, depending on the *LMNA* mutation, BMP4 expression could be either stimulated or repressed on a case-by-case basis⁶¹. We also had the opportunity to test if our key results could be reproduced in human myoblasts from patients carrying *LMNA* mutations. We confirmed that BMP4 and SMAD6 expression are dysregulated in mutated patient myoblasts. In *LMNA*^{+Q310*} myoblasts, these impairments lead to a partial sequestration of phosphorylated R-SMADs in the cytoplasm. Unexpectedly, we found *BMP4* RNA expression to be increased in patient cells whereas the BMP4 protein level was reduced, suggesting a potential post-transcriptional regulation or an impaired protein stability in *LMNA*^{+Q310*} myoblasts. This observation was in line with the absence of detection of Bmp4 protein in *Lmna*^{-/-} H-2K myoblasts.

The major specific role of BMP pathway in the maintenance of an adult satellite cell pool has been recently demonstrated. More particularly, the authors showed that the SMAD6 overexpression is capable of inhibiting satellite cell-dependent postnatal muscle growth and the generation of an adult satellite cell pool⁶². Based on these observations and our results, inactivation of SMAD6 expression appears as a potential therapeutic target to modulate the balance between BMP4 and TGF β pathways. This could rescue satellite cells proliferation and differentiation, prevent satellite cells exhaustion and, more largely, improve the muscle phenotype observed in striated muscle laminopathies.

Taken together, these results provide a new insight into the pathophysiological mechanism underlying skeletal muscles and muscle stem cells defects in striated muscle laminopathies.

References

1. Aebi, U., Cohn, J., Buhle, L. & Gerace, L. The nuclear lamina is a meshwork of intermediate-type filaments. *Nature* **323**, 560–564 (1986).
2. Lin, F. & Worman, H. J. Structural organization of the human gene encoding nuclear lamin A and nuclear lamin C. *J. Biol. Chem.* **268**, 16321–16326 (1993).
3. Burke, B. & Stewart, C. L. The laminopathies: the functional architecture of the nucleus and its contribution to disease. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* **7**, 369–405 (2006).
4. Dechat, T. et al. Nuclear lamins: major factors in the structural organization and function of the nucleus and chromatin. *Genes Dev.* **22**, 832–853 (2008).
5. Gruenbaum, Y. & Foisner, R. Lamins: nuclear intermediate filament proteins with fundamental functions in nuclear mechanics and genome regulation. *Annu. Rev. Biochem.* **84**, 131–164 (2015).
6. Janin, A., Bauer, D., Ratti, F., Millat, G. & Méjat, A. Nuclear envelopopathies: a complex LINC between nuclear envelope and pathology. *Orphanet J. Rare Dis.* **12**, 147 (2017).
7. Worman, H. J. Nuclear lamins and laminopathies. *J. Pathol.* **226**, 316–325 (2012).
8. Lattanzi, G. et al. Laminopathies: many diseases, one gene. *Report of the first Italian Meeting Course on Laminopathies. Acta Myol. Myopathies Cardiomyopathies Off. J. Mediterr. Soc. Myol. Ed. Gaetano Conte Acad. Study Striated Muscle Dis.* **30**, 138–143 (2011).

9. Méjat, A. *et al.* Lamin A/C-mediated neuromuscular junction defects in Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *J. Cell Biol.* **184**, 31–44 (2009).
10. Sullivan, T. *et al.* Loss of A-type lamin expression compromises nuclear envelope integrity leading to muscular dystrophy. *J. Cell Biol.* **147**, 913–920 (1999).
11. Mounkes, L. C., Kozlov, S. V., Rottman, J. N. & Stewart, C. L. Expression of an LMNA-N195K variant of A-type lamins results in cardiac conduction defects and death in mice. *Hum. Mol. Genet.* **14**, 2167–2180 (2005).
12. Wang, Y., Herron, A. J. & Worman, H. J. Pathology and nuclear abnormalities in hearts of transgenic mice expressing M371K lamin A encoded by an LMNA mutation causing Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Hum. Mol. Genet.* **15**, 2479–2489 (2006).
13. Bertrand, A. T. *et al.* 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 (2012).
14. Kubben, N. *et al.* Post-natal myogenic and adipogenic developmental defects and metabolic impairment upon loss of A-type lamins. *Nucl. Austin Tex* **2**, 195–207 (2011).
15. Zhang, H., Kieckhafer, J. E. & Cao, K. Mouse models of laminopathies. *Aging Cell* **12**, 2–10 (2013).
16. Broers, J. L. V. *et al.* Decreased mechanical stiffness in LMNA^{-/-} cells is caused by defective nucleo-cytoskeletal integrity: implications for the development of laminopathies. *Hum. Mol. Genet.* **13**, 2567–2580 (2004).
17. Bertrand, A. T. *et al.* Cellular microenvironments reveal defective mechanosensing responses and elevated YAP signaling in LMNA-mutated muscle precursors. *J. Cell Sci.* **127**, 2873–2884 (2014).
18. Cohen, T. V. *et al.* Defective skeletal muscle growth in lamin A/C-deficient mice is rescued by loss of Lap2 α . *Hum. Mol. Genet.* **22**, 2852–2869 (2013).
19. Bakay, M. *et al.* Nuclear envelope dystrophies show a transcriptional fingerprint suggesting disruption of Rb-MyoD pathways in muscle regeneration. *Brain J. Neurol.* **129**, 996–1013 (2006).
20. Frock, R. L. *et al.* Lamin A/C and emerin are critical for skeletal muscle satellite cell differentiation. *Genes Dev.* **20**, 486–500 (2006).
21. Jahn, D. *et al.* A truncated lamin A in the Lmna^{-/-} mouse line: implications for the understanding of laminopathies. *Nucl. Austin. Tex* **3**, 463–474 (2012).
22. Jat, P. S. *et al.* Direct derivation of conditionally immortal cell lines from an H-2Kb-tsA58 transgenic mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 5096–5100 (1991).
23. Morgan, J. E. *et al.* Myogenic cell lines derived from transgenic mice carrying a thermolabile T antigen: a model system for the derivation of tissue-specific and mutation-specific cell lines. *Dev. Biol.* **162**, 486–498 (1994).
24. Chen, G., Deng, C. & Li, Y.-P. TGF- β and BMP Signaling in Osteoblast Differentiation and Bone Formation. *Int. J. Biol. Sci.* **8**, 272–288 (2012).
25. Wozney, J. M. The bone morphogenetic protein family and osteogenesis. *Mol. Reprod. Dev.* **32**, 160–167 (1992).
26. Miyazono, K., Kamiya, Y. & Morikawa, M. Bone morphogenetic protein receptors and signal transduction. *J. Biochem. (Tokyo)* **147**, 35–51 (2010).
27. Ono, Y. *et al.* BMP signalling permits population expansion by preventing premature myogenic differentiation in muscle satellite cells. *Cell Death Differ.* **18**, 222–234 (2011).
28. Sartori, R. *et al.* BMP signaling controls muscle mass. *Nat. Genet.* **45**, 1309–1318 (2013).
29. Muses, S., Morgan, J. E. & Wells, D. J. A new extensively characterised conditionally immortal muscle cell-line for investigating therapeutic strategies in muscular dystrophies. *PLoS One* **6**, e24826 (2011).
30. Chen, E. Y. *et al.* Enrichr: interactive and collaborative HTML5 gene list enrichment analysis tool. *BMC Bioinformatics* **14**, 128 (2013).
31. Kuleshov, M. V. *et al.* Enrichr: a comprehensive gene set enrichment analysis web server 2016 update. *Nucleic Acids Res.* **44**, W90–97 (2016).
32. Feng, X.-H. & Derynck, R. Specificity and versatility in tgf-beta signaling through Smads. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **21**, 659–693 (2005).
33. Imamura, T. *et al.* Smad6 inhibits signalling by the TGF-beta superfamily. *Nature* **389**, 622–626 (1997).
34. Hata, A., Lagna, G., Massagué, J. & Hemmati-Brivanlou, A. Smad6 inhibits BMP/Smad1 signaling by specifically competing with the Smad4 tumor suppressor. *Genes Dev.* **12**, 186–197 (1998).
35. Hollnagel, A., Oehlmann, V., Heymer, J., Rütther, U. & Nordheim, A. Id genes are direct targets of bone morphogenetic protein induction in embryonic stem cells. *J. Biol. Chem.* **274**, 19838–19845 (1999).
36. Katagiri, T. *et al.* Identification of a BMP-responsive element in Id1, the gene for inhibition of myogenesis. *Genes Cells Devoted Mol. Cell. Mech.* **7**, 949–960 (2002).
37. Jen, Y., Weintraub, H. & Benezra, R. Overexpression of Id protein inhibits the muscle differentiation program: *in vivo* association of Id with E2A proteins. *Genes Dev.* **6**, 1466–1479 (1992).
38. Bonne, G. *et al.* Clinical and molecular genetic spectrum of autosomal dominant Emery-Dreifuss muscular dystrophy due to mutations of the lamin A/C gene. *Ann. Neurol.* **48**, 170–180 (2000).
39. Quijano-Roy, S. *et al.* De novo LMNA mutations cause a new form of congenital muscular dystrophy. *Ann. Neurol.* **64**, 177–186 (2008).
40. Muchir, A. *et al.* 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 (2004).
41. Arimura, T. *et al.* Mouse model carrying H222P-Lmna mutation develops muscular dystrophy and dilated cardiomyopathy similar to human striated muscle laminopathies. *Hum. Mol. Genet.* **14**, 155–169 (2005).
42. Scharner, J., Gnocchi, V. F., Ellis, J. A. & Zammit, P. S. Genotype-phenotype correlations in laminopathies: how does fate translate? *Biochem. Soc. Trans.* **38**, 257–262 (2010).
43. Bertrand, A. T., Chikhaoui, K., Yaou, R. B. & Bonne, G. Clinical and genetic heterogeneity in laminopathies. *Biochem. Soc. Trans.* **39**, 1687–1692 (2011).
44. Furutani, Y., Umamoto, T., Murakami, M., Matsui, T. & Funaba, M. Role of endogenous TGF- β family in myogenic differentiation of C2C12 cells. *J. Cell. Biochem.* **112**, 614–624 (2011).
45. Umamoto, T., Furutani, Y., Murakami, M., Matsui, T. & Funaba, M. Endogenous Bmp4 in myoblasts is required for myotube formation in C2C12 cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1810**, 1127–1135 (2011).
46. Winbanks, C. E. *et al.* The bone morphogenetic protein axis is a positive regulator of skeletal muscle mass. *J. Cell Biol.* **203**, 345–357 (2013).
47. Chou, H.-J. *et al.* BMP4 is a peripherally-derived factor for motor neurons and attenuates glutamate-induced excitotoxicity *in vitro*. *PLoS One* **8**, e58441 (2013).
48. Benavente, F., Pinto, C., Parada, M., Henriquez, J. P. & Osses, N. Bone morphogenetic protein 2 inhibits neurite outgrowth of motor neuron-like NSC-34 cells and up-regulates its type II receptor. *J. Neurochem.* **122**, 594–604 (2012).
49. Klaus, A. *et al.* Wnt/ β -catenin and Bmp signals control distinct sets of transcription factors in cardiac progenitor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **109**, 10921–10926 (2012).
50. Kruthof, B. P. T., Duijn, S. N., Moerkamp, A. T. & Goumans, M.-J. TGF β and BMP signaling in cardiac cushion formation: lessons from mice and chicken. *Differ. Res. Biol. Divers.* **84**, 89–102 (2012).
51. Millat, G. *et al.* Clinical and mutational spectrum in a cohort of 105 unrelated patients with dilated cardiomyopathy. *Eur. J. Med. Genet.* **54**, e570–575 (2011).

52. Mounkes, L. C., Burke, B. & Stewart, C. L. The A-type lamins: nuclear structural proteins as a focus for muscular dystrophy and cardiovascular diseases. *Trends Cardiovasc. Med.* **11**, 280–285 (2001).
53. Massagué, J. & Wotton, D. Transcriptional control by the TGF- β /Smad signaling system. *EMBO J.* **19**, 1745–1754 (2000).
54. Huang, Y. *et al.* Smad7 instead of Smad6 blocks epithelial-mesenchymal transition induced by TGF-beta in human renal proximal tubule epithelial cells. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi Chin. J. Cell. Mol. Immunol.* **24**, 1074–1078 (2008).
55. Zhao, J., Shi, W., Chen, H. & Warburton, D. Smad7 and Smad6 Differentially Modulate Transforming Growth Factor β -induced Inhibition of Embryonic Lung Morphogenesis. *J. Biol. Chem.* **275**, 23992–23997 (2000).
56. Nakao, A. *et al.* Identification of Smad7, a TGFbeta-inducible antagonist of TGF-beta signalling. *Nature* **389**, 631–635 (1997).
57. Chen, J. L. *et al.* Specific targeting of TGF- β family ligands demonstrates distinct roles in the regulation of muscle mass in health and disease. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **114**, E5266–E5275 (2017).
58. Cohen, T. V., Kollias, H. D., Liu, N., Ward, C. W. & Wagner, K. R. Genetic disruption of Smad7 impairs skeletal muscle growth and regeneration. *J. Physiol.* **593**, 2479–2497 (2015).
59. Karystinou, A. *et al.* Yes-associated protein (YAP) is a negative regulator of chondrogenesis in mesenchymal stem cells. *Arthritis Res. Ther.* **17**, 147 (2015).
60. Nishio, M. *et al.* Dysregulated YAP1/TAZ and TGF- β signaling mediate hepatocarcinogenesis in Mob1a/1b-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **113**, E71–E80 (2016).
61. Malashicheva, A. *et al.* Various lamin A/C mutations alter expression profile of mesenchymal stem cells in mutation specific manner. *Mol. Genet. Metab.* **115**, 118–127 (2015).
62. Stantzou, A. *et al.* BMP signaling regulates satellite cell dependent postnatal muscle growth. *Development* dev 144089, <https://doi.org/10.1242/dev.144089> (2017).

Acknowledgements

The authors would like to thank Valentin Duthion for his technical assistance in the differentiation indexes quantification and Terry Partridge for the gift of H-2K cell lines and for his proof reading and English language improvements. This work was supported by the French National Agency for Research (ANR-13-JSV6-0003-01) and the French Association against Myopathies (AFM-Téléthon Grant N°14634). Muscle samples and associated data from patients (M45876 and Z717 M01) and healthy control (Y327 M01) were obtained from Cardiobiotec Biobank (CRB-HCL Hospices Civils de Lyon BB-0033-00046).

Author Contributions

A.J. performed the experiments. D.B., F.R., C.V., E.C. and V.G. provided technical assistance. A.J. and A.M. designed the experiments and wrote the manuscript. E.C., A.B., N.S. and G.B. provided myoblasts from human donors. T.C. isolated H-2K clones. All authors read, critically revised and approved the final manuscript.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23918-x>.

Competing Interests: The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article. T.C. is currently working at the NIH. This work was conducted while she was employed at the Childrens Research Institute. The opinions expressed in this article are the author's own and do not reflect the view of the NIH, the Department of Health and Human Services, or the United States government.

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2018

Chapitre 4 : DISCUSSION ET CONCLUSION

1 Résumé des résultats

La lamina nucléaire joue un rôle crucial dans le maintien de l'intégrité de l'enveloppe nucléaire, dans l'organisation de la chromatine et dans la régulation de l'expression des gènes. Les mutations dans le gène *LMNA* ont été associées à de nombreuses pathologies humaines affectant généralement un ou plusieurs tissus et la corrélation entre le génotype et le phénotype demeure obscur. Ceci suggère donc que chacun des variants pathogènes décrits altère l'interaction entre les lamines A/C et des partenaires tissus-spécifiques (369). De plus, plus de 80% des mutations actuellement décrites sont associées à des défauts musculaires (370) et les lamines A/C jouent un rôle central dans la mise en place d'une différenciation musculaire efficace (265).

Il a été décrit que des myoblastes primaires murins inactivés pour le gène *Lmna* présentaient une altération de l'expression de régulateurs cruciaux de la différenciation musculaire tels que MyoD1, pRB et desmine et donc un potentiel de différenciation musculaire diminué. Cependant, l'utilisation de ce modèle de myoblastes primaires ainsi que les conditions de cultures permettant leur prolifération avec des milieux complétés en FGF notamment pouvait modifier le phénotype pathologique observé et ainsi limiter la mise en évidence d'altération de voies de signalisation cruciales pour la différenciation musculaire (265).

Pour éviter ces limitations liées à l'utilisation de cultures de cellules primaires mais également afin de finement contrôler la transition de la prolifération cellulaire à la différenciation musculaire, nous avons utilisé un modèle précédemment décrit de myoblastes murins conditionnellement immortalisés, les cellules H-2K, afin d'identifier de nouvelles voies de signalisation potentiellement altérées chez les myoblastes inactivés pour le gène *Lmna* (205).

Nos résultats renforcent donc le rôle central des cellules souches musculaires dans le mécanisme physiopathologique conduisant aux formes musculaires de laminopathies puisque nous montrons une différenciation prématurée des myoblastes H-2K *Lmna*^{-/-} liée à l'altération d'une voie de signalisation cruciale impliquée dans le maintien de la prolifération des cellules souches et dans la prévention d'une différenciation précoce : la

voie BMP4. Nous avons également pu montrer que le principal défaut de cette voie dans les myoblastes H-2K *Lmna*^{-/-} est une surexpression du Smad inhibiteur, Smad6, puisque des expériences d'ARN interférents visant à diminuer son expression est à même de rétablir une réponse à l'ajout de Bmp4 recombinant dans le milieu et de restaurer une cinétique de différenciation correcte.

Enfin, ces défauts ont également pu être mis en évidence dans des myoblastes primaires humains obtenus après biopsie musculaire de patients porteurs de mutations du gène *LMNA* à l'état hétérozygote. Nous avons d'abord eu l'opportunité de tester la reproductibilité de nos résultats dans des myoblastes humains obtenus à partir d'une biopsie musculaire chez un patient porteur d'une mutation non-sens à l'état hétérozygote localisée dans l'exon 5 du gène *LMNA* (NM_170707.2:c.928C>T, p.Arg310Stop) conduisant à une haploinsuffisance. Ce patient de 41 ans souffre d'une cardiomyopathie dilatée associée à une bradycardie sinusale, un bloc auriculo-ventriculaire et une arythmie ventriculaire nécessitant l'implantation d'un pacemaker. Ce phénotype cardiaque est associé à un phénotype musculaire combinant des douleurs musculaires diffuses, des difficultés de locomotion, une fatigue chronique avec un électromyogramme en faveur d'une atteinte musculaire. Nous avons confirmé une légère diminution de l'expression de BMP4 au niveau protéique, associée à une nette surexpression de l'inhibiteur SMAD6. De façon intéressante, une séquestration cytoplasmique partielle des formes phosphorylées des SMADs 1, 5 et 8 a pu être mise en évidence par immunofluorescence.

Nous avons ensuite eu accès, grâce à la collaboration avec l'équipe de Gisèle Bonne, à des myoblastes humains porteurs de différentes mutations du gène *LMNA* à l'état hétérozygote. Cinq patients et un contrôle ont ainsi pu être testés (cf. Annexe 4) :

- Deux patients porteurs d'une délétion d'un acide aminé à l'état hétérozygote, respectant ainsi le cadre de lecture : la mutation p.Lys32del. Cette délétion a été précédemment décrite dans la littérature. Ces deux patients souffrent soit d'une dystrophie musculaire d'Emery-Dreifuss sévère soit d'une dystrophie musculaire congénitale ;
- Un patient porteur de la variation pathogène faux-sens à l'état hétérozygote : p.Leu380Ser. Cette variation a été précédemment décrite dans la littérature chez un patient souffrant de dystrophie musculaire congénitale ;

- Un patient porteur de la variation pathogène faux-sens à l'état hétérozygote : p.His222Pro. Cette variation a été précédemment décrite dans la littérature chez une famille souffrant d'une dystrophie musculaire d'Emery-Dreifuss typique.

Pour ces derniers, l'expression de BMP4 est variable mais toujours altérée alors que l'expression de SMAD6 était augmentée dans le cas des myoblastes *LMNA*^{+/p.Lys32del} et *LMNA*^{+/p.Leu380Ser} mais normale dans le cas des myoblastes *LMNA*^{+/p.His222Pro}. Ces résultats sont cohérents avec une étude récente qui étudiait l'impact de différentes mutations du gène *LMNA* sur les capacités de différenciation de cellules souches mésenchymateuses. Dans cette étude, seule l'expression de BMP4 au niveau transcriptionnel a été étudiée. Les auteurs ont montré que l'expression de BMP4 pouvait être soit augmentée soit réprimée selon la mutation *LMNA* étudiée (371). De plus, grâce aux résultats obtenus chez les deux patients porteurs de la variation pathogène p.His222Pro nous pouvons voir que l'expression de BMP4, au moins au niveau transcriptionnel, est variable pour une même mutation puisque qu'elle soit augmentée soit diminuée en fonction du patient considéré. Ceci suggère alors que les altérations de la voie de signalisation BMP4 sont également une piste intéressante dans le mécanisme physiopathologique conduisant aux formes humaines de laminopathies musculaires. Ces altérations sont également une piste intéressante pour expliquer les différences d'expressivité entre différents patients porteurs d'une même variation pathogène.

2 Limites de l'étude

L'utilisation du modèle de myoblastes murins conditionnellement immortalisés permet de résoudre certains problèmes techniques liés à l'utilisation de myoblastes primaires en termes de quantité disponible, de difficultés de synchronisation entre différents clones et de culture dans des milieux supplémentés en certains facteurs de croissance tels que le FGF. Cependant, l'immortalisation conditionnelle de ces myoblastes H-2K repose sur la production de l'antigène thermosensible large T de SV40 sous le contrôle du promoteur H-2K sensible à l'interféron γ . Ainsi, pour permettre leur prolifération, les cellules H-2K sont cultivées à +33°C dans un milieu supplémenté en interféron γ . Cette supplémentation présente donc potentiellement les mêmes inconvénients que la supplémentation utilisée pour les myoblastes primaires et peut donc modifier les résultats obtenus. Afin de s'assurer de l'absence d'effet de la supplémentation en interféron γ sur nos résultats, nous avons étudié le niveau d'expression au niveau transcriptionnel de nos gènes d'intérêt ainsi que la localisation cellulaire de SMAD6 et des formes phosphorylées des SMADs 1, 5 et 8 dans des C2C12 traitées par l'interféron γ et cultivées à +33°C comparées à des cellules C2C12 cultivées dans les conditions habituelles. Aucune différence n'a pu être mise en évidence (cf. Annexes 1 à 3).

3 Le rôle de la voie BMP dans l'homéostasie musculaire squelettique et cardiaque

Nos résultats sur les conséquences de l'altération de la voie de signalisation BMP4 chez des myoblastes mutés ou inactivés pour le gène *LMNA* sont cohérents avec les données récentes montrant le rôle crucial de la voie de signalisation BMP4 dans la prévention d'une différenciation myogénique prématurée (359) et dans l'induction (372) et la formation des myotubes (373).

De plus, la voie BMP4 est connue pour être importante *in vivo* pour le maintien de la masse musculaire : son inhibition est responsable d'une atrophie musculaire et peut empêcher l'hypertrophie observée chez des souris déficientes en myostatine (368)(374). Enfin, chez la drosophile, un enrichissement en récepteur de type BMPRII au niveau de la jonction neuromusculaire (NMJ pour « *Neuromuscular Junction* ») (375) a pu être mis en

évidence et le rôle important de la voie BMP dans la différenciation des motoneurones et dans l'assemblage correct de la NMJ ont été décrits (376).

Enfin, la voie BMP est également connue pour jouer un rôle important dans l'embryogénèse cardiaque et dans la morphogénèse (377)(378).

Ces données sont finalement cohérentes avec les phénotypes décrits causés par des mutations dans le gène *LMNA* chez l'homme et la souris puisqu'on retrouve une perte musculaire (241), un défaut de fonctionnement de la jonction neuromusculaire (379) et une cardiomyopathie dilatée associée à des troubles de la conduction (380)(381). Dans ce contexte, l'exploration et la modulation *in vivo* de la voie BMP4 semble être une approche intéressante pour traiter les phénotypes musculaires et cardiaques observés chez les souris inactivées pour le gène *Lmna* mais surtout chez les patients porteurs d'une mutation du gène *LMNA*.

4 Les protéines SMADs au croisement des voies de signalisation BMP et TGF β

De par sa capacité à entrer en compétition avec le Co-SMAD, SMAD4, dans l'interaction avec les formes phosphorylées des SMADs 1, 5 et 8, SMAD6 joue le rôle d'inhibiteur des voies de signalisation BMP et évite ainsi l'expression des gènes cibles de la voie tels que *ID1* et *ID2* (345).

Cependant, les SMADs sont des molécules intracellulaires de transduction d'un signal extracellulaire commun à au moins deux voies de signalisation distinctes, bien que complémentaires : les voies BMP4 et les voies TGF β (205). L'altération de la voie de signalisation TGF β a été précédemment décrite en utilisant le même modèle que celui utilisé dans nos travaux : les myoblastes H-2K *Lmna*^{-/-}. Dans cette étude, une augmentation de la translocation nucléaire des SMADs 2 et 3 a pu être mise en évidence et ceci est associé à une activation retardée des cellules satellites. De façon très intéressante et comme nous l'avons décrit plus haut, la voie TGF β est relativement proche de la voie BMP4 puisque les SMADs 2 et 3 vont être phosphorylés en réponse à la liaison du ligand à son récepteur et les formes phosphorylées des SMADs 2 et 3 vont pouvoir se lier au SMAD4 pour transloquer dans le noyau et activer la transcription de gènes cibles

(286,287). Autre point de comparaison, SMAD7, et non pas SMAD6, a la capacité d'entrer en compétition avec les formes phosphorylées des SMADs 2 et 3 et d'empêcher leur translocation nucléaire (341)(340)(382).

Dans notre étude, l'augmentation de l'expression de SMAD6 est l'altération principalement identifiée au sein de la voie de signalisation BMP4 mais une légère augmentation de l'expression de SMAD4 a pu également être observée dans le modèle de myoblastes H-2K *Lmna*^{-/-} (205). Nous pouvons donc penser que l'augmentation de l'expression de SMAD6 associée à la compétition entre SMAD6 et SMAD4 pour interagir avec les formes phosphorylées des SMADs 1, 5 et 8 résultent d'une augmentation de la disponibilité de SMAD4 pour interagir avec les formes phosphorylées des SMADs 2 et 3. Par conséquent, moduler l'expression de SMAD6 pourrait indirectement affecter la voie de signalisation TGF β en augmentant la translocation nucléaire du complexe SMAD4-pSMAD2/3. La surexpression de SMAD6 observée pourrait donc être responsable de l'altération de la prolifération et de la différenciation prématurée des myoblastes *Lmna*^{-/-} en déséquilibrant la balance entre les voies de signalisation BMP4 et TGF β .

Récemment, cette balance entre les voies de signalisation BMP4 et TGF β a été décrite comme un régulateur centrale de la masse musculaire (383). Grâce à la co-expression d'activine et d'inhibiteurs de la myostatine par infection par des AAV modifiés, les auteurs ont réussi à induire une inhibition complète de la voie des pSMAD2/3 et une activation de la voie des pSMAD1/5/8 conduisant ainsi une hypertrophie musculaire médiée à la fois par une augmentation de la synthèse protéique mais également par une diminution de la dégradation des protéines par la voie ubiquitine-protéasome. Ceci est cohérent avec le fait que des mutations sur *Smad7* soient responsable d'une altération des capacités de régénération et de croissance musculaire (384).

Enfin, comme nous avons pu le montrer dans notre étude, malgré l'absence de détection d'une sécrétion du ligand Bmp4 au niveau protéique dans notre modèle de myoblastes H-2K inactivés pour le gène *Lmna*^{-/-}, la phosphorylation des Smads 1, 5 et 8 n'est que légèrement diminuée comparée aux myoblastes H-2K sauvages lors de leur prolifération. Ces résultats suggèrent alors une compensation possible entre différentes

voies de signalisation utilisant la phosphorylation des protéines SMADs comme messagers intracellulaire.

5 De la lamina nucléaire aux altérations de la voie BMP

La façon dont les lamines A/C peuvent réguler l'expression de *Bmp4* et de *Smad6* reste cependant obscure, sachant que dans notre modèle de myoblastes H-2K *Lmna*^{-/-}, l'expression de la lamine B1 n'est pas affectée ni du point de vue quantitatif ni du point de vue de sa localisation.

Parmi les hypothèses habituellement proposées pour expliquer comment des mutations au sein d'une protéine ubiquitaire comme la lamine peut conduire à des pathologies n'affectant qu'un seul tissu comme le muscle, on trouve l'hypothèse qualifiée de « structurale ». Cette hypothèse propose que la perte de la fonction structurale de maintien de l'architecture nucléaire des lamines A/C est responsable d'une plus grande susceptibilité cellulaire aux dommages mécaniques (384). Comme nous avons pu le voir plus haut, cette hypothèse est notamment supportée par la description de l'augmentation de la voie de signalisation YAP (« *yes-associated protein* ») associée à une altération des capacités d'alignement des myoblastes mutés sur le gène *LMNA* au sein d'une matrice molle (193).

De façon intéressante, dans un modèle de cellules souches mésenchymateuses humaines, il a été montré que l'activation de la voie de signalisation YAP est responsable d'une diminution de la phosphorylation des SMADs 1, 5 et 8 et donc d'une diminution de l'expression de ID1 et de ID2, gènes cibles de la voie de signalisation BMP (385). La voie de signalisation YAP a également été décrite comme promoteur de la translocation nucléaire des formes phosphorylées des SMADs 2 et 3, molécules transductrices de la voie de signalisation TGF β (386).

Pris dans leur globalité, ces résultats suggèrent que la plus grande sensibilité et l'altération de la mécanotransduction décrites chez les myoblastes mutés pour le gène *LMNA* pourraient être liées aux altérations identifiées de la voie BMP4.

Une autre hypothèse habituellement proposée pour expliquer les mécanismes physiopathologiques responsables de la tissu-spécificité des atteintes décrites dans les laminopathies est celle d'une altération de l'expression de gènes. Selon cette hypothèse, l'expression de lamines mutées pourraient être à l'origine d'une altération de son interaction avec la chromatine et donc une altération de la distribution entre euchromatine et hétérochromatine. Ceci pourrait altérer l'expression de facteurs de transcription tissu-spécifiques ou de gènes tissu-spécifiques.

Ainsi, les altérations de l'expression de Bmp4 et de Smad6 identifiées dans notre étude pourraient être secondaires à l'altération de l'expression d'un facteur de transcription régulant leur synthèse. Un mécanisme propre a été décrit pour expliquer la dérégulation de la voie TGF β 1 avec l'incapacité de MAN1 à se lier à ses gènes cibles (cf. 5.4.3.5).

6 L'inhibiteur SMAD6, nouvelle cible thérapeutique ?

Le rôle principal de la voie BMP dans le maintien du pool de cellules souches musculaires adultes a été récemment démontré. Plus particulièrement, les auteurs ont pu montrer que la surexpression de SMAD6 est à même d'inhiber la croissance musculaire post-natale et la régénération musculaire liées à ces cellules satellites (387).

Ainsi, l'inactivation de l'expression de SMAD6 semble être une piste thérapeutique potentielle intéressante pour moduler la balance entre les voies de signalisation BMP4 et TGF β . Cette inactivation pourrait être à même de récupérer une prolifération cellulaire et une différenciation musculaire normale, d'empêcher l'épuisement du réservoir de cellules satellites, d'empêcher l'atrophie musculaire observée et donc de plus largement améliorer le phénotype observé dans les laminopathies musculaires telles que la dystrophie musculaire d'Emery-Dreifuss.

7 Conclusion générale

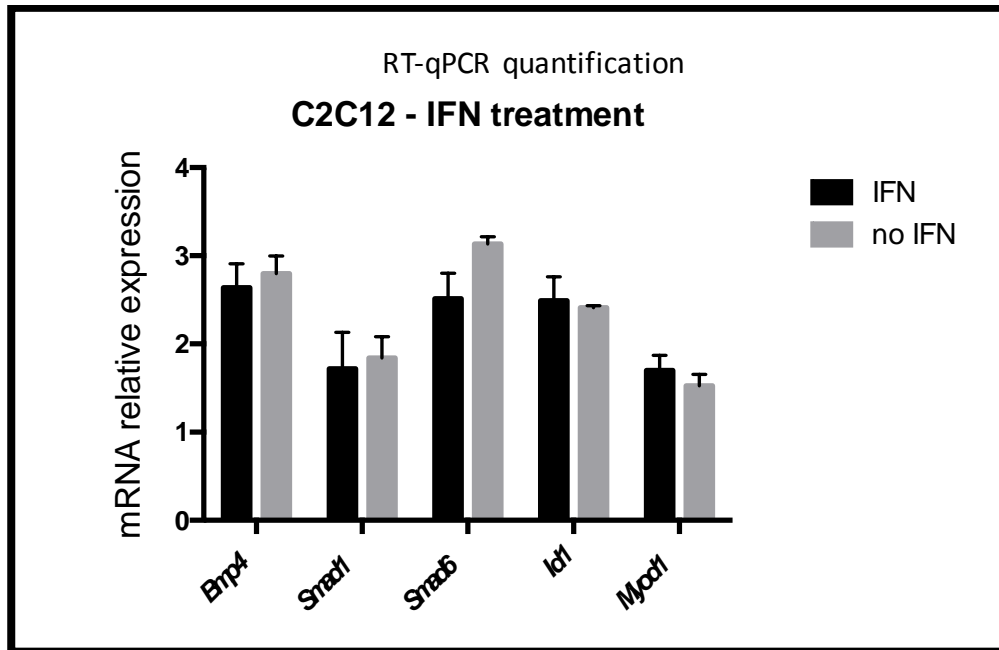
Pris dans leur globalité, ces résultats proposent un nouveau mécanisme physiopathologique permettant d'expliquer en partie les défauts musculaires squelettiques et les altérations du fonctionnement de la cellule souche musculaire dans le contexte des laminopathies musculaires.

Cette étude participe également à la compréhension précise et à la dissection des mécanismes physiopathologiques à l'origine des laminopathies. Ces avancées permettent ainsi de mieux appréhender les différences d'atteintes tissulaires qui caractérisent les laminopathies mais également de mieux appréhender les différences d'expressivité selon lesquelles une même variation pathogène peut induire des phénotypes différents et/ou des sévérités différentes. Ainsi, ces découvertes sont des premières pistes pour la mise en place d'un traitement et une médecine personnalisés aux patients puisque deux patients porteurs de la même variation pathogène et avec le même phénotype peuvent ne pas présenter les mêmes altérations cellulaires et ne devront pas être traités de la même façon.

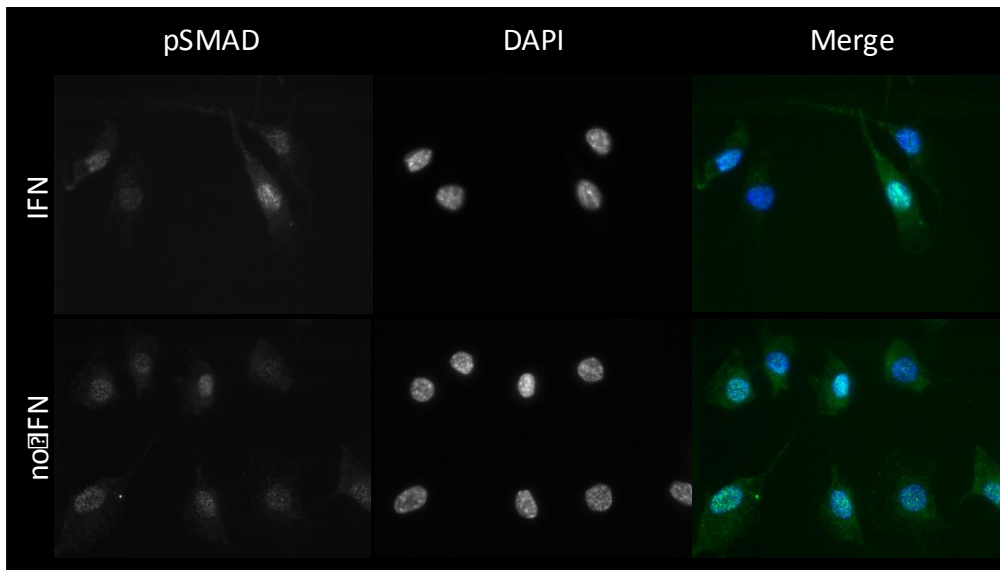
TABLE DES ANNEXES

Annexe 1. Quantification en RT-PCR quantitative des niveaux d'expression de gènes d'intérêt dans des C2C12 traitées ou non par interféron.....	144
Annexe 2. Localisation des formes phosphorylées des Smads 1, 5 et 8 (pSMAD) dans des C2C12 traitées ou non par interféron.....	144
Annexe 3. Localisation de Smad6 dans des C2C12 traitées ou non par interféron.	145
Annexe 4. Caractéristiques des patients et du contrôle testés.....	146
Annexe 5. Poster présenté au congrès commun de la SFBD et de la SBCF, Lyon, Avril 2017	147
Annexe 6. Revue de la littérature publiée dans <i>Orphanet Journal of Rare Diseases</i>	148
Annexe 7. Revue de la littérature publiée dans <i>Frontiers in Physiology</i>	164

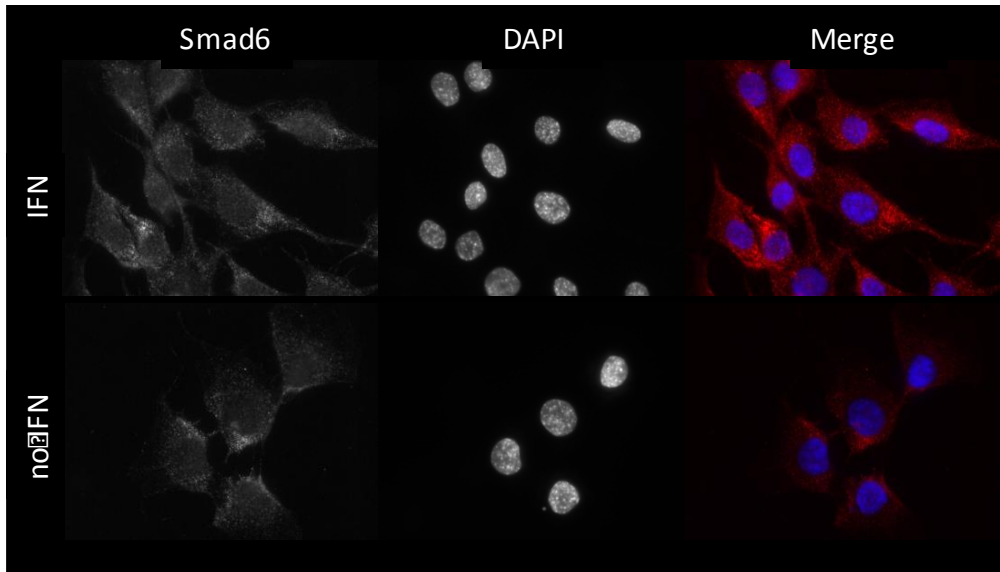
ANNEXES



Annexe 1. Quantification en RT-PCR quantitative des niveaux d'expression de gènes d'intérêt dans des C2C12 traitées ou non par interféron.



Annexe 2. Localisation des formes phosphorylées des Smads 1, 5 et 8 (pSMAD) dans des C2C12 traitées ou non par interféron.



Annexe 3. Localisation de Smad6 dans des C2C12 traitées ou non par interféron.

Sexe	Variant pathogène LMNA	Symptômes au diagnostic	au	Activité sérique maximale de la CK	Phénotype musculaire	Âge à la biopsie
1	M	p.Lys32del (p.ΔK32)	Anomalies de la marche à 14 mois	4N	Faiblesse musculaire diffuse, Rétractions au niveau des membres supérieurs et inférieurs et au niveau spinal	13 ans
2	F	p.Lys32del (p.ΔK32)	Hypotonie axiale, retard moteur à 11 mois	4N	Faiblesse musculaire axiale et proximale, Rétractions au niveau des hanches, des chevilles et des épaules	5 ans
3	M	p.Leu380Ser (p.L380S)	Diminution des mouvements fœtaux, hypotonie, Pieds bots dès la naissance	4N	Faiblesse musculaire axiale et proximale, Rétractions au niveau du membre inférieur (hanches, chevilles et genoux)	12 ans
4	M	p.His222Pro (p.H222P)	Flexion des épaules, Rétractions spinales, de la naissance à 6 ans	Non testé	Faiblesse musculaire axiale et proximale, Rétractions des chevilles et des épaules	?
5	M	p.Gln310X (p.Q310*)	Douleurs musculaires diffuses, fatigue chronique, difficultés à la marche à 38 ans	2X	L'ENMG est en faveur d'une atteinte myopathique	41 ans
6	M	Contrôle	-	-	-	45 ans

Annexe 4. Caractéristiques des patients et du contrôle testés.

Altered BMP4 pathway leads to *Lmna*^{-/-} myoblasts premature differentiation

Alexandre Janin^{1,2,3}, Delphine Bauer¹, Francesca Ratti¹, Camille Valla¹, Emilie Chopin¹, Nathalie Streichenberger^{1,2}, Alexandre Méjat¹

1. Nuclear Architecture Team, Institut NeuroMyoGène, CNRS UMR 5310, INSERM U1217, UCBL
2. University of Lyon, University Claude Bernard Lyon 1
3. Laboratoire de Cardiogénétique moléculaire, Centre de Biologie et Pathologie Est, Hospices Civils de Lyon

Abstract

BACKGROUND: Mutations in *LMNA*, encoding for Lamin A and C, two components of the nuclear lamina, have been associated with Emery-Dreifuss Muscular Dystrophy (EDMD). However, the pathophysiological mechanism affecting muscle differentiation is currently partially unknown.

RESULTS: We compared gene expression profiles in wild-type and *Lmna*^{-/-} H-2K myoblasts (MB) and identified that the BMP pathway was altered in mutant cells. We confirmed that Bmp4 expression is abolished in *Lmna*^{-/-} H-2K MB compared to wild-type whereas its receptors expression was not affected. At the contrary, the inhibitory Smad, Smad 6, was found to be overexpressed leading to the sequestration of phosphorylated Smad1/5/8 in the cell cytoplasm and to a reduced expression of the Smad target genes *Id1* and *Id2*. *Id* downregulation promoted MyoD-induced muscle differentiation and lead to a premature exhaustion of the mononucleated myoblasts.

CONCLUSION: Modulation of this pathway by recombinant Bmp4 treatment and/or Smad6 inactivation by siRNA was able to reverse the precocious differentiation phenotype suggesting a potential therapeutical target for EDMD.

BMP4 Pathway

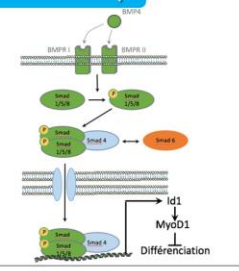


Figure 1. Bioinformatic Analysis

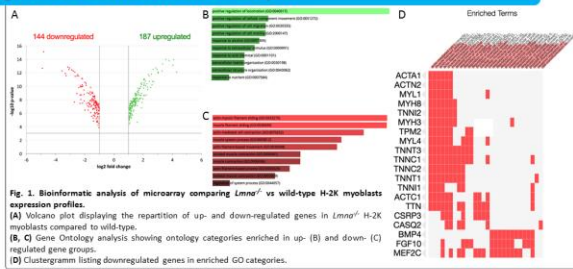


Figure 2. Bmp4 expression is downregulated but not BmpR expression

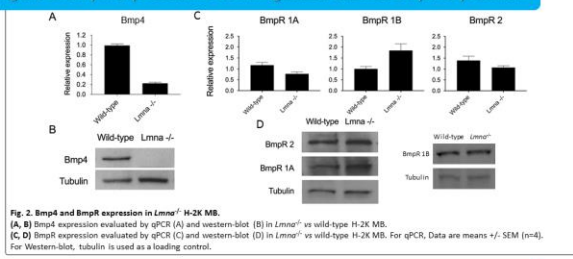


Figure 3. Smad6 overexpression leads to P-SMAD cytoplasmic sequestration

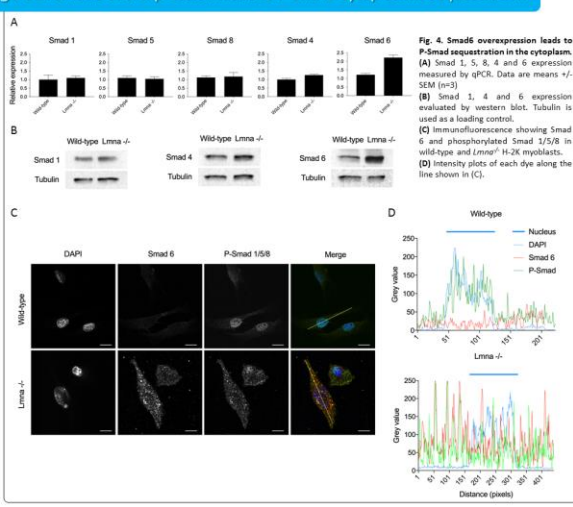


Figure 4. *Lmna*^{-/-} H-2K myoblasts differentiate precociously

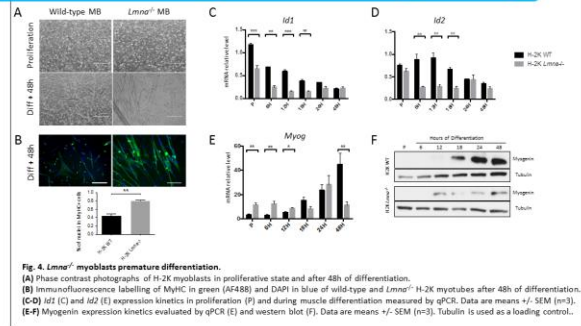


Figure 5. Bmp4 pathway modulation is able to rescue the premature differentiation phenotype in *Lmna*^{-/-} H-2K myoblasts.

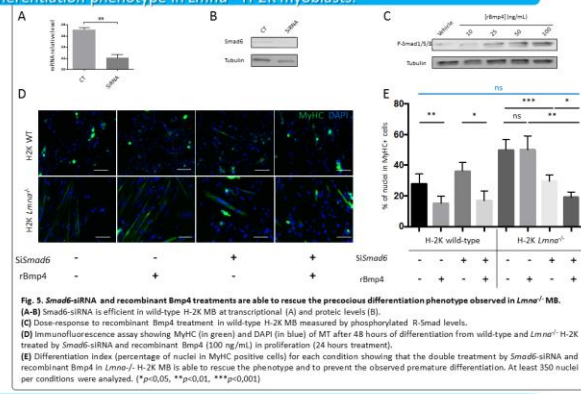
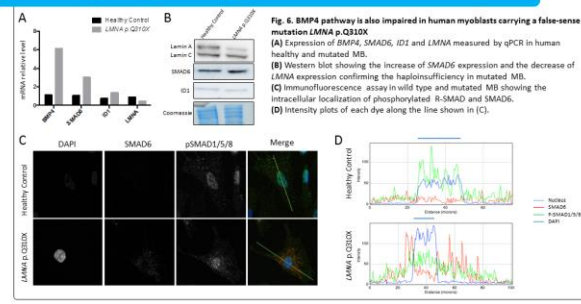


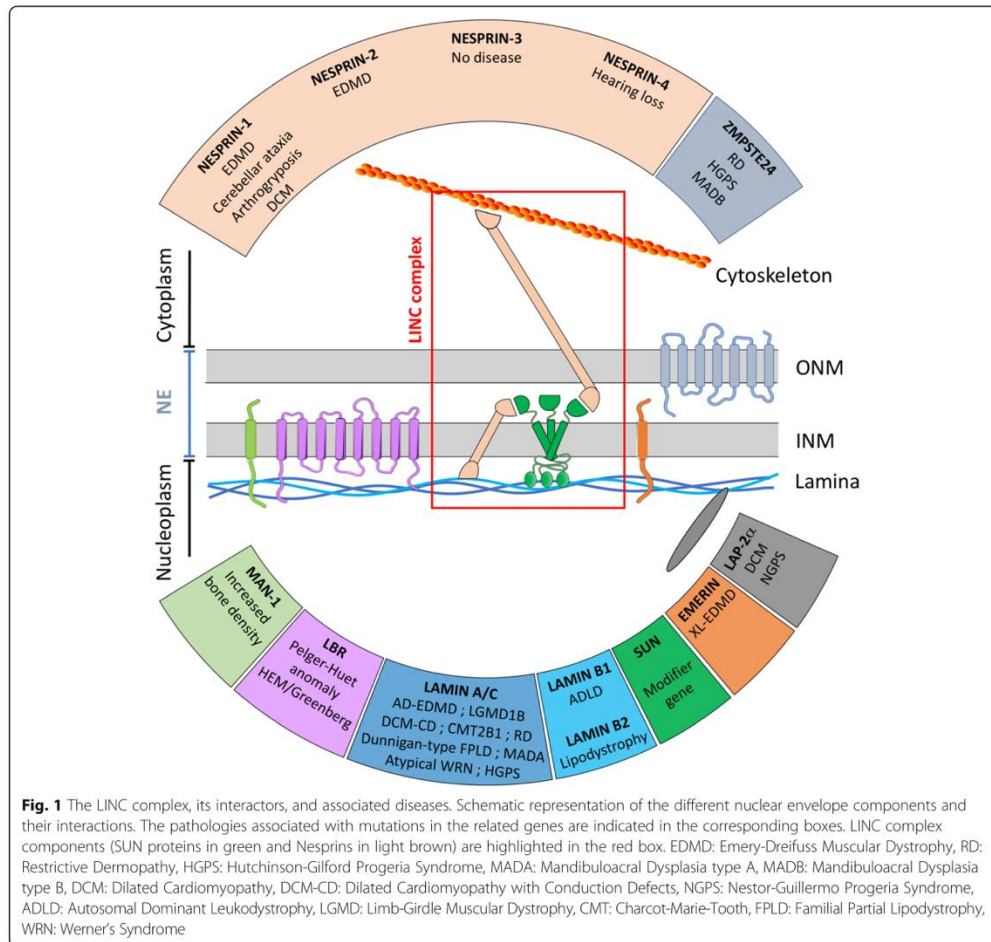
Figure 6. BMP4 pathway is also impaired in *LMNA* mutated human myoblasts



Annexe 5. Poster présenté au congrès commun de la SFBF et de la SBCF, Lyon, Avril 2017

Annexe 6. Revue de la littérature publiée dans *Orphanet Journal of Rare Diseases*.

Orphanet J Rare Dis. 2017 Aug 30;12(1):147. doi: 10.1186/s13023-017-0698-x



to mechano-transduction and/or aberrant signaling events [6–9]. Nowadays, several non-exclusive pathophysiological mechanisms have been proposed, none of them completely explaining the observed defects in patients.

The growing number of proteins identified as interacting with the LINC complex and the diversity of associated diseases are currently a challenge in terms of genetic and clinical diagnosis as several clinically-unrelated diseases could be due to mutations in a common gene, and, conversely, mutations in several genes encoding different components of the nuclear envelope could lead to the same cellular defect and pathology. The situation got even worse with the recent discovery of mutations, or variants, in the gene encoding for LINC component SUN, which were not directly responsible

for a disease but, combined to a mutation in a gene encoding for another LINC component, could determine its level of severity.

The aim of this review is to exhaustively summarize our current knowledge of the numerous proteins composing LINC complexes, their interactors and their implication in rare human pathologies.

Definition of the LINC complex and its interactors

The nuclear envelope is a double membrane isolating the genetic material and separating the inside of the nucleus from the cytoplasm. These two membranes include transmembrane proteins providing a structural support to the nucleus and a physical coupling between the cytoskeleton and the nucleoskeleton. This complex, called

the LINC (Linker of the Nucleoskeleton to the Cytoskeleton) complex, is composed of proteins of the outer and the inner nuclear membrane that constitute the core of the LINC complex: KASH (Klarsicht, Anc-A and Syne Homology) and SUN (Sad1 and UNC-84) homology domain proteins [10]. SUN proteins are inner nuclear membrane proteins which interact with nuclear pore complex proteins and lamins via their N terminal domain. Their C-terminal SUN domain is located in the perinuclear space and mediates the interaction with the C-terminal KASH domain of nesprins located in the outer nuclear envelope [11–13] (Fig. 1).

In the following paragraphs, mutations first affecting genes encoding for components of the inner nuclear membrane, then composing the nuclear lamina and finally participating to the outer nuclear membrane will be further developed.

Inner nuclear membrane (INM) proteins and inherited diseases

Mutations in the EMD gene

Emery-Dreifuss Muscular Dystrophy (EDMD) is usually described by a triad of three main symptoms. First, early contractures of the elbows flexors, Achilles tendons, and post-cervical muscles lead to rigidity of spine. These symptoms mostly appear during the early adolescence. Then, slowly progressive muscle wasting and weakness (humero-peroneal in the early stages and then more diffuse impairments) and, finally, cardiac disease with conduction defects and arrhythmias will occur [14].

The diagnosis of EDMD is based on clinical findings. Some non-specific biological parameters could orient the diagnosis, such as moderate elevation of Creatine-Kinase (CK) levels in serum or plasma (from 2 to 20 times the upper normal limit), indicating a muscular cell lysis process but, most often, serum CK concentration is normal [15]. The histological examination of muscular sections is another tool: the muscle histopathology usually does not find any specific myopathic or dystrophic disruptions such as variation in muscle fiber size, fibrosis, or necrosis. The most common observed sign is variation in fiber size and increase in internal nuclei. Electron microscopy finds alterations in nuclear architecture: hypercondensed chromatin, nuclear fragmentation or invaginations, intranuclear filaments. Immunodetections of emerin by immunofluorescence or western blot in tissues could also be informative [15]. However, muscular biopsy is rarely performed as it is invasive for the patient and not necessary in case of typical signs. Due to the risk of sudden death [15], it is essential to establish the extent of disease immediately following the initial diagnosis. A cardiac evaluation (ECG, echocardiography, and cardiac Magnetic Resonance Imaging or MRI), a spirometric examination, and the evaluation of the presence of other

cardiac risk factors (such as endocrinological abnormalities) are highly recommended [15, 16].

Nevertheless, molecular genetic testing is the main approach to diagnose EDMD confronted with clinical features. Mutations in one gene, *EMD*, are known, since 1994, to be responsible for X-Linked EDMD (also called XL-EDMD or EDMD1). This form has great clinical and genetic heterogeneity. The cardiac symptoms are usually limited to arrhythmias and dilated cardiomyopathies are extremely rare [17] (Fig. 4a). Its prevalence was initially reported in 2002 to range from 1/300,000 to 1/100,000 [18] but, refined in 2009, and estimated between 0.13/100,000 and 0.2/100,000 [19].

This gene encodes for emerin which is located in the inner nuclear membrane and interacts with nuclear lamins. Emerin, which is ubiquitously expressed, is involved in the regulation of gene expression, cell signaling, and nuclear architecture [20]. It is a member of the LEM-domain protein family, that includes LAP2 β (Lamin Associated Protein) and MAN1, and which can bind to Barrier-to-Autointegration Factor (BAF). The LEM-domain of emerin, located in the N-terminal part of protein, can adopt a helix-loop-helix fold crucial for its binding to BAF, which is an essential protein involved in post-mitotic nuclear assembly, cell viability, and cell cycle progression. BAF also plays a central role in nuclear envelope reformation during mitosis [21–23]. Interestingly, emerin has also been found to be located at the outer nuclear membrane and peripheral Endoplasmic Reticulum (ER) with a direct interaction with the centrosome and microtubules [24]. Based on this additional role of emerin, one can expect *EMD* mutations to be found in other diseases related to centrosome.

Approximately 60% of EDMD cases seem to be caused by mutations in *EMD* [2]. Most are null mutations, which result in complete absence of emerin expression in nuclei. Furthermore, *FHL1*, the gene encoding for Four and a half LIM domains 1 (FHL1) proteins was discovered. In all tested mutated patients, the *FHL1* mutations were associated with severe reduction of FHL1 proteins and severe delay in myotube formation. Mutations in *FHL1* gene are responsible for about 10% of XL-EDMD [25]. EDMD-like syndrome can also be caused by rare mutations in several other genes, including *SYNE1* and *SYNE2* or *TMEM43* [26].

In the X-linked form of EDMD, female carriers are usually asymptomatic and unaffected. However, some rare cases of cardiac involvement in female carriers of *EMD* mutations have been described, in connection with unequal X-inactivation [27]. Very recently, a symptomatic female carrier of *EMD* mutation has been identified. This patient carries a heterozygous deletion (c.174_175delTT) that leads to a frameshift and the expression of a truncated protein. A mixed

population of myoblasts, either emerin-positive or emerin-negative, was shown with a proliferative advantage for emerin-negative cells and a spontaneous differentiation phenotype for emerin-positive cells. The patient suffered from muscle weaknesses, myalgia, palpitations, and cardiac extrasystoles. These symptoms appeared between the late childhood and the early adulthood (from 12 to 23 years of age [28]).

Unfortunately, to date no curative treatment for EDMD is available. Only symptomatic treatments are available. They are based on orthopedic surgeries to limit contractures and scoliosis, the use of aids (walkers, wheelchairs) to preserve ambulation, and the management of cardiac features based on medication, pacemakers, and implantable cardioverter defibrillators (ICD). At the final stage of heart failure, heart transplantation can be a therapy to be considered (according to the benefit-risk balance).

Mutations in the *MAN1* gene (also called *LEMD3*)

Bone formation is affected in several LINC complex diseases. Increased bone density is the common symptom of osteopoikilosis, melorheostosis, and Buschke-Ollendorf Syndrome (BOS). BOS is a rare autosomal dominant disorder caused by *LEMD3* loss-of-function, also known as dermatofibrosis lenticularis disseminate, and it is characterized by connective tissue nevi and osteopoikilosis. Its incidence is about 1/20,000 and the sex ratio is close to 1 [29].

This syndrome was initially described by Buschke and Ollendorf in 1928 [30]. The clinical features of BOS are inconstant with a great variability inside the same family: skin and skeletal symptoms may arise independently in affected family members. Osteopoikilosis, characterized by “spotted bones” (rounded or ovoid opacities on radiographic examination) is the consequence of osteosclerotic trabeculae. The dermatological manifestations can be divided in two different types: typical dermatofibrosis lenticularis disseminate (flesh-colored papules with symmetric distribution), or a “cobblestone” effect, made by the coalescence of papules. Melorheostosis is characterized by a floxing (rheos) hyperostosis of the cortex of trabecular bones. The association of skin lesions, even atypical, and a spotted bone pattern on the X-rays may lead to a genetic screening of the *LEMD3* gene (Fig. 4a) [31, 32].

MAN1, an integral protein of the inner nuclear membrane, influences transforming growth factor- β (TGF- β) signaling by directly interacting with R-Smads. Heterozygous *MAN1* loss-of-function mutations increase the level of TGF- β signaling in cells [33]. The bone sclerosis and overgrowth of connective tissue could be explained by enhanced cytokines signaling caused by partial loss of *MAN1* from the INM [34, 35].

Mutations in the *LBR* gene

The lamin B receptor (*LBR*) is an integral protein of the INM composed of several different domains. The N-terminal tail, which has a nucleoplasmic localization, can bind to B-type lamins, heterochromatin proteins, and DNA. This receptor has a hydrophobic domain, composed of several transmembrane segments with structural similarities to sterol reductases.

Homozygous mutations of the *LBR* gene lead to hydrops-ectopic calcification or Greenberg skeletal dysplasia, which is associated with lack of 3-beta-hydroxysterol delta-14 reductase activity. Thus, an abnormal sterol metabolite could be found in serum of patients suffering from Greenberg dysplasia: the cholesta-8,14-dien-3 β -ol, signing for a sterol metabolism defect. Consequently, two hypotheses on pathogenic mechanisms have been proposed: either the disease is caused by metabolic defects, or the initial problem is an alteration in the nuclear structure leading to modifications in gene expression. A very recent study based on CRISPR-Cas9 technology showed that *LBR* point mutations are associated with a reduced sterol C14 reductase activity due and a lower affinity of *LBR* for NADPH (Fig. 4a) [36].

Greenberg dysplasia is also called Hydrops, Ectopic calcification and Moth-eaten (HEM) skeletal dysplasia, which relates to the three main clinical features of the disease [37]. It begins during the second or third trimester of gestation, followed by fetal hydrops and death [37].

In a recent clinical report, a 15-year-old boy with an anadysplasia-like spondylometaphyseal dysplasia was described. This very mild skeletal dysplasia was caused by a double heterozygous mutation in the *LBR* gene [38]. This syndrome is characterized by anadysplasia-like features associated with spontaneous regression of associated radiographic skeletal abnormalities. However, a persistent, disproportionate and mild small stature was observed [38].

In contrast, most heterozygous mutations in *LBR* give a benign morphological granulocyte anomaly. This abnormality is visible in optical microscopy and leads to hyposegmentation and abnormal chromatin organization in nuclei, so called “Pelger-Huët anomaly”. However, *LBR* mutations that abolish sterol reductase activity could cause Greenberg skeletal dysplasia without Pelger-Huët anomaly [39]. A particular heterozygous missense mutation (p.Arg372Cys) has been reported to be associated with Reynolds syndrome. This autoimmune disorder is characterized by primary biliary cirrhosis, cutaneous systemic sclerosis but no Pelger-Huët anomaly [34].

These findings suggest that lamin B receptor has different domains supporting different functions of varying degrees of significance in different tissues [34]. Consequently,

LBR mutations are involved in a large panel of diseases with a phenotypic heterogeneity of bone dysplasia caused by *LBR* mutations.

Mutations in SUN genes

Five SUN proteins have been described in mammals: SUN1 and 2 are widely expressed, whereas SUN3, 4, and 5 are restricted to the testis [40].

Recent studies have suggested that *SUN1* and *SUN2*, genes that encode for SUN proteins, could be considered as modifier genes of a pre-existing disease [41]. It has been shown that mutations found only in *SUN* genes are not disease relevant [42, 43]. According to Meinke et al., *SUN* gene variants were identified in members of four families carrying *LMNA* or *EMD* mutations. Relatives who carry both mutations, a mutation in *SUN1* or *SUN2* associated with a mutation in *LMNA* or *EMD*, had a more severe disease than relatives who did not have a mutation in *SUN* genes. The presence of *SUN* variants could be an explanation to the great clinical heterogeneity of EDMD between relatives of the same family [42] (Fig. 4a).

In a study published by Chen et al., it was shown that the overexpression of *SUN1* gene is a critical pathogenic feature, observed in *Lmna*^{-/-} and *Lmna*^{Δ9-11} mice, and common to patients who suffer from Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome (HGPS). Removal of *SUN1* gene in *Lmna*^{-/-} and *Lmna*^{Δ9-11} mice rescues their pathological phenotype and delays their premature death. At the cellular level, SUN1 proteins were mislocalized and accumulated in the Golgi apparatus, but it remains unclear if the accumulation of SUN1 in this organelle is responsible for a higher cell toxicity [44].

Mutations in *SUN1* or *SUN2* could affect the nuclear coupling to the cytoskeletal filament network [45]. These mutations could be responsible for abnormalities in nuclear movement and positioning in the cell. It was thought that mutations in SUN proteins cause abnormalities in nuclear-myotubule connection and prevent a correct myonuclei positioning. It has been admitted that nuclear dysmorphology is a feature that could be found in cells related to patients suffering from laminopathies. The consequences of this characteristic remain unclear [42].

In this first part, diseases caused by mutations in genes encoding for proteins of the inner nuclear membrane have been introduced. In the next sections of this review, diseases caused by mutations in genes coding for proteins which interact with this core will be developed: first, diseases caused by abnormalities of the nuclear lamina, located inside the nucleus, and then diseases caused by mutated proteins that are part of the outer nuclear membrane.

Diseases caused by mutations affecting proteins of the nuclear lamina

Mutations in the LMNA gene

Mutations in *LMNA*, coding for lamin A and C, are the cause of approximately a dozen inherited diseases, collectively called "laminopathies", that were initially defined based on clinical signs and symptoms. Most are transmitted by dominant inheritance.

The laminopathies group includes: Autosomal Dominant form of EDMD (AD-EDMD or EDMD2), Autosomal Recessive form of EDMD (EDMD3), Dilated CardioMyopathy with Conduction Defect disease (DCM-CD), Congenital Muscular Dystrophy (L-CMD), Limb-Girdle Muscular Dystrophy 1B (LGMD1B), Dunningan-type Familial Partial Lipodystrophy (FPLD), atypical Werner syndrome, Charcot-Marie-Tooth syndrome 2B1 (CMT2B1), and Hutchinson-Gilford progeria syndrome (HGPS). Although highly variable, muscle defects are a frequently observed common clinical feature in these diseases. (Fig. 4b).

Muscle laminopathies such as EDMD2, DCM-CD, and LGMD1B, are characterized by joint contractures, primarily affecting the elbows, ankles and neck, progressive muscle weakness and wasting. The life-threatening symptom is cardiac conduction defects with dilated cardiomyopathy. These three diseases can be considered as a spectrum of the same pathology because clinical features overlap each other (Table 1) [46]. L-CMD due to *LMNA* mutations, associated with heart involvement and "heart-hand syndrome", indicates that cardiomyopathy and congenital limb abnormalities are associated [47, 48].

FPLD is an autosomal dominant disease characterized by the loss of adipose tissue at the extremities, occurring at puberty. This disease has metabolic consequences such as insulin resistance, *diabetes mellitus*, hypertriglyceridaemia, and hepatic steatosis. Approximately 90% of *LMNA* mutations in FPLD are missense mutations in exon 8 of *LMNA* gene, causing an amino-acid substitution and leading to a modification of the surface charge of immunoglobulin-like fold domain of the C-terminal tail of lamins [49, 50]. This Single Nucleotide Variation (SNV) leads to an inhibition of adipogenic differentiation due to the deregulation of Sterol Response Element Binding Protein 1 (SREBP1), a crucial transcription factor for lipid metabolism and adipocyte differentiation [51].

CMT disease is the most common cause of inherited peripheral neuropathies with an estimated frequency of 1:2500. Electroneuromyographic examination distinguishes a myelinic form (CMT1) and an axonal form (CMT2) of the disease. Significant genetic heterogeneity is found in CMT, with 15 genes or loci for CMT2. CMT2B1 is an axonal form (CMT2) of the disease characterized by an autosomal recessive mode of inheritance and is a sensory neuropathy characterized by progressive

Table 1 Clinical comparison of muscular phenotypes caused by LMNA mutations. Emery-Dreifuss Muscular Dystrophy (EDMD), Congenital Muscular Dystrophy (L-CMD), Limb-Girdle Muscular Dystrophy 1B (LGMD1B). Adapted from Helbling-Leclerc et al. [18] and Maggi et al. [113]

Age of onset	EDMD-2 2nd to 3rd decade	LGMD1B 3rd to 4th decade	L-CMD Congenital onset
Weakness	Scapulo-humero-peroneal distribution	Girdles: Pelvic and scapular, symmetrical	Axial or severe and diffuse
Contractures	Elbow +++	+	+ (spine, hips, knees and Achilles tendons)
Heart phenotype	Invariable with age, after skeletal muscle involvements Cardiac conduction defects +/- dilated cardiomyopathy	Invariable with age	Cardiac conduction abnormalities
Respiratory abnormalities	Rare	Rare	Very frequent
Loss of independent walking	Late but rare	Late but rare	Very frequent
Axial involvement	Frequent	Rare	Frequent
Scoliosis	Frequent	Rare	Frequent
Rigid Spine	Frequent	Rare	Frequent
Dysphagia	Very rare	Very rare	Very rare
Facial weakness	Rare	Very rare	Rare

muscular and sensory loss in the distal extremities with chronic distal weakness. CMT2B1 is associated with a homozygous amino-acid substitution (p.Arg298Cys) in the primary structure of the rod domain of lamin A and C. This substitution has only been found in affected families from a limited region of North Western Africa [52–55].

The last group of laminopathies implicates defects in multiple organs mimicking accelerated ageing [47] such as HGPS. Affected children appear normal at birth. During the first year of life, the symptoms of accelerated ageing occur: failure to thrive, delayed dentition, alopecia and sclerodermatous skin changes. Death occurs on average at age 13. The main death cause (90% of patients) is progressive atherosclerosis of the coronary and cerebrovascular arteries [56]. The main pathophysiological mechanism underlying progeria is an abnormal splicing of the *LMNA* primary transcript. Most HGPS patients carry a de novo point mutation within exon 11 of the *LMNA* gene (c.1824C > T, p.Gly608Gly). This mutation activates a cryptic splice site. This altered splicing leads to the deletion of 50 amino acids at C-terminal domain and to the accumulation of a truncated form of lamin A precursors, called progerin [57]. Recently, an atypical aggressive neonatal form of HGPS without progerin accumulation has been reported. The molecular exploration found an association of two de novo heterozygous point mutations in *LMNA*: c.163G > A, p.E55K and c.164A > G, p.E55G [58].

To date, several other rare inherited human diseases have been linked to *LMNA* mutations, such as an autosomal dominant form of lipoatrophy associated with diabetes, liver steatosis, dermatologic features (leukome-lanodermic papules) and hypertrophic cardiomyopathy [59], A-type MandibuloAcral Dysplasia (MAD-A) [60, 61], atypical Werner's syndrome [62, 63], a lethal form of restrictive dermopathy [64], and acrogeria syndrome [65]. Overlapping phenotypes between all these diseases have also been described, suggesting a clinical continuum between these clinical entities [66].

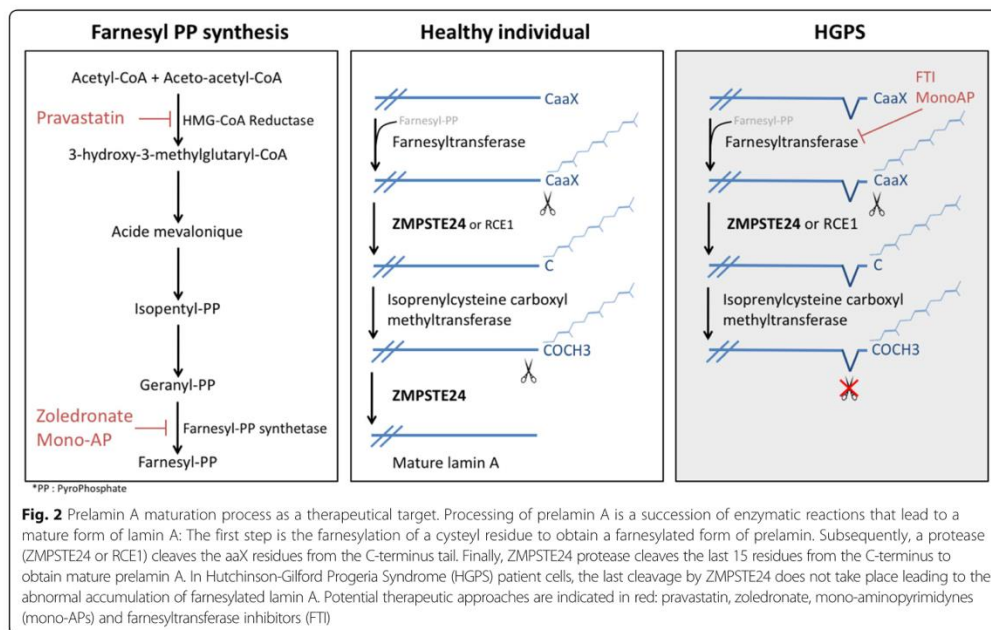
Despite the ubiquitous expression of lamins, most laminopathies involve highly tissue-specific phenotypes, often affecting skeletal and cardiac muscle. However, the mechanism of tissue-specificity remains unknown. Four hypotheses could be formulated. The first one, often called "structural hypothesis", is based on the loss of structural functions of lamins A/C. Therefore, cells are more susceptible to suffer from mechanical damage. The second one proposes that lamins A/C interact with tissue-specific transcriptional regulators [67]. A third hypothesis proposes that *LMNA* mutation could cause impairments in muscle stem cell function. This hypothesis is based on the fact that, with the exception of peripheral neuropathy, which involves a cell type derived from ectoderm, the others primarily affect tissues are all of mesenchymal origin [68]. More recently, a last hypothesis has emerged based on the role of A-type lamins in RNA export through nuclear envelope budding. The accelerated aging linked with lamin C mutation in

Drosophila, modeling *LMNA* mutations causing progeroid syndromes in humans, has been shown to be associated with RNA export defects causing loss of mitochondrial integrity [69].

Genetically, conversely to *EMD* mutations in XL-EDMD, *LMNA* mutations are mostly missense, causing amino-acid substitutions. Many other types of mutations are described: RNA splicing abnormalities, in-frame deletions, or haploinsufficiency caused by early chain termination. They are scattered all along the full length of the gene (except for HGPS). Nowadays, no clear correlation between genotypes and phenotypes has been established.

To date, no curative treatment for laminopathies is available. Since the discovery of the molecular mechanisms underlying HGPS, different drugs have been thought to be helpful, based on their ability to interfere with the prenylation process of prelamin A. First, in 2005, the efficiency of FarnesylTransferase Inhibitors (FTI), such as lonafarnib, was assessed as a potential therapeutic treatment for HGPS with the hypothesis that the inhibition of progerin farnesylation would improve the nuclear phenotype by restoring a proper localization of lamin A [70]. Lonafarnib is currently in phase II trial for progeria [71]. The association of pravastatin, a statin that inhibits HMG-CoA reductase, with zoledronate, an aminobisphosphonate that inhibits farnesyl pyrophosphate

synthase (FPPS), is another potential therapeutic approach. This combination inhibits both farnesylation and geranylation of progerin and prelamin A. This combined approach, so called ZoPra, is associated with an improvement of the aging-like phenotypes of *Zmpste24*^{-/-} mice recapitulating HGPS phenotypes such as growth retardation, loss of weight, lipodystrophy, hair loss, and bone defects [72] (Fig. 2). In 2013, a new type of FPPS inhibitor (N6-isopentenyladenosine) was discovered which improves nuclear shape abnormalities in fibroblasts from progeroid patients [73]. Adopting a different approach, an in vivo administration of temsirolimus, a rapamycin analog, was shown to be able to prevent deterioration of cardiac function. The mechanism underlying this effect seems to be an improvement of the autophagy that is found to be impaired in the heart of mutated mice. Temsirolimus was further shown to be able to partially rescue the cellular phenotype associated with HGPS [74, 75]. MG132, a protease inhibitor, is also found to improve HGPS cellular phenotype by induction of progerin degradation by macroautophagy and splicing regulation. Intramuscular injection of MG132 in skeletal muscle of *Lmna*^{G609G/G609G} mice locally reduces progerin levels. Protease inhibitors is another promising therapeutic class to treat HGPS patients [76]. Interestingly, although the molecular mechanisms of FTI, ZoPra and rapamycin are different, it was shown that the association of these 3



approaches lacks an additive effect [77]. Recently, a drug screening approach on iPS cell lines derived from HGPS patients identified mono-aminopyrimidines (mono-APs) as a family of molecules capable to restore HGPS cellular phenotype. Mono-APs act at two different levels: they inhibit both farnesyl pyrophosphate synthase and farnesyl transferase [78]. The same way, a drug testing approach on HGPS patient fibroblasts led to the discovery of a small molecule, called by the authors “remodelin”, able to improve nuclear architecture in these cells. Using mass spectrometry, they found that remodelin is an inhibitor of N-acetyltransferase 10 (NAT10). NAT10 inhibition rescues nuclear shape organization by microtubule reorganization. The supposed advantage of a remodelin-based treatment is a low toxicity of this drug at the cellular level [79].

Finally, a proof-of concept of exon-skipping therapy for laminopathies has been established: antisense oligonucleotides removing exon 5 of lamin A have been efficiently used in Human cells. It was further shown that lamin A/C-Δ5 normally localizes in murine *Lmna*-null primary murine embryonic fibroblasts and rescues the abnormal nuclear shapes commonly associated with laminopathies [80].

Mutations in the LMNB1 and LMNB2 genes

Autosomal Dominant LeukoDystrophy (ADLD) is caused by a duplication of the *LMNB1* locus [81]. It is a rare genetic disorder, similar to chronic progressive multiple sclerosis, that leads to demyelination in the Central Nervous System (CNS). The age of onset is usually in the fourth or fifth decade of life, and it is slowly progressive and fatal. This syndrome is characterized by inconstant early autonomic abnormalities, pyramidal and cerebellar defects eventually associated with ataxia, cardiovascular, and skin defects. ADLD differs from multiple sclerosis as histological lesions display oligodendroglia preservation associated with subtotal demyelination and a decrease in astrogliosis. In addition, MRI finds diffuse subcortical white matter abnormalities [82] (Fig. 4b).

Although no dominant-acting missense or loss of function mutations have been identified in B-type lamins, ADLD is associated with tandem duplications spanning *LMNB1* gene on chromosome 5q. The size of the duplication varies between families. This duplication is correlated with increased *LMNB1* mRNA levels and 2-fold increased level of proteins in white blood cells from patients. Consequently, ADLD could be caused by an effect of *LMNB1* over-expression on the transcriptional regulation of myelinogenesis genes [83]. More recently, studies based on proteomic and transcriptome assays have shown that lamin B1 overexpression causes a downregulation of proteolipid protein linked to a reduced occupancy of Yin Yang 1 (YY1) transcription factor at the promotor region of its gene [84]. Moreover,

Lin ST et al. have shown that miR-23 is essential to regulate *LMNB1* expression and to have a normal oligodendroglia development [85]. Thus, a perspective field of study is to highlight the potential disappearance of the regulation mediated by miR-23 in affected families. Interestingly, an ADLD family without evidence of duplication or other mutation in *LMNB1* has been described. An array Comparative Genomic Hybridization (CGH) analysis led to identify a large (approximately 660 kb) heterozygous deletion 66 kb upstream of the *LMNB1* promoter. Lamin B1 overexpression was confirmed in a postmortem brain sample, showing that lamin B1 was increased in the frontal lobe. The deletion eliminates a genome topological domain boundary, allowing interactions between at least three forebrain-directed enhancers and the *LMNB1* promoter. This mechanism explains the cerebral localization of lamin B1 overexpression, myelin degeneration, and the ADLD phenotype [86].

Increased levels of lamin B1 have also been observed in lymphoblasts and fibroblasts from patients who suffer from ataxia telangiectasia (AT). AT is an autosomal recessive disorder characterized by cerebellar ataxia, telangiectasia, immune defects, and a predisposition to malignancy. As AT is caused by a mutation in the protein kinase ataxia telangiectasia mutated (ATM) that controls DNA damage response signaling, the link between AT and elevated levels of lamin B1 remains unsolved.

Conversely to the *LMNB1* gene, very few mutations in *LMNB2* have been associated with human diseases. The first reported heterozygous mutation of *LMNB2* gene is a case of acquired partial lipodystrophy, also called Barraquer-Simons syndrome [87]. More recently, the case of a consanguineous Palestinian Arab family showing an autosomal recessive progressive myoclonus epilepsy with early ataxia has been reported. This disease is a rare syndrome that could be associated with progressive antiepileptic drug resistance and cognitive decline. After linkage analysis and Sanger sequencing, a homozygous missense mutation (p.His157Tyr) in *LMNB2* gene segregating with the disease in this family was identified. The concerned amino-acid is located in a highly-conserved region of the protein (alpha-helical rod region). In vitro studies suggest that the mutation could affect the correct assembly of the protein. This mis-assembly could cause an abnormal neuronal migration that leads to the epilepsy and early ataxia syndrome (Fig. 4b) [88].

Mutations in the LAP2a and BANF1 genes

The lamina-associated polypeptide 2α (LAP2a) is a LEM (LAP2-Emerin-MAN1) domain protein. This domain is a structural motif of about 150 N-terminal amino-acids that binds to BAF. The latter is encoded by *BANF1*,

mediates the interaction with chromatin, and plays a central role in nuclear organization and nuclear envelope assembly. Unlike the other LAP2 isoforms, LAP2a is not anchored in the INM but is uniformly distributed in the nucleoplasm. The protein is composed of 3 main domains: the first binds to A-type lamins, the second is a chromosome association domain, and the third mediates binding to BAF. Thanks to these regions, LAP2a plays a major role in the regulation and stabilization of the lamin A/C nucleoplasmic pool [89].

In 2005, a *LAP2a* mutation associated with dilated cardiomyopathy (DCM) characterized by an autosomal-dominant mode of inheritance was described. The clinical features are very close to those found in DCM caused by *LMNA* mutations: age of onset between 20 and 30 years, decrease in left ventricular ejection fraction but no cardiac conduction abnormality was observed. The identified mutation is a heterozygous substitution (p.Arg690Cys) affecting a residue located in the C-terminal domain implicated in the binding to lamin A/C. Consequently, the LAP2a mutated protein shows a lower affinity for prelamin A. However, the precise pathophysiological mechanism that leads to DCM remains unclear (Fig. 4b) [90].

In 2011, a *BANFI* homozygous mutation (p.Ala12Thr) reported in 2 Spanish families, found by exome sequencing method, was described as the cause of a progeroid syndrome, with a phenotype extremely close to that of HGPS. The syndrome, called Nestor-Guillermo Progeria Syndrome (NGPS), partially phenocopies HGPS but with abnormal clinical features: tardive age of onset, taller patients, presence of eyebrows and eyelashes, absence or complete loss of scalp hair, a severe osteolysis and the absence of cardiovascular or metabolic defects. However, NGPS and HGPS patients share common symptoms: aged appearance, growth retardation, thin limbs, stiff joints, and loss of subcutaneous fat. Moreover, no mutation in *LMNA* or *ZMPSTE24* has been found. This mutation could affect the stability of the protein as no decrease in mRNA expression level was found. The *BANFI* mutation leads to an abnormal distribution of nuclear lamina components and leads to nuclear abnormalities. Finally, children who suffer from this syndrome do not have an increased risk of acute myocardial infarction, cerebrovascular accidents and *diabetes mellitus* [91, 92] (Fig. 4b).

Diseases caused by mutations affecting proteins of the outer nuclear membrane

Mutations in the *ZMPSTE24* gene

ZMPSTE24, also known as Farnesylated-protein Converting Enzyme 1 (FACE-1), is a zinc metalloprotease that plays a central role in the maturation of prelamin A to mature lamin A. Lamin A and B must go through a

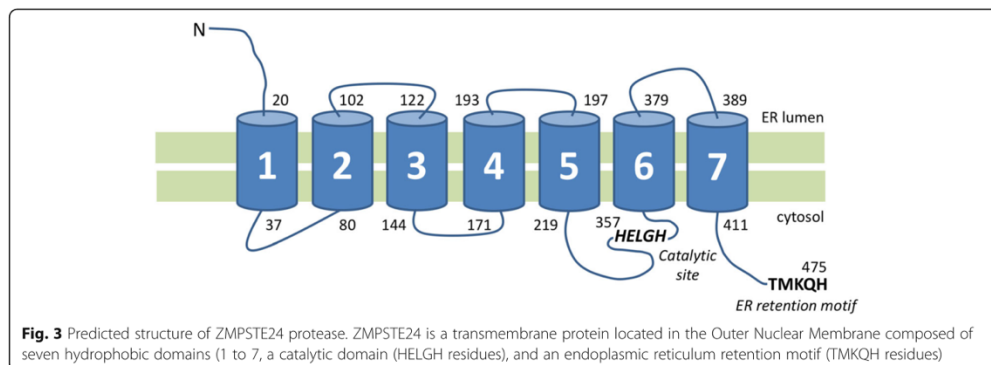
cascade of C-terminal post-translational modifications. The first step is a farnesylation, that is undertaken by a farnesyltransferase, of a cysteine included in a CAAX pattern (where A is an aliphatic residue and X stands for any residue). *ZMPSTE24* or RCE1 proteases will first cleave the AAX residues from the C-terminus of prelamin A, then the farnesylated cysteine will be carboxymethylated by an isoprenylcysteine carboxymethyltransferase. Subsequently, *ZMPSTE24* cleaves an additional 15 residues from the C terminus of prelamin A, leading to mature lamin A that does not retain the hydrophobic modifications [93–95]. B-type lamin will not undergo this final cleavage and will keep the modified tail (Fig. 2).

ZMPSTE24 is a membrane-associated enzyme with 7 transmembrane segments (Fig. 3) located in the ER membrane. As previously described for emerin, the localization of this protein is not clear and an additional localization at the inner nuclear membrane has been proposed. The enzyme contains a consensus zinc metalloprotease motif, located in the cell cytosol, that is a HEXXH catalytic site [95].

Homozygous mutations in the *ZMPSTE24* gene result in progeroid syndromes due to the accumulation of an farnesylated form of prelamin A (Fig. 4c).

Mandibuloacral dysplasia associated with B-type lipodystrophy or MAD-B (also known as “atypical HGPS”) is the less severe form of diseases caused by *ZMPSTE24* mutations. Clinically, the main features are skeletal abnormalities including hypoplasia of the mandible and clavicles, acro-osteolysis of distal phalanges, cutaneous atrophy, and lipodystrophy. In typical MAD-B, lipodystrophy is generalized. The age of onset is usually during the first year, the median age of death is approximately 30 years (Fig. 4c).

The lethal neonatal Restrictive Dermopathy (RD) is the most severe pathology caused by *ZMPSTE24* mutations, which is a rare and extremely severe congenital genodermatosis (inherited genetic skin condition). The first symptom consists of intrauterine growth retardation, associated with fetal hypokinesia deformation sequence (characterized by a reduction of fetal movements). The main clinical feature is a tight and rigid skin: rare or absent eyelashes, erosion at flexure sites, hyperkeratosis, microstomia (reduction in the size of the oral aperture) characterized by a particular position in letter ‘O’, and a small and pinched nose. It is associated with prominent superficial vessels, bone mineralization defects, dysplastic clavicles, arthrogyposis (congenital joint contractures) and pulmonary insufficiency that is usually the cause of early neonatal death [96]. According to recent studies, the typical RD phenotype seems to be due to *ZMPSTE24* null mutations and complete loss-of-function whereas less severe phenotypes could be associated with *ZMPSTE24* haploinsufficiency or *LMNA*



mutations (often called “RD-like phenotypes”) (Fig. 4c) [97, 98].

More recently, the phenotype of a patient carrying a heterozygous point mutation in *ZMPSTE24* gene has been reported. The patient suffers from a severe metabolic syndrome (partial lipodystrophy, hypertriglyceridemia, early onset type 2 diabetes mellitus, android obesity without subcutaneous lipoatrophy) associated with dilated cardiomyopathy, acanthosis nigricans, liver steatosis [99]. Unfortunately, no segregation study could be performed and the link between the phenotype and the mutation remains unsure.

Mutations concern mostly a stretch of thymines in exon 9 of *ZMPSTE24*: the hotspot is c.1085dupT or p.Leu362Phefs*19. This mutation leads to a frameshift. The consequence is the lack of the last transmembrane domain and the ER retention signal. Ultimately, this duplication leads to the complete loss of ZMPSTE24 enzymatic activity due to the complete absence of protein, confirmed by Western blot analysis. According to a recent study, this mutation has been found in 59.1% of all others mutations in *ZMPSTE24* associated with the RD phenotype, and in 18.8% associated with MAD-B or overlapping HGPS/MAD syndrome [97].

All mutations found by molecular testing in patients with RD or MAD-B are homozygous or compound heterozygous. Thus, correlated with the recessive inheritance of the disease, heterozygous mutations found in patients’ relatives are apparently not deleterious. Always according to the same recent study published by Navarro et al., all mutations associated with the RD phenotype have been shown to be null mutations, such as the common c.1085dupT mutation. Practically, all types of null mutations could be found: nonsense mutations, insertions and deletions with frameshift, frameshifts and premature stop codons caused by splice sites mutations. Conversely, all patients with no RD phenotypes are compound heterozygous in which a null

mutation is found in the first allele associated with a missense mutation in the second [93, 97].

Mutations in SYNE genes

Nesprins have been characterized during the last 10 years as spectrin-repeat proteins. Nesprin-1 and nesprin-2 are encoded by two independent genes, *SYNE1* and *SYNE2*, but multiple protein isoforms are generated by alternative initiation and splicing.

Nesprin-1 and Nesprin-2

SYNE1, coding for nesprin-1, has recently been shown as neurodegenerative diseases causative gene. Mutations in *SYNE1* have been identified in French and Canadian families. The phenotype associated with these mutations is Autosomal Recessive Cerebellar Ataxia type 1 (ARCA1) also called “recessive ataxia of Beauce” [100]. In this case, the disease is characterized by a slow progression and a late-onset. Moreover, the phenotype is uniform between patients: diffuse pure cerebellar atrophy, dysarthria but no muscular features. In most cases, non-sense mutations and intronic mutations causing premature termination were found in these patients [101]. On another hand, mutations in *SYNE1* found in Japanese patients correlated with SpinoCerebellar ataxia, Autosomal Recessive type 8 (SCAR8) associated with motor neuron disease. In these patients, the phenotype begins as an amyotrophic lateral sclerosis of juvenile onset associated with progressive muscular atrophy. Only later, they develop features related to cerebellar ataxia: inability to coordinate movements and dysarthria [102]. A recent report of two siblings carrying *SYNE1* premature termination codon (PTC) mutation with a misdiagnosis for multiple sclerosis for more than a decade has been published. This paper highlights the heterogeneity of the clinical presentation of ARCA1 with potential white matter abnormalities on MRI showing that ARCA1 is not a pure cerebellar degeneration [103].

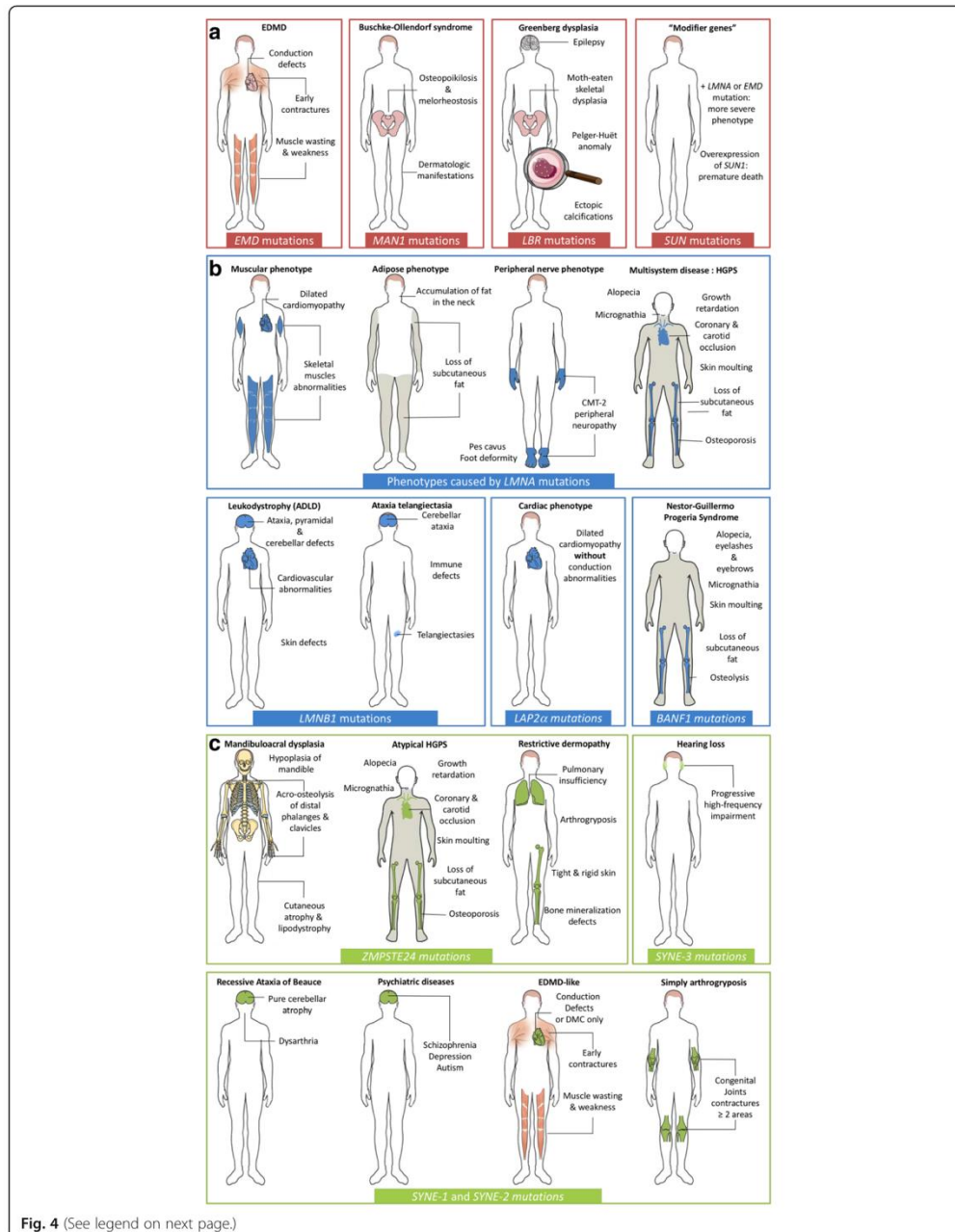


Fig. 4 (See legend on next page.)

(See figure on previous page.)

Fig. 4 Summary of all known human diseases caused by mutations in genes coding for nuclear envelope components. The diversity of phenotypes induced by mutations in genes encoding nuclear envelope components, as well as the tissues affected by these, is illustrated and organized according to the localization of the mutated protein: **(a)** inner nuclear membrane, **(b)** nuclear lamina, and **(c)** outer nuclear membrane components. EDMD: Emery-Dreifuss Muscular Dystrophy, HGPS: Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome, CMT: Charcot-Marie-Tooth Disease, ADLD: Autosomal Dominant Leukodystrophy

It has since been recognized that *SYNE1* could be involved in schizophrenia, depression and autism. For example, mutation in *SYNE1* is considered as a risk factor for schizophrenia. Moreover, recent whole-exome sequencing studies have identified *SYNE1* as an autism spectrum disorder (ASD) candidate gene [104] and more particularly, the homozygous p.Leu3206Met mutation. Finally, correlations between mutations in *SYNE1* with bipolar disorder or depression have been found [105].

Concerning their roles in musculoskeletal diseases, mutations in *SYNE1* and *SYNE2* are also associated with AD-EDMD and EDMD-like phenotypes. In a study published in 2007, the analysis of *SYNE1* and *SYNE2* genomic sequences were performed in 190 patients who suffer from EDMD or EDMD-like phenotype and for whom no mutation in *LMNA* or *EMD* were found. Six unique DNA variants, absent from a control population, were identified. Segregation analysis in affected families was performed and the segregation pattern was compatible with an autosomal-dominant inheritance. These mutations lead to nuclear defects and mislocalization of nesprin, and lamin from the nuclear envelope in fibroblasts derived from patients [106]. Mutations in *SYNE1* are also associated with DCM with conduction system defects. Very recently, other point mutations have been reported to be associated with a DCM phenotype. Fibroblasts from one patients (carrying the p.Arg374His mutation) were isolated and an increased expression of nesprin-1 (four-fold) and lamin A/C (three-fold) without mislocalization were found [107, 108]. These data are evidence that LINC complex perturbations in general are susceptible to cause skeletal and heart diseases. Thanks to genotype to phenotype correlation studies, it has been shown that mutations in the C-terminal region of nesprin 1 and 2 are associated with muscular disorders whereas mutation in the N-terminal regions are linked to ataxia [108, 109].

Mutations in *SYNE1* are responsible for Arthrogryposis Multiplex Congenital (AMC) or simply arthrogryposis. It is a group of non-progressive diseases characterized by congenital joint contractures, in two or more areas of the body, caused by reduced fetal movements. Prevalence varies from 1/12.000 to 1/3.000 newborns (Fig. 4c) [110].

Finally, recently, a new role of nesprin-1 in the formation of striated F-actin-based filaments has been described. Such filaments, so called “railroad tracks” by the authors, take place in the muscle from the nucleus to

the synaptic membrane. Interestingly, the absence of nesprin-1 is associated with a mislocalization of mRNA at postsynaptic sites causing an impaired synaptic maturation [111]. This emerging role suggests that *SYNE1* mutations could be discovered in other neuromuscular junction diseases.

Nesprin-3

Available data concerning the role of nesprin-3, encoded by *SYNE3*, are more limited. To date, no disease associated with mutations in *SYNE3* has been reported. In vitro studies based on inactivation using short-interferent-RNA have recently established that nesprin-3 plays a central role in cytoskeletal perinuclear organization, embryonic development, and preservation of tissue integrity suggesting it could also be affected in developmental diseases [101].

Nesprin-4

Nesprin-4, which is encoded by *SYNE4*, is surprisingly, and in contrast with the ubiquitous expression of the others nesprins, exclusively produced by secretory epithelia and mechanosensory cochlea hair cells. Mutations in *SYNE4* are involved in hearing loss characterized by hereditary and progressive high-frequency impairment. A loss-of-function mutation based on a frameshift caused by a two nucleotides deletion (c.228delAT) has been recently identified [112].

Conclusions

Several new and sometimes unexpected functions have recently been attributed to the cell nucleus, and more particularly to the nuclear envelope. The nuclear envelope not only ensures the integrity of the cell nucleus, but is also implicated in mechanotransduction signaling by sensing and relaying the cytoskeleton tension it interacts with. The same way, the interactions between chromatin and the inner nuclear membrane and nuclear lamina are not only crucial to coordinate and regulate gene expression, but can also be organized to improve light detection in photoreceptor rod cells of nocturnal animals [86, 87]. The nuclear envelope is not anymore considered as a simple lipid double membrane separating the cytoplasm and nucleoplasm but is recognized as a complex interface organizing both the genome and the cytoskeleton. This dual role is mediated by multiprotein complexes establishing physical interactions between the

nuclear envelope and the sarcolemmal proteins on one side and the nuclear lamina on the other side.

In recent years, several components and interactors of the LINC complex have been identified either covering the inner surface of the nucleus, or located in the inner or outer nuclear membrane. In parallel, mutations in genes encoding for nuclear envelope components have been associated with rare human diseases affecting numerous different tissues (Fig. 4). Despite several databases and studies listing hundreds of mutations, no clear correlation between a given genotype and its affected tissues or disease has been established. For example, mutations in emerin, an inner nuclear membrane protein, lamins A/C, the main component of the nuclear lamina, or FHL1, a transcription factor, can all lead to EDMD affecting both the skeletal muscle and heart. However, mutations in lamins A/C can also be responsible for pathologies affecting the peripheral nerve or adipose tissue making the molecular diagnosis of envelopathies particularly difficult. Moreover, the identification of variants in the *SUN* gene modulating the severity of an existing disease due to a mutation in another component of the LINC complex underlines the importance of looking for mutations or variants in all currently known genes encoding LINC components in patients potentially affected by a nuclear envelopopathy.

One can expect that the routine use of Next Generation Sequencing (NGS) tools in diagnosis laboratories will accelerate this discovery process and will help to better understand the pathophysiological mechanisms underlying rare pathologies without molecular explanation.

Abbreviations

ATM: Ataxia Telangiectasia Mutated; BAF: Barrier of Autointegration Factor; CGH: Comparative Genomic Hybridization; CK: Creatine Kinase; CMT: Charcot-Marie-Tooth; CRISPR: Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats; DCM-CD: Dilated Cardiomyopathy with Conduction Defect; EDMD: Emery-Dreifuss Muscular Dystrophy; FACE-1: Farnesylated-protein Converting Enzyme 1; FHL1: Four and Half LIM domains 1; HGPS: Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome; INM: Inner Nuclear Membrane; LAP2: Lamin-Associated Polypeptide; LBR: Lamin B Receptor; LGMD1B: Limb-Girdle Muscular Dystrophy 1B; LINC: Linker of Nucleoskeleton to Cytoskeleton; MAD-B: Mandibuloacral Dysplasia B; MRI: Magnetic Resonance Imaging; NGPS: Néstor-Guillermo Progeria Syndrome; ONM: Outer Nuclear Membrane; RD: Restrictive Dermopathy; SNV: Single Nucleotide Variation; YY1: Yin Yang 1

Acknowledgements

The authors would like to thank Philip Robinson (Hospices civils de Lyon) for his proof reading and English language improvements.

Funding

This work was supported by Hospices Civils de Lyon and Université Claude Bernard Lyon 1.

Availability of data and materials

Data sharing not applicable to this article as no datasets were generated or analysed during the current study.

Authors' contributions

AJ and DB wrote the manuscript, FR, AM and GM revised it critically for important intellectual content. All authors read and approved the final manuscript.

Ethics approval and consent to participate

Not applicable.

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Author details

¹University Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, Institut NeuroMyoGène, F-69622 Villeurbanne, France. ²CNRS UMR 5310, F-69622 Villeurbanne, France. ³INSERM U1217, F-69622 Villeurbanne, France. ⁴Laboratoire de Cardiogénétique Moléculaire, Centre de Biologie et Pathologie Est, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France. ⁵Nuclear Architecture Team, Institut NeuroMyoGène, CNRS UMR 5310 - INSERM U1217 - Université de Lyon - Université Claude Bernard Lyon 1, Lyon, France. ⁶Groupement Hospitalier Est - Centre de Biologie Est - Laboratoire de Cardiogénétique, 59 Boulevard Pinel, 69677 Bron, France.

Received: 10 May 2017 Accepted: 22 August 2017

Published online: 30 August 2017

References

- Cohn RD, Campbell KP. Molecular basis of muscular dystrophies. *Muscle Nerve*. 2000;23(10):1456–71.
- Bione S, Maestrini E, Rivella S, Mancini M, Regis S, Romeo G, et al. Identification of a novel X-linked gene responsible for Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Nat Genet*. 1994;8(4):323–7.
- Manilal S, Nguyen TM, Sewry CA, Morris GE. The Emery-Dreifuss muscular dystrophy protein, emerin, is a nuclear membrane protein. *Hum Mol Genet*. 1996;5(6):801–8.
- Yorifuji H, Tadano Y, Tsuchiya Y, Ogawa M, Goto K, Umetani A, et al. Emerin, deficiency of which causes Emery-Dreifuss muscular dystrophy, is localized at the inner nuclear membrane. *Neurogenetics*. 1997;1(2):135–40.
- Burke B, Stewart CL. Life at the edge: the nuclear envelope and human disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2002;3(8):575–85.
- Muchir A, Bonne E, van der Kooij AJ, van Meegen M, Baas F, Bolhuis PA, et al. Identification of mutations in the gene encoding lamins a/c in autosomal dominant limb girdle muscular dystrophy with atrioventricular conduction disturbances (LGMD1B). *Hum Mol Genet*. 2000;9(9):1453–9.
- Muchir A, Pavlidis P, Decostre V, Herron AJ, Arimura T, Bonne G, et al. Activation of MAPK pathways links LMNA mutations to cardiomyopathy in Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *J Clin Invest*. 2007;117(5):1282–93.
- Bertrand AT, Ziaei S, Ehret C, Duchemin H, Mamchaoui K, Bigot A, et al. Cellular microenvironments reveal defective mechanosensing responses and elevated YAP signaling in LMNA-mutated muscle precursors. *J Cell Sci*. 2014;127(Pt 13):2873–84.
- Fischer M, Rikeit P, Knaus P, Coirault C. YAP-mediated Mechanotransduction in skeletal muscle. *Front Physiol*. 2016;7:41.
- Tapley EC, Starr DA. Connecting the nucleus to the cytoskeleton by SUN-KASH bridges across the nuclear envelope. *Curr Opin Cell Biol*. 2013;25(1):57–62.
- Padmakumar VC, Libotte T, Lu W, Zaim H, Abraham S, Noegel AA, et al. The inner nuclear membrane protein Sun1 mediates the anchorage of Nesprin-2 to the nuclear envelope. *J Cell Sci*. 2005;118(Pt 15):3419–30.
- Crisp M, Liu Q, Roux K, Rattner JB, Shanahan C, Burke B, et al. Coupling of the nucleus and cytoplasm: role of the LINC complex. *J Cell Biol*. 2006;172(1):41–53.
- Haque F, Lloyd DJ, Smallwood DT, Dent CL, Shanahan CM, Fry AM, et al. SUN1 interacts with nuclear lamin a and cytoplasmic nesprins to provide a

- physical connection between the nuclear lamina and the cytoskeleton. *Mol Cell Biol.* 2006;26(10):3738–51.
14. Emery AE. Emery-Dreifuss muscular dystrophy - a 40 year retrospective. *Neuromuscul Disord NMD.* 2000;10(4–5):228–32.
 15. Bonne G, Capeau J, De Visser M, Duboc D, Merlini L, Morris GE, et al. 82nd ENMC international workshop, 5th international Emery-Dreifuss muscular dystrophy (EDMD) workshop, 1st workshop of the MYO-CLUSTER project EUROMEN (European muscle envelope neuropathies), 15–16 September 2000, Naarden. The Netherlands *Neuromuscul Disord NMD.* 2002;12(2):187–94.
 16. Yates JR. European workshop on Emery-Dreifuss muscular dystrophy 1991. *Neuromuscul Disord NMD.* 1991;1(6):393–6.
 17. Finsterer J, Stöllberger C, Sehnal E, Rehder H, Laccone F. Dilated, arrhythmogenic cardiomyopathy in emery-dreifuss muscular dystrophy due to the emerin splice-site mutation c.449 + 1G>a. *Cardiology.* 2015;130(1):48–51.
 18. Helbling-Leclerc A, Bonne G, Schwartz K. Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Eur J Hum Genet.* 2002;10(3):157–61.
 19. Norwood FLM, Harling C, Chinnery PF, Eagle M, Bushby K, Straub V. Prevalence of genetic muscle disease in northern England: in-depth analysis of a muscle clinic population. *Brain J Neurol.* 2009;132(Pt 11):3175–86.
 20. Berk JM, Tiftt KE, Wilson KL. The nuclear envelope LEM-domain protein emerin. *Nucl Austin Tex.* 2013;4(4):298–314.
 21. Segura-Totten M, Wilson KL. BAF: roles in chromatin, nuclear structure and retrovirus integration. *Trends Cell Biol.* 2004;14(5):261–6.
 22. Furukawa K, Sugiyama S, Osouda S, Goto H, Inagaki M, Horigome T, et al. Barrier-to-autointegration factor plays crucial roles in cell cycle progression and nuclear organization in *Drosophila*. *J Cell Sci.* 2003;116(Pt 18):3811–23.
 23. Jamin A, Wiebe MS. Barrier to autointegration factor (BANF1): interwoven roles in nuclear structure, genome integrity, innate immunity, stress responses and progeria. *Curr Opin Cell Biol.* 2015;34:61–8.
 24. Salpingidou G, Smertenko A, Hausmanowa-Petruciewicz I, Hussey PJ, Hutchison CJ. A novel role for the nuclear membrane protein emerin in association of the centrosome to the outer nuclear membrane. *J Cell Biol.* 2007;178(6):897–904.
 25. Gueneau L, Bertrand AT, Jais J-P, Salih J, Stojkovic T, Wehnert M, et al. Mutations of the FHL1 gene cause Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Am J Hum Genet.* 2009;85(3):338–53.
 26. Koch AJ, Holaska JM. Emerin in health and disease. *Semin Cell Dev Biol.* 2014;29:95–106.
 27. Emery AE. Emery-Dreifuss syndrome. *J Med Genet.* 1989;26(10):637–41.
 28. Meinke P, Schneiderat P, Srsen V, Korfali N, Lê Thành P, Cowan GJM, et al. Abnormal proliferation and spontaneous differentiation of myoblasts from a symptomatic female carrier of X-linked Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord NMD.* 2015;25(2):127–36.
 29. Burger B, Hershkovitz D, Indelman M, Kovac M, Galambos J, Haeusermann P, et al. Buschke-Ollendorff syndrome in a three-generation family: influence of a novel LEMD3 mutation to tropoelastin expression. *Eur J Dermatol.* 2010;20(6):693–7.
 30. Buschke A, Ollendorff-Curth H. Ein Fall von Dermatofibrosis lenticularis disseminata und Osteopathia condensans disseminata. *Dermatol Wochenschr.* 1928;28:257–62.
 31. Brodbeck M, Youssif Q, Diener PA, Zweier M, Gruenert J. The Buschke-Ollendorff syndrome: a case report of simultaneous osteo-cutaneous malformations in the hand. *BMC Res Notes.* 2016;9:294.
 32. Hellemans J, Preobrazhenska O, Willaert A, Debeer P, Verdonk PCM, Costa T, et al. Loss-of-function mutations in LEMD3 result in osteopoikilosis, Buschke-Ollendorff syndrome and melorheostosis. *Nat Genet.* 2004;36(11):1213–8.
 33. Kondé E, Bourgeois B, Tellier-Lebegue C, Wu W, Pérez J, Caputo S, et al. Structural analysis of the Smad2-MAN1 interaction that regulates transforming growth factor- β signaling at the inner nuclear membrane. *Biochemistry (Mosc).* 2010;49(37):8020–32.
 34. Méndez-López J, Worman HJ. Inner nuclear membrane proteins: impact on human disease. *Chromosoma.* 2012;121(2):153–67.
 35. Bengtsson L. What MAN1 does to the Smads. *TGFbeta/BMP signaling and the nuclear envelope.* *FEBS J.* 2007;274(6):1374–82.
 36. Turner EM, Schlieker C. Pelger-Huët anomaly and Greenberg skeletal dysplasia: LBR-associated diseases of cholesterol metabolism. *Rare Dis Austin Tex.* 2016;4(1):e1241363.
 37. Trajkovski Z, Vrcakovski M, Saveski J, Gucev ZS. Greenberg dysplasia (hydrops-ectopic calcification-moth-eaten skeletal dysplasia): prenatal ultrasound diagnosis and review of literature. *Am J Med Genet.* 2002;111(4):415–9.
 38. Sobreira N, Modaff P, Steel G, You J, Nanda S, Hoover-Fong J, et al. An anadysplasia-like, spontaneously remitting spondylometaphyseal dysplasia secondary to lamin B receptor (LBR) gene mutations: further definition of the phenotypic heterogeneity of LBR-bone dysplasias. *Am J Med Genet A.* 2015;167A(1):159–63.
 39. Clayton P, Fischer B, Mann A, Mansour S, Rossier E, Veen M, et al. Mutations causing Greenberg dysplasia but not Pelger anomaly uncouple enzymatic from structural functions of a nuclear membrane protein. *Nucl Austin Tex.* 2010;1(4):354–66.
 40. Kim DI, Birendra KC, Roux KJ. Making the LINC: SUN and KASH protein interactions. *Biol Chem.* 2015;396(4):295–310.
 41. Haque F, Mazzeo D, Patel JT, Smallwood DT, Ellis JA, Shanahan CM, et al. Mammalian SUN protein interaction networks at the inner nuclear membrane and their role in laminopathy disease processes. *J Biol Chem.* 2010;285(5):3487–98.
 42. Meinke P, Mattioli E, Haque F, Antoku S, Columbaro M, Straatman KR, et al. Muscular dystrophy-associated SUN1 and SUN2 variants disrupt nuclear-Cytoskeletal connections and Myonuclear organization. *PLoS Genet.* 2014;10(9):e1004605.
 43. Taranam S, Vaylann E, Meinke P, Abraham S, Yang L, Neumann S, et al. LINC complex alterations in DMD and EDMD/CMT fibroblasts. *Eur J Cell Biol.* 2012;91(8):614–28.
 44. Chen C-Y, Chi Y-H, Mutalif RA, Starost MF, Myers TG, Anderson SA, et al. Accumulation of the inner nuclear envelope protein Sun1 is pathogenic in progeric and dystrophic laminopathies. *Cell.* 2012;149(3):565–77.
 45. Bone CR, Tapley EC, Gorjánác M, Starr DA. The Caenorhabditis Elegans SUN protein UNC-84 interacts with lamin to transfer forces from the cytoplasm to the nucleus during nuclear migration. *Mol Biol Cell.* 2014;25(18):2853–65.
 46. Lattanzi G, Benedetti S, Bertini E, Boriani G, Mazzanti L, Novelli G, et al. Laminopathies: many diseases, one gene. Report of the first Italian meeting course on Laminopathies. *Acta Myol.* 2011;30(2):138–43.
 47. Worman HJ. Nuclear lamins and laminopathies. *J Pathol.* 2012;226(2):316–25.
 48. Quijano-Roy S, Mbieleu B, Bönnemann CG, Jeannot P-Y, Colomer J, Clarke NF, et al. De novo LMNA mutations cause a new form of congenital muscular dystrophy. *Ann Neurol.* 2008;64(2):177–86.
 49. Cao H, Hegele RA. Nuclear lamin a/c R482Q mutation in canadian kindreds with Dunnigan-type familial partial lipodystrophy. *Hum Mol Genet.* 2000;9(1):109–12.
 50. Shackleton S, Lloyd DJ, Jackson SN, Evans R, Niermeijer MF, Singh BM, et al. LMNA, encoding lamin a/c, is mutated in partial lipodystrophy. *Nat Genet.* 2000;24(2):153–6.
 51. Vadrot N, Duband-Goulet I, Cabet E, Attanda W, Barateau A, Vicart P, et al. The p.R482W substitution in A-type lamins deregulates SREBP1 activity in Dunnigan-type familial partial lipodystrophy. *Hum Mol Genet.* 2015;24(7):2096–109.
 52. Latour P, Vial C. Molecular diagnosis of axonal forms of Charcot-Marie-tooth disease. *Rev Neurol (Paris).* 2009;165(12):1122–6.
 53. De Sandre-Giovannoli A, Chaouch M, Kozlov S, Vallat J-M, Tazir M, Kassouri N, et al. Homozygous defects in LMNA, encoding lamin a/c nuclear-envelope proteins, cause autosomal recessive axonal neuropathy in human (Charcot-Marie-tooth disorder type 2) and mouse. *Am J Hum Genet.* 2002;70(3):726–36.
 54. Bernard R, De Sandre-Giovannoli A, Delague V, Lévy N. Molecular genetics of autosomal-recessive axonal Charcot-Marie-tooth neuropathies. *NeuroMolecular Med.* 2006;8(1–2):87–106.
 55. Hamadouche T, Poitelon Y, Genin E, Chaouch M, Tazir M, Kassouri N, et al. Founder effect and estimation of the age of the c.892C>T (p.Arg298Cys) mutation in LMNA associated to Charcot-Marie-tooth subtype CMT2B1 in families from north western Africa. *Ann Hum Genet.* 2008;72(Pt 5):590–7.
 56. Eriksson M, Brown WT, Gordon LB, Glynn MW, Singer J, Scott L, et al. Recurrent de novo point mutations in lamin a cause Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Nature.* 2003;423(6937):293–8.
 57. De Sandre-Giovannoli A, Bernard R, Cau P, Navarro C, Amiel J, Boccaccio I, et al. Lamin a truncation in Hutchinson-Gilford progeria. *Science.* 2003;300(5628):2055.
 58. Soria-Valles C, Carrero D, Gabau E, Velasco G, Quesada V, Bárcena C, et al. Novel LMNA mutations cause an aggressive atypical neonatal progeria without progerin accumulation. *J Med Genet.* 2016;2016:22.

59. Caux F, Duboscq E, Lascols O, Buendia B, Chazouillères O, Cohen A, et al. A new clinical condition linked to a novel mutation in lamins a and C with generalized lipoatrophy, insulin-resistant diabetes, disseminated leukomelanodermic papules, liver steatosis, and cardiomyopathy. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88(3):1006–13.
60. Novelli G, Muchir A, Sanguolo F, Helbling-Leclerc A, D'Apice MR, Massart C, et al. Mandibuloacral dysplasia is caused by a mutation in LMNA-encoding lamin a/C. *Am J Hum Genet.* 2002;71(2):426–31.
61. Yassae VR, Khojaste A, Hashemi-Gorji F, Ravesh Z, Toosi P. A novel homozygous LMNA mutation (p.Met540Ile) causes mandibuloacral dysplasia type a. *Gene.* 2016;577(1):8–13.
62. Bonne G, Levy N. LMNA mutations in atypical Werner's syndrome. *Lancet Lond Engl.* 2003;362(9395):1585–6. author reply 1586
63. Vigouroux C, Caux F, Capeau J, Christin-Maitre S, Cohen A. LMNA mutations in atypical Werner's syndrome. *Lancet Lond Engl.* 2003;362(9395):1585. author reply 1586
64. Navarro CL, De Sandre-Giovannoli A, Bernard R, Boccaccio I, Boyer A, Geneviève D, et al. Lamin a and ZMPSTE24 (FACE-1) defects cause nuclear disorganization and identify restrictive dermopathy as a lethal neonatal laminopathy. *Hum Mol Genet.* 2004;13(20):2493–503.
65. Hadj-Rabia S, Mashiah J, Roll P, Boyer A, Bourgeois P, Khau van Kien P, et al. A new lamin a mutation associated with acrogeria syndrome. *J Invest Dermatol.* 2014;134(8):2274–7.
66. Ambrosi P, Kreitmann B, Lepidi H, Habib G, Levy N, Philip N, et al. A novel overlapping phenotype characterized by lipodystrophy, mandibular dysplasia, and dilated cardiomyopathy associated with a new mutation in the LMNA gene. *Int J Cardiol.* 2016;209:317–8.
67. Dyalnas G, Speese S, Budnik V, Geyer PK, Wallrath LL. The role of drosophila Lamin C in muscle function and gene expression. *Development.* 2010;137(18):3067–77.
68. Ho CY, Jaalouk DE, Lammerding J. Novel insights into the disease etiology of laminopathies. *Rare Dis Austin Tex.* 2013;1(1):507–11.
69. Li Y, Hassinger L, Thomson T, Ding B, Ashley J, Hassinger W, et al. Lamin mutations accelerate aging via defective export of mitochondrial mRNAs through nuclear envelope budding. *Curr Biol CB.* 2016;26(15):2052–9.
70. Yang SH, Bergo MO, Toth JJ, Qiao X, Hu Y, Sandoval S, et al. Blocking protein farnesyltransferase improves nuclear blebbing in mouse fibroblasts with a targeted Hutchinson-Gilford progeria syndrome mutation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(29):10291–6.
71. Gordon LB, Kleinman ME, Miller DT, Neuberger DS, Giobbie-Hurder A, Gerhard-Herman M, et al. Clinical trial of a farnesyltransferase inhibitor in children with Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(41):16666–71.
72. Varela I, Pereira S, Ugalde AP, Navarro CL, Suárez MF, Cau P, et al. Combined treatment with statins and aminobisphosphonates extends longevity in a mouse model of human premature aging. *Nat Med.* 2008;14(7):767–72.
73. Bifulco M, D'Alessandro A, Paladino S, Malfitano AM, Notarnicola M, Caruso MG, et al. N6-isopentenyladenosine improves nuclear shape in fibroblasts from humans with progeroid syndromes by inhibiting the farnesylation of prelamin a. *FEBS J.* 2013;280(23):6223–32.
74. Gabriel D, Gordon LB, Djabali K. Temsirolimus partially rescues the Hutchinson-Gilford Progeria cellular phenotype. *PLoS One.* 2016;11(12):e0168988.
75. Choi JC, Muchir A, Wu W, Iwata S, Homma S, Morrow JP, et al. Temsirolimus activates autophagy and ameliorates cardiomyopathy caused by lamin a/C gene mutation. *Sci Transl Med.* 2012;4(144):144ra102.
76. Harhour K, Navarro C, Depetris D, Mattei M-G, Nissin X, Cau P, et al. MG132-induced progerin clearance is mediated by autophagy activation and splicing regulation. *EMBO Mol Med.* 2017;28:e201607315.
77. Blondel S, Jaskowiak A-L, Egesipe A-L, Le Corf A, Navarro C, Cordette V, et al. Induced Pluripotent stem cells reveal functional differences between drugs currently investigated in patients with Hutchinson-Gilford Progeria syndrome. *Stem Cells Transl Med.* 2014;3(4):510–9.
78. Blondel S, Egesipe A-L, Picardi P, Jaskowiak A-L, Notarnicola M, Ragot J, et al. Drug screening on Hutchinson Gilford progeria pluripotent stem cells reveals aminopyrimidines as new modulators of farnesylation. *Cell Death Dis.* 2016;7:e2105.
79. Lariou D, Britton S, Demir M, Rodríguez R, Jackson SP. Chemical inhibition of NAT10 corrects defects of laminopathic cells. *Science.* 2014;344(6183):527–32.
80. Scharner J, Figeac N, Ellis JA, Zammit PS. Ameliorating pathogenesis by removing an exon containing a missense mutation: a potential exon-skipping therapy for laminopathies. *Gene Ther.* 2015;22(6):503–15.
81. Padiath QS, Saigoh K, Schiffrmann R, Asahara H, Yamada T, Koepfen A, et al. Lamin B1 duplications cause autosomal dominant leukodystrophy. *Nat Genet.* 2006;38(10):1114–23.
82. Hutchison CJ. B-type lamins in health and disease. *Semin Cell Dev Biol.* 2014;29:158–63.
83. Schuster J, Sundblom J, Thuresson A-C, Hassin-Baer S, Klopstock T, Dichgans M, et al. Genomic duplications mediate overexpression of lamin B1 in adult-onset autosomal dominant leukodystrophy (ADLD) with autonomic symptoms. *Neurogenetics.* 2011;12(1):65–72.
84. Heng MY, Lin S-T, Verret L, Huang Y, Kamiya S, Padiath QS, et al. Lamin B1 mediates cell-autonomous neuropathology in a leukodystrophy mouse model. *J Clin Invest.* 2013;123(6):2719–29.
85. Lin S-T, Fu Y-H. miR-23 regulation of lamin B1 is crucial for oligodendrocyte development and myelination. *Dis Model Mech.* 2009;2(3–4):178–88.
86. Giorgio E, Robyr D, Spielmann M, Ferrero E, Di Gregorio E, Imperiale D, et al. A large genomic deletion leads to enhancer adoption by the lamin B1 gene: a second path to autosomal dominant adult-onset demyelinating leukodystrophy (ADLD). *Hum Mol Genet.* 2015;24(11):3143–54.
87. Hegele RA, Cao H, Liu DM, Costain GA, Charlton-Menys V, Rodger NW, et al. Sequencing of the reannotated LMNB2 gene reveals novel mutations in patients with acquired partial lipodystrophy. *Am J Hum Genet.* 2006;79(2):383–9.
88. Damiano JA, Afawi Z, Bahlo M, Mauermann M, Misk A, Arsov T, et al. Mutation of the nuclear lamin gene LMNB2 in progressive myoclonus epilepsy with early ataxia. *Hum Mol Genet.* 2015;24(11):4483–90.
89. Gesson K, Vidak S, Foisner R. Lamin-associated polypeptide (LAP)2α and nucleoplasmic lamins in adult stem cell regulation and disease. *Semin Cell Dev Biol.* 2014;29:116–24.
90. Taylor MRG, Slavov D, Gajewski A, Vitek S, Ku L, Fain PR, et al. Thymopoietin (lamin-associated polypeptide 2) gene mutation associated with dilated cardiomyopathy. *Hum Mutat.* 2005;26(6):566–74.
91. Puente XS, Quesada V, Osorio FG, Cabanillas R, Cadiñanos J, Fraile JM, et al. Exome sequencing and functional analysis identifies BANF1 mutation as the cause of a hereditary progeroid syndrome. *Am J Hum Genet.* 2011;88(5):650–6.
92. Cabanillas R, Cadiñanos J, Villameyide JAF, Pérez M, Longo J, Richard JM, et al. Néstor-Guillermo progeria syndrome: a novel premature aging condition with early onset and chronic development caused by BANF1 mutations. *Am J Med Genet A.* 2011;155A(11):2617–25.
93. Barrowman J, Wiley PA, Hudon-Miller SE, Hrycyna CA, Michaelis S. Human ZMPSTE24 disease mutations: residual proteolytic activity correlates with disease severity. *Hum Mol Genet.* 2012;21(18):4084–93.
94. Ahmad Z, Phadke SR, Arch E, Glass J, Agarwal AK, Garg A. Homozygous null mutations in ZMPSTE24 in restrictive dermopathy: evidence of genetic heterogeneity. *Clin Genet.* 2012;81(2):158–64.
95. Quigley A, Dong YY, Pike ACW, Dong L, Shrestha L, Berridge G, et al. The structural basis of ZMPSTE24-dependent laminopathies. *Science.* 2013;339(6127):1604–7.
96. Navarro CL, Cadiñanos J, De Sandre-Giovannoli A, Bernard R, Courrier S, Boccaccio I, et al. Loss of ZMPSTE24 (FACE-1) causes autosomal recessive restrictive dermopathy and accumulation of Lamin a precursors. *Hum Mol Genet.* 2005;14(11):1503–13.
97. Navarro CL, Esteves-Vieira V, Courrier S, Boyer A, Duong Nguyen T, Huong LTT, et al. New ZMPSTE24 (FACE1) mutations in patients affected with restrictive dermopathy or related progeroid syndromes and mutation update. *Eur J Hum Genet EJHG.* 2014;22(8):1002–11.
98. Matulevičienė A, Meškienė R, Morkūnienė A, Ambrozaitytė L, Meškauskas R, Garunkštienė R, et al. Frame shift mutations of the ZMPSTE24 gene in two siblings with restrictive dermopathy. *Clin Dysmorphol.* 2016;25(1):7–11.
99. Galant D, Gaborit B, Desgrouas C, Abdesselam I, Bernard M, Levy N, et al. A heterozygous ZMPSTE24 mutation associated with severe metabolic syndrome, ectopic fat accumulation, and dilated Cardiomyopathy. *Cell.* 2016;5(2):21.
100. Gros-Louis F, Dupré N, Dion P, Fox MA, Laurent S, Verreault S, et al. Mutations in SYNE1 lead to a newly discovered form of autosomal recessive cerebellar ataxia. *Nat Genet.* 2007;39(1):80–5.
101. Cartwright S, Karakisisoglou I. Nesprins in health and disease. *Semin Cell Dev Biol.* 2014;29:169–79.
102. Izumi Y, Miyamoto R, Morino H, Yoshizawa A, Nishinaka K, Udaka F, et al. Cerebellar ataxia with SYNE1 mutation accompanying motor neuron disease. *Neurology.* 2013;80(6):600–1.

103. Algahtani H, Marzouk Y, Algahtani R, Salman S, Shirah B. Autosomal recessive Cerebellar ataxia type 1 mimicking multiple sclerosis: a report of two siblings with a novel mutation in SYNE1 gene in a Saudi family. *J Neurol Sci.* 2017;372:97–100.
104. Yu TW, Chahrour MH, Coulter ME, Jiralerspong S, Okamura-Ikeda K, Ataman B, et al. Using whole-exome sequencing to identify inherited causes of autism. *Neuron.* 2013;77(2):259–73.
105. Green EK, Grozeva D, Forty L, Gordon-Smith K, Russell E, Farmer A, et al. Association at SYNE1 in both bipolar disorder and recurrent major depression. *Mol Psychiatry.* 2013;18(5):614–7.
106. Zhang Q, Bethmann C, Worth NF, Davies JD, Wasner C, Feuer A, et al. Nesprin-1 and -2 are involved in the pathogenesis of Emery Dreifuss muscular dystrophy and are critical for nuclear envelope integrity. *Hum Mol Genet.* 2007;16(23):2816–33.
107. Puckelwartz MJ, Kessler EJ, Kim G, Dewitt MM, Zhang Y, Earley JU, et al. Nesprin-1 mutations in human and murine cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol.* 2010;48(4):600–8.
108. Zhou C, Li C, Zhou B, Sun H, Koullourou V, Holt I, et al. Novel nesprin-1 mutations associated with dilated cardiomyopathy cause nuclear envelope disruption and defects in myogenesis. *Hum Mol Genet.* 2017;2017:7.
109. Banerjee I, Zhang J, Moore-Morris T, Pfeiffer E, Buchholz KS, Liu A, et al. Targeted ablation of nesprin 1 and nesprin 2 from murine myocardium results in cardiomyopathy, altered nuclear morphology and inhibition of the biomechanical gene response. *PLoS Genet.* 2014;10(2):e1004114.
110. Baumann M, Steichen-Gersdorf E, Krabichler B, Petersen B-S, Weber U, Schmidt WM, et al. Homozygous SYNE1 mutation causes congenital onset of muscular weakness with distal arthrogryposis: a genotype-phenotype correlation. *Eur J Hum Genet EJHG.* 2016;2016:26.
111. Packard M, Jokhi V, Ding B, Ruiz-Cañada C, Ashley J, Budnik V. Nucleus to synapse Nesprin1 railroad tracks direct synapse maturation through RNA localization. *Neuron.* 2015;86(4):1015–28.
112. Horn HF, Brownstein Z, Lenz DR, Shivatzki S, Dror AA, Dagan-Rosenfeld O, et al. The LINC complex is essential for hearing. *J Clin Invest.* 2013;123(2):740–50.
113. Maggi L, Carboni N, Bernasconi P. Skeletal muscle Laminopathies: a review of clinical and molecular features. *Cell.* 2016;5(3):33.

Submit your next manuscript to BioMed Central
and we will help you at every step:

- We accept pre-submission inquiries
- Our selector tool helps you to find the most relevant journal
- We provide round the clock customer support
- Convenient online submission
- Thorough peer review
- Inclusion in PubMed and all major indexing services
- Maximum visibility for your research

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit





Nesprins and Lamins in Health and Diseases of Cardiac and Skeletal Muscles

Alexandre Janin^{1,2*} and Vincent Gache^{1*}

¹ CNRS UMR5310, INSERM U1217, Institut NeuroMyoGène, Université Claude Bernard Lyon 1, Université de Lyon, Lyon, France, ² Laboratoire de Cardiogénétique Moléculaire, Centre de Biologie et Pathologie Est, Hospices Civils de Lyon, Bron, France

OPEN ACCESS

Edited by:

Julien Ochala,
King's College London,
United Kingdom

Reviewed by:

Tyler John Kirby,
Cornell University, United States
Jacob Alexander Ross,
King's College London,
United Kingdom

*Correspondence:

Alexandre Janin
alexandre.janin01@chu-lyon.fr
Vincent Gache
vincent.gache@inserm.fr

Specialty section:

This article was submitted to
Striated Muscle Physiology,
a section of the journal
Frontiers in Physiology

Received: 29 June 2018

Accepted: 22 August 2018

Published: 07 September 2018

Citation:

Janin A and Gache V (2018) Nesprins
and Lamins in Health and Diseases
of Cardiac and Skeletal Muscles.
Front. Physiol. 9:1277.
doi: 10.3389/fphys.2018.01277

Since the discovery of the inner nuclear transmembrane protein emerin in the early 1990s, nuclear envelope (NE) components and related involvement in nuclei integrity and functionality have been highly investigated. The NE is composed of two distinct lipid bilayers described as the inner (INM) and outer (ONM) nuclear membrane. NE proteins can be specifically “integrated” in the INM (such as emerin and SUN proteins) or in the ONM such as nesprins. Additionally, flanked to the INM, the nuclear lamina, a proteinaceous meshwork mainly composed of lamins A and C completes NE composition. This network of proteins physically interplays to guarantee NE integrity and most importantly, shape the bridge between cytoplasmic cytoskeletons networks (such as microtubules and actin) and the genome, through the anchorage to the heterochromatin. The essential network driving the connection of nucleoskeleton with cytoskeleton takes place in the perinuclear space (the space between ONM and INM) with the contribution of the LINC complex (for Linker of Nucleoskeleton to Cytoskeleton), hosting KASH and SUN proteins interactions. This close interplay between compartments has been related to diverse functions from nuclear integrity, activity and positioning through mechanotransduction pathways. At the same time, mutations in NE components genes coding for proteins such as lamins or nesprins, had been associated with a wide range of congenital diseases including cardiac and muscular diseases. Although most of these NE associated proteins are ubiquitously expressed, a large number of tissue-specific disorders have been associated with diverse pathogenic mutations. Thus, diagnosis and molecular explanation of this group of diseases, commonly called “nuclear envelopathies,” is currently challenging. This review aims, first, to give a better understanding of diverse functions of the LINC complex components, from the point of view of lamins and nesprins. Second, to summarize human congenital diseases with a special focus on muscle and heart abnormalities, caused by mutations in genes coding for these two types of NE associated proteins.

Keywords: LINC complex, nuclear envelope, lamins A/C, LMNA, nesprins, human diseases

INTRODUCTION

The Nuclear Envelope (NE) is composed of two distinct lipid bilayers so called inner (INM) and outer (ONM) nuclear membrane. This particular membrane architecture allows protection of chromatin from the rest of the cell by a physical separation between cytoplasm and nucleoplasm (Osorio and Gomes, 2013). Transmembrane proteins embedded in these two joined-membranes provide an architectural support to the nucleus as well as a physical bridge between nucleoskeleton and cytoskeleton. Physical coupling of these two skeletons is based on the so-called LINC complex (for Linker of the Nucleoskeleton to the Cytoskeleton). It couples, in the perinuclear space, proteins localized at the ONM and containing KASH domains (Klarsicht/Anc-1/Syne homology) with proteins localized at the INM and containing SUN domains (Sad1/UNC-84 homology) (Tapley and Starr, 2013). To date, six KASH domain-containing proteins have been described: nesprins-1, -2, -3, -4, KASH5 and lymphoid-restricted membrane protein (LRMP), respectively, encoded by *SYNE1*, *SYNE2*, *SYNE3*, *SYNE4*, *KASH5*, and *LRPM* genes (Behrens et al., 1994; Zhang et al., 2001; Wilhelmssen et al., 2005; Roux et al., 2009). SUN proteins are embedded in the INM and interact using their N-terminus domain with nuclear pore complex (NPC) and lamins (Padmakumar et al., 2005; Haque et al., 2006). Conversely, C-terminus domain is located in the perinuclear space and interacts with nesprins, which are embedded in the ONM (Padmakumar et al., 2005; Crisp et al., 2006; Haque et al., 2006; Ketema et al., 2007; Horn et al., 2013). This LINC complex play a role in diverse specialized cellular activities such as nuclear morphology maintenance, nuclear positioning, genes expression and cell signaling (Crisp et al., 2006; Lombardi and Lammerding, 2011; Mellad et al., 2011; Stroud et al., 2014). At the nucleoplasmic side, the LINC complex interacts with the nuclear lamina, a network of intermediate filaments just beneath INM and mainly composed of two different groups of lamin: A-type (lamins A and C) and B-type lamins (lamins B1 and B2) (Fisher et al., 1986; McKeon et al., 1986; Peter et al., 1989).

In this review, we will summarize functional diversities of proteins associated to the LINC complex with a particular focus

Abbreviations: ABD, actin-binding domain; AD-EDMD, autosomal-dominant emery-dreifuss muscular dystrophy; AD, adaptive domain; AMC, arthrogyrosis multiplex congenital; ARCA1, autosomal recessive cerebellar ataxia type 1; BMP, bone morphogenetic proteins; CH, calponin homology; CMD, congenital muscular dystrophy; CMT2B1, charcot-marie-tooth syndrome 2B1; CNS, central nervous system; DCM-CD, dilated cardiomyopathy phenotype with conduction defects; DCM, dilated cardiomyopathy; EDMD, emery-dreifuss muscular dystrophy; ERK, extracellular signal-regulated kinase; EZH2, enhancer of zeste homolog 2; FPLD, dunningan-type familial partial lipodystrophy; GWAS, genome-wide association studies; HGPS, hutchinson-gilford progeria syndrome; INM, inner nuclear membrane; KASH, Klarsicht/Anc-1/Syne Homology; KLC, kinesin light chain (KLC-1/2); LGMD1B, limb-girdle muscular dystrophy 1B; LINC complex, linker of nucleoskeleton to cytoskeleton; LRMP, lymphoid restricted membrane protein; MAP, microtubule-associated proteins; MAPK, mitogen-activated protein kinases; MTOC, microtubule organizing center; NE, nuclear envelope; NGS, next generation sequencing; NPC, nuclear pore complex; ONM, outer nuclear membrane; PRC2, polycomb repressive complex 2; SR, spectrin repeats; SUN, Sad1/UNC-84 homology; TGF, tissue growth factor; VSMC, vascular smooth muscle cells; WES, whole exome sequencing; WGS, whole genome sequencing; YAP, yes-associated protein.

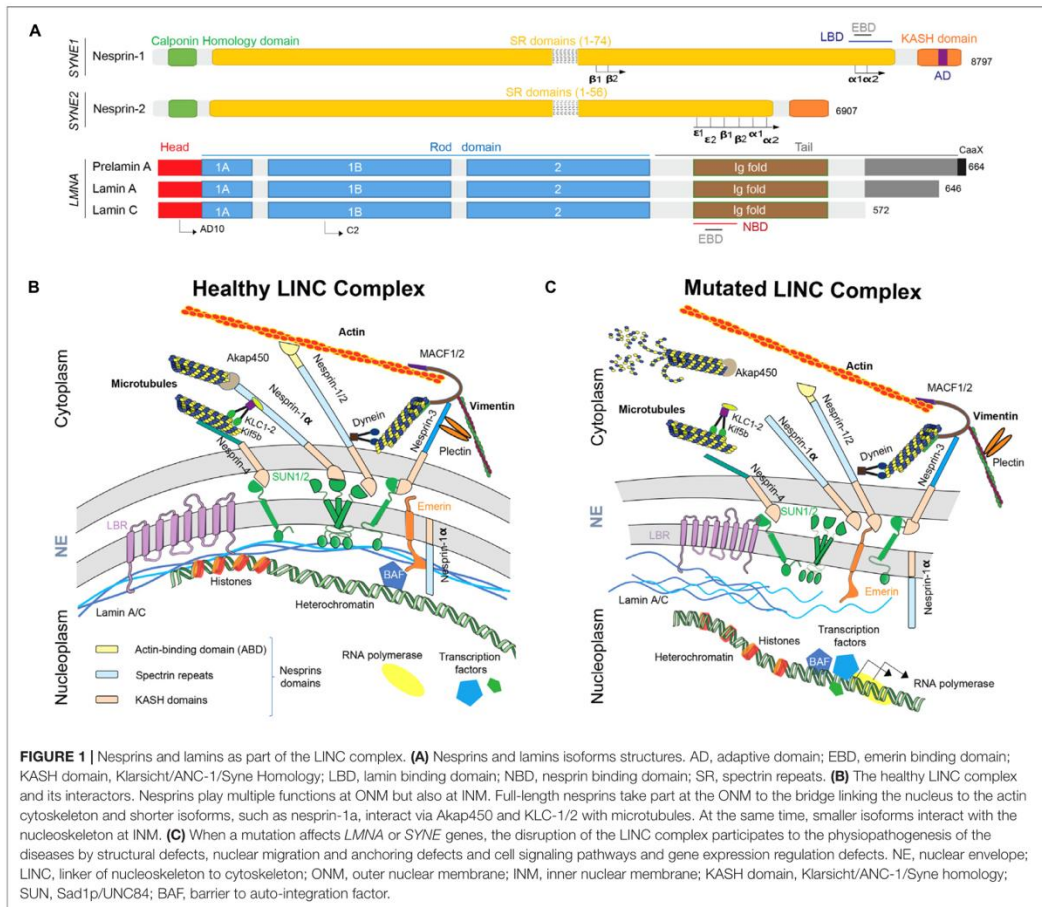
on lamin A/C and nesprins. We will recapitulate known muscular and cardiac abnormalities induced by mutations in those genes and will discuss our recent advances in related pathogenesis.

NESPRINS AND LAMINS AS COMPONENTS OF THE LINC COMPLEX

In human, full-length nesprin-1 and nesprin-2, which are the ubiquitously expressed giant nesprins isoforms, are respectively, with a molecular weight of 1 MDa (146 exons) and 800 kDa (116 exons), the second and the third largest described proteins, after the “untouchable” titin (4.2 MDa) (Zhang et al., 2001). Nesprins-1 and -2 are ubiquitous proteins, commonly described as ONM components and composed of three major domains: (i) a Calponin Homology (CH) domain, also called Actin-Binding Domain (ABD) located in the N-terminus side that binds to the actin cytoskeleton; (ii) a long central rod domain composed of multiple spectrin repeats (SR) (respectively, 74 and 56 SR in nesprin-1 and -2) and that supports interactions with other proteins such as emerin with the Emerin Binding Domain (EBD) or lamins with the Lamin Binding Domain (LBD) and finally (iii) a C-terminus KASH domain embedded in the ONM (Zhang et al., 2001; Rajgor and Shanahan, 2013; **Figure 1A**). An additional domain has been described and called “adaptive domain” (AD). This highly conserved domain is located at the C-terminus extremity and is crucial for structural stabilization of SR (Simpson and Roberts, 2008; Zhong et al., 2010).

Numerous isoforms of nesprin-1 and -2 are produced by alternative initiation/termination of transcription and/or alternative splicing of *SYNE1* and *SYNE2* genes. These isoforms have a tissue-specific expression and exhibit different subcellular locations, such as actin stress-fibers, focal adhesions or microtubules (Rajgor et al., 2012; Duong et al., 2014). As previously described, full-length isoforms are located at the ONM and, thanks to their KASH domains, interacts in the perinuclear space with SUN1/2. This layout allow the interaction with both actin and microtubule networks through associated molecular motors such as dynein, kinesins light chain (KLC-1/2) and/or microtubule-mediated nucleation factor, such as akap450 (Wilson and Holzbaaur, 2015; Gimpel et al., 2017). Interestingly, some isoforms such as full-length nesprin-2 and nesprin-1 α , a small isoform, could also localize at the INM leading to the direct interaction with emerin, SUN1/2 and/or lamin A/C (**Figure 1A**; Zhang, 2005; Holt et al., 2016).

Nesprin-1 and -2, especially small isoforms, nesprin-1 α 2 and -2 α 1, are particularly highly expressed in skeletal and cardiac muscles (Duong et al., 2014). Despite the fact that *SYNE1* and *SYNE2* genes are about 60% homologous, nesprin-1 is more conserved than nesprin-2 (Zhang et al., 2001). However, ABD domains and C-terminus part of SR domains are highly conserved, especially in nesprin-1 α 2, -2 α 1 and -2 ϵ 2, short skeletal muscle-specific and cardiac-specific isoforms. These conserved domains suggest that these isoforms play a similar role in skeletal muscle and cardiac cells physiology (Autore et al., 2013). Nesprin-3, also ubiquitously expressed, was first discovered associated with the ABD of the cytoskeletal linker protein plectin



(Wilhelmsen et al., 2005; Ketema et al., 2013). Plectin acts as a mechanical linker between intermediate filaments networks and various cellular structures and is crucial for myofibers integrity. Plectin deficiency has been shown to affect chromatin structure and some genes expression mediating mechanotransduction. Nesprin-3 also interact with ABD of MACF1/2 (Microtubule-Actin Cross Factor 1/2) thanks to its unique spectrin repeat domain and contribute to vimentin accumulation at the vicinity of the nucleus (Wilhelmsen et al., 2005; Ketema et al., 2013; Figure 1B). Nesprin-4 is surprisingly exclusively produced by secretory epithelia and mechanosensory cochlea hair cells (Roux et al., 2009; Horn et al., 2013). *KASH5* is only expressed in meiotic cells (Stewart and Burke, 2014). And, finally, *LRPM* is expressed in some taste cells of mammalian tongues and plays a crucial role in signal transduction by binding IP3 receptors (Shindo et al., 2010). To resume, nesprins-1 and -2 and related isoforms form a strong physical links allowing connection

between nucleoskeleton and cytoskeleton including microtubules network, actin and intermediate filaments.

The nuclear lamina is composed of class-V intermediate filaments proteins called “nuclear lamins.” Several isoforms have been described in mammals, divided in two groups: A and B-type lamins (Dechat et al., 2008). A-type lamins are encoded by *LMNA* gene, located on chromosome 1, producing two major isoforms in somatic cells: lamin-A and lamin-C (Figure 1A). These isoforms are expressed in the majority of differentiated cells, although absent in early stages of embryonic development (Dechat et al., 2010). These two isoforms are produced by an alternative splicing in exon 10. Thus, N-terminus part of lamin-A and -C are similar until the 566th amino-acid and then, lamin-C shows five specific amino-acids in the C-terminus part while lamin A exhibit a specific domain encoded by exons 11 and 12 of *LMNA* gene (Figure 1A; Furukawa et al., 1994). As the other intermediate filaments, nuclear lamins form dimers

by their central rod domain (Stuurman et al., 1998; Herrmann and Aebi, 2016). Additionally, three isoforms of B-type lamins have been described: lamin B1 encoded by *LMNB1* gene and lamins B2 and B3, encoded by *LMNB2* gene (Dittmer and Misteli, 2011). Nuclear lamin A and C are able to bind both nesprin-1 α (Mislow et al., 2002) and nesprin-2 (Yang et al., 2013), heterochromatin (Bruston et al., 2010) and emerin (Sakaki et al., 2001), that itself bind transcription factors and DNA-binding proteins such as barrier to autointegration factor (BAF) (Burke, 1990; Yuan et al., 1991; Furukawa et al., 2003; Segura-Totten and Wilson, 2004; Dialynas et al., 2010; Jamin and Wiebe, 2015; **Figure 1B**).

This association between nesprins at the ONM through SUN proteins at the INM and lamins at the vicinity of INM is the key place in cells where mechanotransduction occurs. This process allows cytoplasmic mechanical forces, initiated through the dynamics and forces generated by different cytoskeletons (actin, microtubule, and intermediate filaments) to cross the nuclear membrane and influence the transcriptional state of the cell. This transduction can alter transcriptional efficiency through chromatin organization and regulation of epigenetics markers as well as processes linked to DNA replication (Tajik et al., 2016; Kirby and Lammerding, 2018; Wang et al., 2018). The respective role of alternative pathways in mechanical transduction during lifetime of cells remains to be determined. Interestingly, in post-mitotic conditions such as muscle cells, proteins of the LINC complex, especially nesprins and lamins emerged as a fundamental node in the crossroad of muscle pathogenesis.

ROLES OF NESPRINS AND LAMINS IN MUSCLE PHYSIOLOGY

Cardiac and skeletal muscles are both striated muscles composed of repeated units called sarcomeres. Sarcomeres of both types of muscle are an arrangement of alternating thick and thin filaments resulting in a striated cell pattern. Cardiomyocytes are mononucleated cells with a centrally localized nucleus and form, together with associated cardiomyocytes, a syncytium-like via intercalated disks that link membranes of contiguous cardiomyocytes, providing synchronized contraction. Skeletal muscle is an association of large multinucleated cells with peripheral nuclei called myofibers, resulting from the fusion of specialized cells, myocytes (Tedesco et al., 2010; Chal and Pourqu , 2017). Prior to fusion, myoblasts are highly proliferative, but exit the cell cycle at the onset of myoblasts differentiation and become myocytes, specialized cells possessing the potential to fuse with each other (Yin et al., 2013). As myocytes fuse, they form multinucleated syncytium: myotubes. As myotubes mature into myofibers, contractile units (sarcomeres) are formed. A fully developed muscle is made of an association of myofibers (Sanger et al., 2010; Lindskog et al., 2015). Interestingly, myonuclei positioning is dramatically different between skeletal and cardiac muscles (peripheral vs. central). One could propose that LINC complex composition or arrangement and binding partners will be different between

these two tissues. However, evidences about these differences are still lacking and will probably highlight alternative mechanisms in these two systems.

The LINC complex integrity has been shown to be crucial in myonuclei positioning and movements during both fusion of myoblasts and differentiation processes into myotubes/myofibers (Dupin et al., 2011; Gundersen and Worman, 2013; Wilson and Holzbaaur, 2015; Stroud et al., 2017). More precisely, nesprin-1 is known to be critical in myonuclear anchoring in skeletal muscle (Zhang et al., 2007b; Puckelwartz et al., 2009) allowed by the bridge between myonuclei and actin cytoskeleton (Padmakumar et al., 2004; Zhang et al., 2007b, 2010; Puckelwartz et al., 2009; Banerjee et al., 2014). Proper nuclear positioning and movements in muscle is mainly mediated by cytoskeletal networks (microtubules and actin) and is known to depend on members of the LINC complex in association with nucleoskeleton components (Metzger et al., 2012; Chang et al., 2015; Wilson and Holzbaaur, 2015; Gache et al., 2017; Roman et al., 2017). Both full-length nesprin-1 and nesprin-2 interact with Kif5b molecular motors through a conserved motif located in their C-terminus part of kinesins light chain KLC-1/2. This interaction is crucial for nuclear movement and positioning in differentiated myotubes (Metzger et al., 2012; Wilson and Holzbaaur, 2015; Zhou et al., 2017). Moreover, Nesprin-1 α is now known to be able to recruit Akap450 to the NE. This recruitment is crucial for nuclear positioning and microtubule organization during myogenesis by switching the Microtubule Organizing Center (MTOC) to the NE (Gimpel et al., 2017). Additionally, differential expression kinetic of alternative nesprins isoforms occurs during muscle differentiation (Randles et al., 2010): in proliferative myoblasts, full-length nesprin-1 isoform is expressed but not nesprin-1 α_2 while during myogenesis, full-length nesprin-1 and nesprin-1 α_2 are both up-regulated (Holt et al., 2016; Stroud et al., 2017; Zhou et al., 2017). In human vascular smooth muscle cells (VSMCs), in addition to the NE localization, nesprin-2 is also present in lamellipodia, focal adhesions and filopodia (Zhang, 2005). Moreover, in human skeletal muscle cells, nesprin-2 isoforms had been shown to relocalized at sarcomeres, with a close association with titin (Zhang, 2005). Additionally, *in vivo*, nesprin-2 can supplant nesprin-1 at the NE (Randles et al., 2010). Finally, nesprins involvements in cardiomyocytes functionality and during cardiac cell differentiation are for now limited mainly because of technical issues (*i.e.*, difficulties to isolate and purify mature cardiomyocytes, absence of cardiac stem cells and regeneration process...). Nonetheless, it has been shown that nesprin-1 knockdown alter differentiation of embryonic stem cells in mature cardiomyocytes in mouse model (Gao et al., 2012) and that nesprins-1 and -2 ablation cause cardiomyopathy in mice with an altered nuclear morphology and altered mechanotransduction (Banerjee et al., 2014).

Plectin, a cytoskeletal protein interacting with nesprin-3, acts as a mechanical linker between intermediate filaments networks and various cellular structures and is crucial for myofibers integrity. Plectin deficiency has been shown to affect chromatin structure, specific genes expression mediating mechanotransduction but also mitochondrial network organization with the upregulation of Mfn-2, the mitochondrial

fusion-associated protein mitofusion-2 (Staszewska et al., 2015; Winter et al., 2015).

In the same manner, lamins exert their function thanks to their interaction with numerous lamin-binding partners. Over 100 putative binding proteins are predicted with a high variety of functions: mechanotransduction, cell migration and differentiation (Gerace and Tapia, 2018). Crucial role of lamins reside in the structural support gave to the nuclei in cell, especially in contractile tissues. This role is mediated by a structure and assembly of lamins based on an α -helical coiled coil structure assembled into fibers (Gruenbaum and Foisner, 2015). This typical network pattern provides resistance to contractile cells, such as in cardiomyocytes and muscle fibers, which are subjected to physical forces (Carmosino et al., 2014). For example, lamin A/C, by monitoring nuclei membrane rigidity, is determinant in the control of myonuclear movement to the periphery of myofibers (Roman et al., 2017). As discussed after, this role is the foundation of “mechanical stress hypothesis,” also called “structural hypothesis” about the physiopathological mechanisms underlying *LMNA* mutations. The second crucial role of lamins is their interactions with chromatin, signaling molecules and transcription factors (Herrmann et al., 2007). This interplay with lamin A/C, but also with other LINC complex components or interactors (signaling molecules or transcription factors) is an important mechanism to explain gene expression regulation by NE proteins (Robson et al., 2016; Kirby and Lammerding, 2018; Wang et al., 2018). Numerous studies have highlighted this regulatory role of lamins in signaling pathways such as MAPK (Muchir et al., 2007), Akt/mTOR (Choi et al., 2012; Ramos et al., 2012), TGF α (Arimura et al., 2005; Cohen et al., 2013), BMP (Janin et al., 2018), YAP (Bertrand et al., 2014), and major apoptosis signaling pathways (Lu et al., 2010). Lamins A/C have also a crucial role for proper skeletal muscle stem cells differentiation: primary *Lmna*-null myoblasts exhibit altered expression of differentiation regulators such as MyoD1 or desmin (Frock et al., 2006). Moreover, lamin A/C inactivation has been shown to severely impair Serum Response Factor (SRF) pathway, which control genes coding for actin cytoskeleton (Vartiainen et al., 2007; Ho et al., 2013) and for sarcomeric proteins (Balza and Misra, 2006). This characteristic will also contribute to control physiopathological and tissue-specific mechanisms underlying in *LMNA* mutations. Finally, lamins have been shown also to play a role in autophagy and probably in senescence. In *Lmna*^{-/-} mice, hyperactivation of mTORC pathway is responsible for autophagy inhibition and, thus, disease progression. This inhibition could lead to energy deficit and accumulation of damaged and toxic proteins and/or organelles (Ramos et al., 2012).

NESPRINS AND LAMINS MUTATIONS IN HUMAN DISEASES

Mutations in *SYNE* Genes

Mutations in *SYNE1*, coding for nesprin-1, have been reported to cause neurodegenerative diseases such as “Autosomal Recessive Cerebellar Ataxia type 1” (ARCA1), also called “Autosomal

recessive ataxia, Beauce type” (Gros-Louis et al., 2007). In patients, homogenous phenotype was firstly reported resulting in a relatively pure and slowly progressive cerebellar ataxia with dysarthria and rare extra-neurological features and an onset at adult age. This disease was mostly identified in French and Canadian families (Dupré et al., 2007; Gros-Louis et al., 2007; Noreau et al., 2013). Later, thanks to molecular diagnosis technics improvement, diffuse pure cerebellar ataxia was challenged. Exploration of large *SYNE1* mutations cohort in European and non-European patients show that resulting phenotype is wider and encompassed neurological and non-neurological symptoms. To note, in this study, 81% of the patients exhibited additional non-cerebellar features and a multisystemic phenotype (Synofzik et al., 2016). Clinical spectrum encompasses upper and lower motor neuron disease, brainstem abnormalities and musculoskeletal features (kyphosis, scoliosis, *pes cavus*, or contractures) (Izumi et al., 2013; Synofzik et al., 2016; Algahtani et al., 2017). Similarly, onset age is variable from an early onset for some complex neurodegenerative syndromes to adult-age onset for pure cerebellar ataxia syndromes. In most cases, non-sense or intronic mutations causing premature termination could be highlighted (Synofzik et al., 2016). Thus, different nesprin-1 isoforms could be affected by these mutations, partially explaining the variability in observed phenotypes (Cartwright and Karakesisoglou, 2014; Razafsky and Hodzic, 2015). This observation is consistent with evidences in *Syne1* mutant mice model. In *Syne1*^{-/-} mice, in which the C-terminal SR domains of nesprin-1 were ablated (Zhang et al., 2010), young mice exhibit growth retardation, increased body weight variability and exercise intolerance. In contrast, in *Syne1* ^{Δ KASH}, in which the KASH domain was deleted, mice exhibit normal viability but formation of both synaptic myonuclei clusters and non-synaptic myonuclei organization in skeletal muscle was impaired (Zhang et al., 2007b).

Additionally, *SYNE1* polymorphism had been associated, using genome-wide association studies (GWAS) in depression, bipolar disorders and autism and recognized as a risk factor in schizophrenia (Green et al., 2013). Thanks to whole-exome sequencing experiments, a recurrent mutation in *SYNE1* (p.Leu3206Met) had been identified as a autism-spectrum disorder candidate gene with a recurrent mutation (Yu et al., 2013).

In musculoskeletal and cardiac diseases, *SYNE1* and *SYNE2* mutations had been associated with Autosomal-Dominant Emery-Dreifuss Muscular Dystrophy (AD-EDMD) and EDMD-like phenotypes (Zhang et al., 2007a; Koch and Holaska, 2014; Fanin et al., 2015). These myopathies are usually clinically associated with three main symptoms: (i) early contractures of elbows flexors, achilles' tendons and spine rigidity, (ii) slowly progressive muscle wasting and weakness (initiated at the humeroperoneal stage and diffuse impairment later), and (iii) cardiac misfunctionality characterized by an association of conduction defects and dilated cardiomyopathy (Koch and Holaska, 2014). Cardiac defects occur in late stages of diseases but become the main causes of EDMD patients mortality (Helbling-Leclerc et al., 2002). Mutations in *SYNE1* are also associated

with pure cardiac phenotype: dilated cardiomyopathy (DCM) with conduction system defects (Puckelwartz et al., 2010; Zhou et al., 2017). Mutations in *LMNA* and *EMD* occur in nearly 40% of EDMs (Bonne et al., 2003). Interestingly, mutations in associated partners of lamins and emerin such as nesprins-1/2 or SUN proteins have been also described in EDM and EDM-like phenotypes. In 2007, 190 patients suffering from EDM or EDM-like phenotypes without mutations in *LMNA* and *EMD* genes were analyzed regarding sequence of *SYNE1* and *SYNE2* genes. Six variants were identified, absent from control population and showing a segregation pattern compatible with an autosomal dominant inheritance (Zhang et al., 2007a). More than half of identified and characterized *SYNE1* and *SYNE2* mutants are located in the C-terminus part of full-length nesprins-1 and -2 (Zhang et al., 2007a; Attali et al., 2009; Puckelwartz et al., 2010; Taranum et al., 2012; Fanin et al., 2015; Baumann et al., 2016; Holt et al., 2016; Chen et al., 2017; Haskell et al., 2017; Wu et al., 2017; Zhou et al., 2017). In those contexts, abnormalities in nuclear morphology are frequently observed in mutated cells (commonly fibroblasts or lymphoblasts) such as altered nuclear shape, micronuclei or fragmented nuclei (Zhang et al., 2007a; Haskell et al., 2017). These observations are frequently associated with mislocalization of LINC complex components or interactors such as lamins A/C, SUN 1/2 proteins or kinesin light chain KLC-1/2, bridging cargoes to heavy chain kinesin such as Kif5b and thus to microtubules network (Zhang et al., 2007a; Chen et al., 2017; Zhou et al., 2017). Moreover, impaired fusion between myoblasts in the time course of differentiation process had been described using C2C12 cells infected with DCM-associated nesprin-1 mutations (Zhou et al., 2017). Finally, centralized myonuclei and increased variability in cross-sections area of myofibers (CSA) had been described in muscle biopsies from EDM patients (Fanin et al., 2015; Chen et al., 2017). Partial genotype-phenotype relationship could be highlighted with *SYNE1* and *SYNE2* mutations. Most mutations causing muscle phenotype are heterozygous missense located in the C-terminus part of full-length nesprin that also belongs to nesprin-1 α_2 , a muscle specific isoform (Zhou et al., 2017). Mutations affecting CNS development are located all along *SYNE1* gene (Synofzik et al., 2016). Most of them are non-sense mutations and induced premature termination codon resulting in truncated proteins or absence of nesprin-1/2 due to nonsense-mediated decay of the mutant mRNA (Zhou et al., 2018). *SYNE1* mutations are also involved in Arthrogryposis Multiplex Congenital (AMC) or simply arthrogryposis, a group of diseases with an overall prevalence of one in 3,000 live births, characterized by congenital joint contractures and reduced fetal movements (Baumann et al., 2016). Finally, some emerging role of nesprin-1 in the formation of striated F-actin-based filaments (Packard et al., 2015) or in *Drosophila*, in the control of glutamate receptors density, specifically at the neuromuscular junction (Morel et al., 2014) suggests that *SYNE1* mutations could be highlighted in other neuromuscular junction diseases.

Mutations in *LMNA* Gene

Laminopathies is the dedicated term to call a group of rare genetic disorders caused by mutations in genes encoding

proteins of the nuclear lamina: *LMNA*, coding for lamins A and C, and *LMNB1* and *LMNB2*, coding for lamins B. Laminopathies caused by *LMNA* mutations are initially defined on clinical criteria's and is mostly characterized by an autosomal dominant inheritance (Bertrand et al., 2011). Laminopathies include a group of diseases with a predominant skeletal muscle and/or heart involvement, such as the autosomal dominant form of EDM (EDMD-2 or AD-EDMD), the autosomal recessive form of EDM (EDMD-3), a dilated cardiomyopathy phenotype associated with conduction defects (DCM-CD), Congenital Muscular Dystrophy (L-CMD or *LMNA*-CMD) and Limb-Girdle Muscular Dystrophy 1B (LGMD1B) (Bönnemann et al., 2014). Laminopathies also include diseases with extra-muscular phenotypes such as Dunningan-type Familial Partial Lipodystrophy (FPLD), atypical Werner syndrome, Charcot-Marie-Tooth syndrome 2B1 (CMT2B1), and Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome (HGPS) (Shackleton et al., 2000; De Sandre-Giovannoli et al., 2002, 2003; Bonne and Levy, 2003; Bönnemann et al., 2014). Although other tissues are affected in these diseases, muscle and heart abnormalities are the most frequently observed (Janin et al., 2017).

Skeletal muscle laminopathies share common symptoms: joint contractures affecting predominately elbows (rigidity), ankles and neck and developing toward muscle weakness, life-threatening cardiac conduction defects and dilated cardiomyopathy (Lattanzi et al., 2011). EDMD2, DCM-CD, and L-CMD are overlapping each other and are now considered as a clinical continuum of an unique disease as three phenotypes could be caused by the same mutation and could exist in the same family by variable expressivity (Lattanzi et al., 2011; Janin et al., 2017; **Table 1**). In laminopathies, serum creatine kinase activity is usually normal or slightly increased (Mercuri et al., 2004). Electromyography and histological analysis usually show unspecific patterns, thus, muscle biopsy is not necessary for diagnosis of phenotype with typical clinical abnormalities (Menezes et al., 2012). Magnetic Resonance Imaging (MRI) of muscle could help differential diagnosis with other myopathies exhibiting fatty infiltration of medial gastrocnemius and vastus muscles in *LMNA*-related myopathies (also called *LMNA*-RD) (Carboni et al., 2010, 2013; Mercuri et al., 2010; Menezes et al., 2012).

The first described muscular phenotype related to *LMNA* mutations was EDMD-2, so called after the identification of EDMD-1 or X-linked EDM, a phenotype caused by mutation in *EMD* coding for emerin, a inner nuclear membrane protein (Bione et al., 1994). EDMD-2 is also clinically characterized by a triad of symptoms: (i) early elbows, ankles and neck contractures with muscle weakness and wasting affecting first the scapulo-humero-peroneal area, (ii) dilated cardiomyopathy, and (iii) heart conduction system defects with high risk of sudden cardiac death (Emery, 2000). Muscle weakness usually appears during the second decade of life, sometimes after contractures occur (Bonne et al., 2000). Main difference between EDMD2 and LGMD1B can be found in wasting and weakness distribution (Maggi et al., 2014). As its name suggests, muscle weakness in LGMD1B is predominant in scapular and pelvic girdle areas in early stages (Muchir et al., 2000). Later, differential diagnosis

TABLE 1 | Clinical and genetics comparison of *LMNA*-RD myopathies.

	EDMD-2	LGMD-1B	L-CMD
Age of onset	2nd to 3rd decade	3rd to 4th decade	Congenital onset
Muscular weakness	Scapulo-humero-peroneal distribution	Pelvic and scapular girdles	Axial (dropped head syndrome) or severe and diffuse
Contractures	+++ (elbow)	+	(spine, hips, knees, Achille tendons)
Heart abnormalities	Invariable with age, after skeletal muscle phenotype Conduction defects +/- dilated cardiomyopathy	Invariable with age	Cardiac conduction defects
Respiratory phenotype	Rare	Rare	Very frequent
Loss of independent ambulation	Rare	Rare	Very frequent
Axial involvement	Frequent	Rare	Frequent
Facial damages	Rare	Very rare	Very rare
Scoliosis	Frequent	Rare	Frequent
Type of most frequently observed <i>LMNA</i> mutations	Missense	Frameshift	Missense

EDMD, emery-dreifuss muscular dystrophy; *CMD*, congenital muscular dystrophy; *LGMD1B*, limb-girdle muscular dystrophy 1B.

between EDMD-2 and LGMD1B could be challenging with the progression of muscle weakness to the pelvic girdle in EDMD-2, which mimic LGMD1B phenotype. In these cases, identification of elbow contractures could support EDMD-2 diagnosis (Muchir et al., 2000).

LMNA-CMD phenotype had been described later: this diagnosis concerns children at birth or in their first two years of life (Quijano-Roy et al., 2008). Some of them display a severe congenital form with an absence of motor development. Most common phenotype is an axial muscle weakness with “dropped head syndrome” despite of a former normal acquisition of head carriage, a rigid spine and a scoliosis without locomotion loss (Quijano-Roy et al., 2008). Respiratory abnormalities are very frequent whereas cardiac features are rare, although sudden cardiac death could occur during the first ten years of life (Quijano-Roy et al., 2008). Analysis of an Italian cohort of *LMNA*-RD patients had confirmed cardiac involvement as it is the main feature in the natural history of patients phenotypes and cardiac follow-up is very important (Maggi et al., 2014). Usually, arrhythmia is the first cardiac symptom with electrocardiogram abnormalities such as low P-wave (atrial depolarization) or elongated PR-interval (period between onset of P-wave and ventricular depolarization) associated with rhythm abnormalities such as sinus bradycardia, sick sinus syndrome, bundle branch block or atrioventricular block or ectopic beats (Fatkin et al., 1999; Nigro et al., 2012). These symptoms appear mainly after the third decade of life (van Berlo et al., 2005).

MUTATIONS PATHOGENESIS HYPOTHESIS

Nesprins and lamins both localize at NE and are ubiquitously expressed. However, mutations in genes encoding those proteins are responsible of tissue-specific diseases. Thus, several non-exclusive hypotheses have been proposed to explain the physiopathological mechanisms underlying these described diseases (Figure 1C).

Structural Hypothesis

Structural hypothesis is based on “structural function” of the LINC complex and its ability to couple nucleus-skeleton with cytoskeleton and associated interactors such as molecular motors and microtubule-associated proteins (MAPs), microtubules and actin network. LINC complex impairments could modulate extracellular transmission forces balance to the nucleus and cells could suffer from this induced mechanical damages (Zhang et al., 2007a; Banerjee et al., 2014; Bertrand et al., 2014). Nesprins have been shown to play a crucial role in myonuclei positioning and migration in muscles. It has been shown in *Caenorhabditis elegans* (Starr and Fridolfsson, 2010), in *Drosophila melanogaster* (Yu et al., 2006) but also in higher organisms (Wilson and Holzbaur, 2015; Gimpel et al., 2017; Zhou et al., 2017) that mutated nesprins (or orthologues) are responsible for mislocated nuclei mediated by an impaired recruitment of different partners such as Akap450 or KLC-1/2.

Gene Regulation Hypothesis

Gene regulation hypothesis suggests that impaired LINC complex could alter interaction of NE proteins (mainly lamins) with the chromatin. Thus, mutations in genes encoding LINC complex proteins could alter in a tissue-specific manner transcription factors expression and/or alter expression pattern of tissue-specific genes (Dialynas et al., 2010). For example, such alterations are more and more described for laminopathies with the hyperactivation of the ERK (extracellular signal-regulated kinase) pathway in cardiomyopathy caused by *LMNA* mutations (Chatzifrangkeskou et al., 2018) or the overexpression of SMAD6, an inhibitor of the BMP signaling pathways, as a cause of accelerated myogenic differentiation of *LMNA* mutated cells (Janin et al., 2018).

Lamin A/C plays also a crucial role in euchromatin and heterochromatin distribution (Solovei et al., 2013) and in chromatin mobility restriction (Bronstein et al., 2015). This chromatin interaction pathway exhibits a cell-type specific and differentiation-dependent pattern (Rønningen et al., 2015). Overexpression of wild-type lamin A/C, or mutated lamins

related to progeroid syndromes (L647R) (Wang et al., 2016) or to FPLD and L-CMD (R388P) (Barateau et al., 2017) leads to different genes-lamins interactions patterns revealed using ChIP-seq analysis (Paulsen et al., 2017). These modifications are responsible for a more global three dimensional rearrangement of chromatin conformation (Oldenburg et al., 2014), associated with modification of epigenetic state of cells (Cesarini et al., 2015) and thus as a direct modification in gene expressions as it has been shown in FPLD-causing *LMNA* mutation R482W (Stierlé et al., 2003; Vadrot et al., 2015; Oldenburg et al., 2017).

Evidences support the epigenetic signature modifications hypothesis in cells. First, in patients suffering from HGPS, fibroblasts level of H3K27me3, a histone methylation often associated with the downregulation of nearby genes, is reduced and caused by a decrease level of the H3K27 methyltransferase of the PRC2 complex, called EZH2 (Shumaker et al., 2006). Interestingly, PRC2 complex regulates expression of *P16/INK4A* and *P21*, two tumor suppressors genes (Tzatsos et al., 2011), potentially filling the blank in understanding premature senescence observed in laminopathies (Guénantini et al., 2014). Finally, EZH2 plays a crucial role in the regulation of muscle gene expression and skeletal muscle differentiation (Caretto et al., 2004) and requires a functional lamin A/C network (Cesarini et al., 2015). These findings help to better understand how a ubiquitously expressed mutated protein could lead to tissue-specific phenotypes.

CONCLUSION

The NE not only isolates genetic material from the rest of the cell, but also plays a crucial role in mechanotransduction signaling through the LINC complex that builds a bridge between cytoskeleton and nucleoskeleton. Moreover, interactions between chromatin, inner nuclear membrane and nuclear lamina are important to regulate gene expression. Thus, NE is recognized as a central complex organizing communication between genome and cytoskeleton, and most importantly as a key factor to mediate appropriate responses regarding external mechanical forces applied on cells.

REFERENCES

- Algahtani, H., Marzouk, Y., Algahtani, R., Salman, S., and Shirah, B. (2017). Autosomal recessive cerebellar Ataxia type 1 mimicking multiple sclerosis: a report of two siblings with a novel mutation in SYNE1 gene in a Saudi family. *J. Neurol. Sci.* 372, 97–100. doi: 10.1016/j.jns.2016.11.036
- Arimura, T., Helbling-Leclerc, A., Massart, C., Varnous, S., Niel, F., Lacène, E., et al. (2005). Mouse model carrying H222P-Lmna mutation develops muscular dystrophy and dilated cardiomyopathy similar to human striated muscle laminopathies. *Hum. Mol. Genet.* 14, 155–169. doi: 10.1093/hmg/ddi017
- Attali, R., Warwar, N., Israel, A., Gurt, I., McNally, E., Puckelwartz, M., et al. (2009). Mutation of SYNE-1, encoding an essential component of the nuclear lamina, is responsible for autosomal recessive arthrogyposis. *Hum. Mol. Genet.* 18, 3462–3469. doi: 10.1093/hmg/ddp290

In the past decade, LINC complex components and interactors have been identified either covering inner surface of the nucleus, or located directly inside inner or outer nuclear membrane. In parallel, mutations in genes encoding NE components have been associated with rare human diseases affecting numerous different tissues; from them, nesprin- and lamin-associated muscular diseases have emerged. Despite databases and large-scale studies recapitulating plenty of mutations, no clear correlation between a given genotype and its affected tissues or disease has been established. For example, *LMNA* mutations can lead to diseases affecting peripheral nerve, adipose tissue, skeletal muscle or heart, making the molecular diagnosis of envelopopathies particularly challenging. At the same time, our progressive knowledge of nesprins and lamins roles at the NE, in the LINC complex organization, in regulation of gene expression, especially during myogenesis allows a better understanding of physiopathological mechanisms beneath described muscular and cardiac phenotypes. A complete understanding of different nesprins isoforms functions associated with an overview of proteins interacting network of lamins and nesprins is currently lacking.

Extensive use of Next Generation Sequencing (NGS) tools and of Whole Genome and Exome Sequencing (WGS and WES) in diagnosis laboratories will improve this discovery process. These tools, associated with the democratization of induced pluripotent stem cells (hiPSC) derived from affected patients or from healthy donor coupled with CRISPR-Cas9 technology in research laboratories, will also help to decipher the pathophysiological mechanisms underlying rare diseases without molecular explanation. Finally, taken together, these findings enable development of potential personalized therapeutic targets.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

All authors wrote, read, and approved the manuscript.

FUNDING

This work was supported by Hospices Civils de Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, INSERM, and MyoNeurAlp Alliance.

- Autore, F., Pfühl, M., Quan, X., Williams, A., Roberts, R. G., Shanahan, C. M., et al. (2013). Large-scale modelling of the divergent spectrin repeats in nesprins: giant modular proteins. *PLoS One* 8:e63633. doi: 10.1371/journal.pone.0063633
- Balza, R. O., and Misra, R. P. (2006). Role of the serum response factor in regulating contractile apparatus gene expression and sarcomeric integrity in cardiomyocytes. *J. Biol. Chem.* 281, 6498–6510. doi: 10.1074/jbc.M509487200
- Banerjee, I., Zhang, J., Moore-Morris, T., Pfeiffer, E., Buchholz, K. S., Liu, A., et al. (2014). Targeted ablation of nesprin 1 and nesprin 2 from murine myocardium results in cardiomyopathy, altered nuclear morphology and inhibition of the biomechanical gene response. *PLoS Genet.* 10:e1004114. doi: 10.1371/journal.pgen.1004114
- Barateau, A., Vadrot, N., Vicart, P., Ferreira, A., Mayer, M., Héron, D., et al. (2017). A novel lamin A mutant responsible for congenital muscular dystrophy causes distinct abnormalities of the cell nucleus. *PLoS One* 12:e0169189. doi: 10.1371/journal.pone.0169189

- Baumann, M., Steichen-Gersdorf, E., Krabichler, B., Petersen, B.-S., Weber, U., Schmidt, W. M., et al. (2016). Homozygous SYNE1 mutation causes congenital onset of muscular weakness with distal arthrogryposis: a genotype-phenotype correlation. *Eur. J. Hum. Genet.* 25, 262–266. doi: 10.1038/ejhg.2016.144
- Behrens, T. W., Jagadeesh, J., Scherle, P., Kearns, G., Yewdell, J., and Staudt, L. M. (1994). Jaw1, A lymphoid-restricted membrane protein localized to the endoplasmic reticulum. *J. Immunol. Baltim. Med.* 150, 682–690.
- Bertrand, A. T., Chikhaoui, K., Yaou, R. B., and Bonne, G. (2011). Clinical and genetic heterogeneity in laminopathies. *Biochem. Soc. Trans.* 39, 1687–1692. doi: 10.1042/BST20110670
- Bertrand, A. T., Ziaei, S., Ehret, C., Duchemin, H., Mamchaoui, K., Bigot, A., et al. (2014). Cellular microenvironments reveal defective mechanosensing responses and elevated YAP signaling in LMNA-mutated muscle precursors. *J. Cell Sci.* 127, 2873–2884. doi: 10.1242/jcs.144907
- Bione, S., Maestrini, E., Rivella, S., Mancini, M., Regis, S., Romeo, G., et al. (1994). Identification of a novel X-linked gene responsible for emery-dreifuss muscular dystrophy. *Nat. Genet.* 8, 323–327. doi: 10.1038/ng1294-323
- Bonne, G., and Levy, N. (2003). LMNA mutations in atypical Werner's syndrome. *Lancet* 362, 1585–1586; author reply 1586. doi: 10.1016/S0140-6736(03)14761-7
- Bonne, G., Mercuri, E., Muchir, A., Urtizberea, A., Bécane, H. M., Recan, D., et al. (2000). Clinical and molecular genetic spectrum of autosomal dominant emery-dreifuss muscular dystrophy due to mutations of the lamin A/C gene. *Ann. Neurol.* 48, 170–180. doi: 10.1002/1531-8249(200008)48:2<170::AID-ANA6>3.0.CO;2-J
- Bonne, G., Yaou, R. B., Bérout, C., Boriani, G., Brown, S., de Visser, M., et al. (2003). 108th ENMC international workshop, 3rd workshop of the MYO-CLUSTER project: EUROMEN, 7th international emery-dreifuss muscular dystrophy (EDMD) workshop, 13–15 september 2002, naarden, the Netherlands. *Neuromuscul. Disord.* 13, 508–515. doi: 10.1016/S0960-8966(03)00063-4
- Bönnemann, C. G., Wang, C. H., Quijano-Roy, S., Deconinck, N., Bertini, E., Ferreiro, A., et al. (2014). Diagnostic approach to the congenital muscular dystrophies. *Neuromuscul. Disord.* 24, 289–311. doi: 10.1016/j.nmd.2013.1.2011
- Bronstein, I., Kepten, E., Kanter, I., Berezin, S., Lindner, M., Redwood, A. B., et al. (2015). Loss of lamin A function increases chromatin dynamics in the nuclear interior. *Nat. Commun.* 6, 8044. doi: 10.1038/ncomms9044
- Bruston, F., Delbarre, E., Ostlund, C., Worman, H. J., Buendia, B., and Duband-Goulet, I. (2010). Loss of a DNA binding site within the tail of prelamin A contributes to altered heterochromatin anchorage by progerin. *FEBS Lett.* 584, 2999–3004. doi: 10.1016/j.febslet.2010.05.032
- Burke, B. (1990). On the cell-free association of lamins A and C with metaphase chromosomes. *Exp. Cell Res.* 186, 169–176. doi: 10.1016/0014-4827(90)90223-W
- Carboni, N., Mattedu, A., Marrosu, G., Cocco, E., and Marrosu, M. G. (2013). Genetic and clinical characteristics of skeletal and cardiac muscle in patients with lamin A/C gene mutations. *Muscle Nerve* 48, 161–170. doi: 10.1002/mus.23827
- Carboni, N., Mura, M., Marrosu, G., Cocco, E., Marini, S., Solla, E., et al. (2010). Muscle imaging analogies in a cohort of patients with different clinical phenotypes caused by LMNA gene mutations. *Muscle Nerve* 41, 458–463. doi: 10.1002/mus.21514
- Caretto, G., Di Padova, M., Micales, B., Lyons, G. E., and Sartorelli, V. (2004). The polycomb Ezh2 methyltransferase regulates muscle gene expression and skeletal muscle differentiation. *Genes Dev.* 18, 2627–2638. doi: 10.1101/gad.1241904
- Carmosino, M., Torretta, S., Procinio, G., Gerbino, A., Forleo, C., Favale, S., et al. (2014). Role of nuclear lamin A/C in cardiomyocyte functions. *Biol. Cell* 106, 346–358. doi: 10.1111/boc.201400033
- Cartwright, S., and Karakesisoglou, I. (2014). Nesprins in health and disease. *Semin. Cell Dev. Biol.* 29, 169–179. doi: 10.1016/j.semdb.2013.12.010
- Cesarini, E., Mozzetta, C., Marullo, F., Gregoretti, F., Gargiulo, A., Columbaro, M., et al. (2015). Lamin A/C sustains PcG protein architecture, maintaining transcriptional repression at target genes. *J. Cell Biol.* 211, 533–551. doi: 10.1083/jcb.201504035
- Chal, J., and Pourquie, O. (2017). Making muscle: skeletal myogenesis in vivo and in vitro. *Development* 144, 2104–2122. doi: 10.1242/dev.151035
- Chang, W., Antoku, S., Östlund, C., Worman, H. J., and Gundersen, G. G. (2015). Linker of nucleoskeleton and cytoskeleton (LINC) complex-mediated actin-dependent nuclear positioning orients centrosomes in migrating myoblasts. *Nucleus* 6, 77–88. doi: 10.1080/19491034.2015.1004947
- Chatzifrangkeskou, M., Yadin, D., Marais, T., Chardonnet, S., Cohen-Tannoudji, M., Mougenot, N., et al. (2018). Cofilin-1 phosphorylation catalyzed by ERK1/2 alters cardiac actin dynamics in dilated cardiomyopathy caused by lamin A/C gene mutation. *Hum. Mol. Genet.* 27, 3060–3078. doi: 10.1093/hmg/ddy215
- Chen, Z., Ren, Z., Mei, W., Ma, Q., Shi, Y., Zhang, Y., et al. (2017). A novel SYNE1 gene mutation in a Chinese family of emery-dreifuss muscular dystrophy-like. *BMC Med. Genetics* 18:63. doi: 10.1186/s12881-017-0424-5
- Choi, J. C., Muchir, A., Wu, W., Iwata, S., Homma, S., Morrow, J. P., et al. (2012). Temsirolimus activates autophagy and ameliorates cardiomyopathy caused by lamin A/C gene mutation. *Sci. Transl. Med.* 4:144ra102. doi: 10.1126/scitranslmed.3003875
- Cohen, T. V., Gnocchi, V. F., Cohen, J. E., Phadke, A., Liu, H., Ellis, J. A., et al. (2013). Defective skeletal muscle growth in lamin A/C-deficient mice is rescued by loss of Lap2a. *Hum. Mol. Genet.* 22, 2852–2869. doi: 10.1093/hmg/ddt135
- Crisp, M., Liu, Q., Roux, K., Rattner, J. B., Shanahan, C., Burke, B., et al. (2006). Coupling of the nucleus and cytoplasm: role of the LINC complex. *J. Cell Biol.* 172, 41–53. doi: 10.1083/jcb.200509124
- De Sandre-Giovannoli, A., Bernard, R., Cau, P., Navarro, C., Amiel, J., Boccaccio, I., et al. (2003). Lamin A truncation in hutchinson-gilford progeria. *Science* 300:2055. doi: 10.1126/science.1084125
- De Sandre-Giovannoli, A., Chaouch, M., Kozlov, S., Vallat, J.-M., Tazir, M., Kassouri, N., et al. (2002). Homozygous defects in LMNA, encoding lamin A/C nuclear-envelope proteins, cause autosomal recessive axonal neuropathy in human (charcot-marie-tooth disorder type 2) and mouse. *Am. J. Hum. Genet.* 70, 726–736. doi: 10.1086/339274
- Dechat, T., Adam, S. A., Taimen, P., Shimi, T., and Goldman, R. D. (2010). Nuclear lamins. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2, a000547. doi: 10.1101/cshperspect.a000547
- Dechat, T., Pflieger, K., Sengupta, K., Shimi, T., Shumaker, D. K., Solimando, L., et al. (2008). Nuclear lamins: major factors in the structural organization and function of the nucleus and chromatin. *Genes Dev.* 22, 832–853. doi: 10.1101/gad.1652708
- Dialynas, G., Speese, S., Budnik, V., Geyer, P. K., and Wallrath, L. L. (2010). The role of drosophila lamin C in muscle function and gene expression. *Development* 137, 3067–3077. doi: 10.1242/dev.048231
- Dittmer, T. A., and Misteli, T. (2011). The lamin protein family. *Genome Biol.* 12:222. doi: 10.1186/gb-2011-12-5-222
- Duong, N. T., Morris, G. E., Lam, L. T., Zhang, Q., Sewry, C. A., Shanahan, C. M., et al. (2014). Nesprins: tissue-specific expression of epsilon and other short isoforms. *PLoS One* 9:e94380. doi: 10.1371/journal.pone.0094380
- Dupin, I., Sakamoto, Y., and Etienne-Manneville, S. (2011). Cytoplasmic intermediate filaments mediate actin-driven positioning of the nucleus. *J. Cell Sci.* 124, 865–872. doi: 10.1242/jcs.076356
- Dupré, N., Gros-Louis, F., Chrestian, N., Verreault, S., Brunet, D., de Verteuil, D., et al. (2007). Clinical and genetic study of autosomal recessive cerebellar ataxia type 1. *Ann. Neurol.* 62, 93–98. doi: 10.1002/ana.21143
- Emery, A. E. (2000). Emery-dreifuss muscular dystrophy - a 40 year retrospective. *Neuromuscul. Disord.* 10, 228–232. doi: 10.1016/S0960-8966(00)00105-X
- Fanin, M., Savarese, M., Nascimbeni, A. C., Di Fruscio, G., Pastorello, E., Tasca, E., et al. (2015). Dominant muscular dystrophy with a novel SYNE1 gene mutation: letter to the editor. *Muscle Nerve* 51, 145–147. doi: 10.1002/mus.24357
- Fatkin, D., MacRae, C., Sasaki, T., Wolff, M. R., Porcu, M., Frenneaux, M., et al. (1999). Missense mutations in the rod domain of the lamin A/C gene as causes of dilated cardiomyopathy and conduction-system disease. *N. Engl. J. Med.* 341, 1715–1724. doi: 10.1056/NEJM199912023412302
- Fisher, D. Z., Chaudhary, N., and Blobel, G. (1986). cDNA sequencing of nuclear lamins A and C reveals primary and secondary structural homology to intermediate filament proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83, 6450–6454. doi: 10.1073/pnas.83.17.6450
- Frock, R. L., Kudlow, B. A., Evans, A. M., Jameson, S. A., Hauschka, S. D., and Kennedy, B. K. (2006). Lamin A/C and emerin are critical for skeletal muscle satellite cell differentiation. *Genes Dev.* 20, 486–500. doi: 10.1101/gad.1364906

- Furukawa, K., Inagaki, H., and Hotta, Y. (1994). Identification and cloning of an mRNA coding for a germ cell-specific A-type lamin in mice. *Exp. Cell Res.* 212, 426–430. doi: 10.1006/excr.1994.1164
- Furukawa, K., Sugiyama, S., Osouda, S., Goto, H., Inagaki, M., Horigome, T., et al. (2003). Barrier-to-autointegration factor plays crucial roles in cell cycle progression and nuclear organization in *Drosophila*. *J. Cell Sci.* 116, 3811–3823. doi: 10.1242/jcs.00682
- Gache, V., Gomes, E. R., and Cadot, B. (2017). Microtubule motors involved in nuclear movement during skeletal muscle differentiation. *Mol. Biol. Cell.* 28, 865–874. doi: 10.1091/mbc.E16-06-0405
- Gao, F., Yi, Q.-J., Tian, Y.-J., Wang, F.-J., and Liu, G.-X. (2012). Effect of nesprin-1 in the differentiation of mouse embryonic stem cells into cardiomyocytes. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 43, 161–165.
- Gerace, L., and Tapia, O. (2018). Messages from the voices within: regulation of signaling by proteins of the nuclear lamina. *Curr. Opin. Cell Biol.* 52, 14–21. doi: 10.1016/j.ccb.2017.12.009
- Gimpel, P., Lee, Y. L., Sobota, R. M., Calvi, A., Koullourou, V., Patel, R., et al. (2017). Nesprin-1 α -dependent microtubule nucleation from the nuclear envelope via Akap450 is necessary for nuclear positioning in muscle cells. *Curr. Biol.* 27, 2999.e9–3009.e9. doi: 10.1016/j.cub.2017.08.031
- Green, E. K., Grozeva, D., Forty, L., Gordon-Smith, K., Russell, E., Farmer, A., et al. (2013). Association at SYNE1 in both bipolar disorder and recurrent major depression. *Mol. Psychiatry* 18, 614–617. doi: 10.1038/mp.2012.48
- Gros-Louis, F., Dupré, N., Dion, P., Fox, M. A., Laurent, S., Verreault, S., et al. (2007). Mutations in SYNE1 lead to a newly discovered form of autosomal recessive cerebellar ataxia. *Nat. Genet.* 39, 80–85. doi: 10.1038/ng1927
- Gruenbaum, Y., and Foisner, R. (2015). Lamins: nuclear intermediate filament proteins with fundamental functions in nuclear mechanics and genome regulation. *Annu. Rev. Biochem.* 84, 131–164. doi: 10.1146/annurev-biochem-060614-034115
- Guénant, A. C., Briand, N., Bidault, G., Afonso, P., Bérézat, V., Vatie, C., et al. (2014). Nuclear envelope-related lipodystrophies. *Semin. Cell Dev. Biol.* 29, 148–157. doi: 10.1016/j.semdcb.2013.12.015
- Gundersen, G. G., and Worman, H. J. (2013). Nuclear positioning. *Cell* 152, 1376–1389. doi: 10.1016/j.cell.2013.02.031
- Haque, F., Lloyd, D. J., Smallwood, D. T., Dent, C. L., Shanahan, C. M., Fry, A. M., et al. (2006). SUN1 interacts with nuclear lamin A and cytoplasmic nesprins to provide a physical connection between the nuclear lamina and the cytoskeleton. *Mol. Cell Biol.* 26, 3738–3751. doi: 10.1128/MCB.26.10.3738-3751.2006
- Haskell, G. T., Jensen, B. C., Samsa, L. A., Marchuk, D., Huang, W., Skrzynia, C., et al. (2017). Whole exome sequencing identifies truncating variants in nuclear envelope genes in patients with cardiovascular disease clinical perspective. *Circ. Cardiovasc. Genet.* 10:e001443. doi: 10.1161/CIRCGENETICS.116.001443
- Helbling-Leclerc, A., Bonne, G., and Schwartz, K. (2002). Emery-dreifuss muscular dystrophy. *Eur. J. Hum. Genet.* 10, 157–161. doi: 10.1038/sj.ejhg.5200744
- Herrmann, H., and Aebi, U. (2016). Intermediate filaments: structure and assembly. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 8:a018242. doi: 10.1101/cshperspect.a018242
- Herrmann, H., Bär, H., Kreplak, L., Strelkov, S. V., and Aebi, U. (2007). Intermediate filaments: from cell architecture to nanomechanics. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 562–573. doi: 10.1038/nrm2197
- Ho, C. Y., Jaalouk, D. E., Vartiainen, M. K., and Lammerding, J. (2013). Lamin A/C and emerin regulate MKL1-SRF activity by modulating actin dynamics. *Nature* 497, 507–511. doi: 10.1038/nature12105
- Holt, I., Duong, N. T., Zhang, Q., Lam, L. T., Sewry, C. A., Mamchaoui, K., et al. (2016). Specific localization of nesprin-1 α 2, the short isoform of nesprin-1 with a KASH domain, in developing, fetal and regenerating muscle, using a new monoclonal antibody. *BMC Cell Biol.* 17:26. doi: 10.1186/s12860-016-0105-9
- Horn, H. F., Brownstein, Z., Lenz, D. R., Shivatzki, S., Dror, A. A., Dagan-Rosenfeld, O., et al. (2013). The LINC complex is essential for hearing. *J. Clin. Invest.* 123, 740–750. doi: 10.1172/JCI66911
- Izumi, Y., Miyamoto, R., Morino, H., Yoshizawa, A., Nishinaka, K., Uda, F., et al. (2013). Cerebellar ataxia with SYNE1 mutation accompanying motor neuron disease. *Neurology* 80, 600–601. doi: 10.1212/WNL.0b013e3182815529
- Jamin, A., and Wiebe, M. S. (2015). Barrier to autointegration factor (BANF1): interwoven roles in nuclear structure, genome integrity, innate immunity, stress responses and progeria. *Curr. Opin. Cell Biol.* 34, 61–68. doi: 10.1016/j.ccb.2015.05.006
- Janin, A., Bauer, D., Ratti, F., Millat, G., and Méjat, A. (2017). Nuclear envelopopathies: a complex LINC between nuclear envelope and pathology. *Orphanet J. Rare Dis.* 12:147. doi: 10.1186/s13023-017-0698-x
- Janin, A., Bauer, D., Ratti, F., Valla, C., Bertrand, A., Christin, E., et al. (2018). SMAD6 overexpression leads to accelerated myogenic differentiation of LMNA mutated cells. *Sci. Rep.* 8:5618. doi: 10.1038/s41598-018-23918-x
- Ketema, M., Kreft, M., Secades, P., Janssen, H., and Sonnenberg, A. (2013). Nesprin-3 connects plectin and vimentin to the nuclear envelope of Sertoli cells but is not required for Sertoli cell function in spermatogenesis. *Mol. Biol. Cell* 24, 2454–2466. doi: 10.1091/mbc.e13-02-0100
- Ketema, M., Wilhelmssen, K., Kuikman, I., Janssen, H., Hodzic, D., and Sonnenberg, A. (2007). Requirements for the localization of nesprin-3 at the nuclear envelope and its interaction with plectin. *J. Cell Sci.* 120, 3384–3394. doi: 10.1242/jcs.014191
- Kirby, T. J., and Lammerding, J. (2018). Emerging views of the nucleus as a cellular mechanosensor. *Nat. Cell Biol.* 20, 373–381. doi: 10.1038/s41556-018-0038-y
- Koch, A. J., and Holaska, J. M. (2014). Emerin in health and disease. *Semin. Cell Dev. Biol.* 29, 95–106. doi: 10.1016/j.semdcb.2013.12.008
- Lattanzi, G., Benedetti, S., Bertini, E., Boriani, G., Mazzanti, L., Novelli, G., et al. (2011). Laminopathies: many diseases, one gene. Report of the first Italian meeting course on laminopathies. *Acta Myol.* 30, 138–143.
- Lindskog, C., Linné, J., Fagerberg, L., Hallström, B. M., Sundberg, C. J., Lindholm, M., et al. (2015). The human cardiac and skeletal muscle proteomes defined by transcriptomics and antibody-based profiling. *BMC Genomics* 16:475. doi: 10.1186/s12864-015-1686-y
- Lombardi, M. L., and Lammerding, J. (2011). Keeping the LINC: the importance of nucleocytoplasmic coupling in intracellular force transmission and cellular function. *Biochem. Soc. Trans.* 39, 1729–1734. doi: 10.1042/BST20110686
- Lu, D., Lian, H., Zhang, X., Shao, H., Huang, L., Qin, C., et al. (2010). LMNA E82K mutation activates FAS and mitochondrial pathways of apoptosis in heart tissue specific transgenic mice. *PLoS One* 5:e15167. doi: 10.1371/journal.pone.0015167
- Maggi, L., D'Amico, A., Pini, A., Sivo, S., Pane, M., Ricci, G., et al. (2014). LMNA-associated myopathies: the Italian experience in a large cohort of patients. *Neurology* 83, 1634–1644. doi: 10.1212/WNL.0000000000000934
- McKeon, F. D., Kirschner, M. W., and Caput, D. (1986). Homologies in both primary and secondary structure between nuclear envelope and intermediate filament proteins. *Nature* 319, 463–468. doi: 10.1038/319463a0
- Mellad, J. A., Warren, D. T., and Shanahan, C. M. (2011). Nesprins LINC the nucleus and cytoskeleton. *Curr. Opin. Cell Biol.* 23, 47–54. doi: 10.1016/j.ccb.2010.11.006
- Menezes, M. P., Waddell, L. B., Evesson, F. J., Cooper, S., Webster, R., Jones, K., et al. (2012). Importance and challenge of making an early diagnosis in LMNA-related muscular dystrophy. *Neurology* 78, 1258–1263. doi: 10.1212/WNL.0b013e318250d839
- Mercuri, E., Clements, E., Offiah, A., Pichiechio, A., Vasco, G., Bianco, F., et al. (2010). Muscle magnetic resonance imaging involvement in muscular dystrophies with rigidity of the spine. *Ann. Neurol.* 67, 201–208. doi: 10.1002/ana.21846
- Mercuri, E., Poppe, M., Quinlivan, R., Messina, S., Kinali, M., Demay, L., 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. *Arch. Neurol.* 61, 690–694. doi: 10.1001/archneur.61.5.690
- Metzger, T., Gache, V., Xu, M., Cadot, B., Folker, E. S., Richardson, B. E., et al. (2012). MAP and kinesin-dependent nuclear positioning is required for skeletal muscle function. *Nature* 484, 120–124. doi: 10.1038/nature10914
- Mislow, J. M. K., Holaska, J. M., Kim, M. S., Lee, K. K., Segura-Totten, M., Wilson, K. L., et al. (2002). Nesprin-1 α self-associates and binds directly to emerin and lamin A in vitro. *FEBS Lett.* 525, 135–140. doi: 10.1016/S0014-5793(02)03105-8
- Morel, V., Lepicard, S., Rey, A. N., Parmentier, M.-L., and Schaeffer, L. (2014). *Drosophila* nesprin-1 controls glutamate receptor density at neuromuscular junctions. *Cell. Mol. Life Sci.* 71, 3363–3379. doi: 10.1007/s00018-014-1566-7
- Muchir, A., Bonne, G., van der Kooij, A. J., van Meegen, M., Baas, F., Bolhuis, P. A., et al. (2000). Identification of mutations in the gene encoding lamins A/C in autosomal dominant limb girdle muscular dystrophy with atrioventricular conduction disturbances (LGMD1B). *Hum. Mol. Genet.* 9, 1453–1459. doi: 10.1093/hmg/9.9.1453

- Muchir, A., Pavlidis, P., Decostre, V., Herron, A. J., Arimura, T., Bonne, G., et al. (2007). Activation of MAPK pathways links LMNA mutations to cardiomyopathy in emery-dreifuss muscular dystrophy. *J. Clin. Invest.* 117, 1282–1293. doi: 10.1172/JCI29042
- Nigro, G., Russo, V., Rago, A., Papa, A. A., Carbone, N., Marchel, M., et al. (2012). Regional and transmural dispersion of repolarisation in patients with emery-dreifuss muscular dystrophy. *Kardiol. Pol.* 70, 1154–1159.
- Noreau, A., Bourassa, C. V., Szuto, A., Levert, A., Dobrzyniecka, S., Gauthier, J., et al. (2013). SYNE1 mutations in autosomal recessive cerebellar ataxia. *JAMA Neurol.* 70, 1296–1301. doi: 10.1001/jamaneurol.2013.3268
- Oldenburg, A., Briand, N., Sørensen, A. L., Cahyani, I., Shah, A., Moskaug, J. O., et al. (2017). A lipodystrophy-causing lamin A mutant alters conformation and epigenetic regulation of the anti-adipogenic MIR335 locus. *J. Cell Biol.* 216, 2731–2743. doi: 10.1083/jcb.201701043
- 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. doi: 10.1093/hmg/ddt509
- Osorio, D. S., and Gomes, E. R. (2013). The contemporary nucleus: a trip down memory lane. *Biol. Cell* 105, 430–441. doi: 10.1111/boc.201300009
- Packard, M., Jokhi, V., Ding, B., Ruiz-Cañada, C., Ashley, J., and Budnik, V. (2015). Nucleus to synapse nesprin1 railroad tracks direct synapse maturation through RNA localization. *Neuron* 86, 1015–1028. doi: 10.1016/j.neuron.2015.04.006
- Padmakumar, V., Abraham, S., Braune, S., Noegel, A. A., Tunggal, B., Karakesisoglou, I., et al. (2004). Enaptin, a giant actin-binding protein, is an element of the nuclear membrane and the actin cytoskeleton. *Exp. Cell Res.* 295, 330–339. doi: 10.1016/j.yexcr.2004.01.014
- Padmakumar, V. C., Libotte, T., Lu, W., Zaim, H., Abraham, S., Noegel, A. A., et al. (2005). The inner nuclear membrane protein Sun1 mediates the anchorage of Nesprin-2 to the nuclear envelope. *J. Cell Sci.* 118, 3419–3430. doi: 10.1242/jcs.02471
- Paulsen, J., Sekelja, M., Oldenburg, A. R., Barateau, A., Briand, N., Delbarre, E., et al. (2017). Chrom3D: three-dimensional genome modeling from Hi-C and nuclear lamin-genome contacts. *Genome Biol.* 18:21. doi: 10.1186/s13059-016-1146-2
- Peter, M., Kitten, G. T., Lehner, C. F., Vorburger, K., Bailer, S. M., Maridor, G., et al. (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. *J. Mol. Biol.* 208, 393–404. doi: 10.1016/0022-2836(89)90504-4
- Puckelwartz, M. J., Kessler, E., Zhang, Y., Hodzic, D., Randles, K. N., Morris, G., et al. (2009). Disruption of nesprin-1 produces an emery dreifuss muscular dystrophy-like phenotype in mice. *Hum. Mol. Genet.* 18, 607–620. doi: 10.1093/hmg/ddn386
- Puckelwartz, M. J., Kessler, E. J., Kim, G., Dewitt, M. M., Zhang, Y., Earley, J. U., et al. (2010). Nesprin-1 mutations in human and murine cardiomyopathy. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 48, 600–608. doi: 10.1016/j.yjmcc.2009.11.006
- Quijano-Roy, S., Mbieleu, B., Bönemann, C. G., Jeannet, P.-Y., Colomer, J., Clarke, N. F., et al. (2008). De novo LMNA mutations cause a new form of congenital muscular dystrophy. *Ann. Neurol.* 64, 177–186. doi: 10.1002/ana.21417
- Rajgor, D., Mellad, J. A., Autore, F., Zhang, Q., and Shanahan, C. M. (2012). Multiple novel nesprin-1 and nesprin-2 variants act as versatile tissue-specific intracellular scaffolds. *PLoS One* 7:e40098. doi: 10.1371/journal.pone.0040098
- Rajgor, D., and Shanahan, C. M. (2013). Nesprins: from the nuclear envelope and beyond. *Expert Rev. Mol. Med.* 15:e5. doi: 10.1017/erm.2013.6
- Ramos, F. J., Chen, S. C., Garelick, M. G., Dai, D.-F., Liao, C.-Y., Schreiber, K. H., et al. (2012). Rapamycin reverses elevated mTORC1 signaling in lamin A/C-deficient mice, rescues cardiac and skeletal muscle function, and extends survival. *Sci. Transl. Med.* 4:144ra103. doi: 10.1126/scitranslmed.3003802
- Randles, K. N., Lam, L. T., Sewry, C. A., Puckelwartz, M., Furling, D., Wehnert, M., et al. (2010). Nesprins, but not sun proteins, switch isoforms at the nuclear envelope during muscle development. *Dev. Dyn.* 239, 998–1009. doi: 10.1002/dvdy.22229
- Razafsky, D., and Hodzic, D. (2015). A variant of Nesprin1 giant devoid of KASH domain underlies the molecular etiology of autosomal recessive cerebellar ataxia type I. *Neurobiol. Dis.* 78, 57–67. doi: 10.1016/j.nbd.2015.03.027
- Robson, M. L., de Las Heras, J. I., Czapiewski, R., Lê Thành, P., Booth, D. G., Kelly, D. A., et al. (2016). Tissue-specific gene repositioning by muscle nuclear membrane proteins enhances repression of critical developmental genes during myogenesis. *Mol. Cell* 62, 834–847. doi: 10.1016/j.molcel.2016.04.035
- Roman, W., Martins, J. P., Carvalho, F. A., Voituriez, R., Abella, J. V. G., Santos, N. C., et al. (2017). Myofibril contraction and crosslinking drive nuclear movement to the periphery of skeletal muscle. *Nat. Cell Biol.* 19, 1189–1201. doi: 10.1038/ncb3605
- Ronningen, T., Shah, A., Oldenburg, A. R., Vekterud, K., Delbarre, E., Moskaug, J. O., et al. (2015). Prepatterning of differentiation-driven nuclear lamin A/C-associated chromatin domains by GlcNAcylated histone H2B. *Genome Res.* 25, 1825–1835. doi: 10.1101/gr.193748.115
- Roux, K. J., Crisp, M. L., Liu, Q., Kim, D., Kozlov, S., Stewart, C. L., et al. (2009). Nesprin 4 is an outer nuclear membrane protein that can induce kinesin-mediated cell polarization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 2194–2199. doi: 10.1073/pnas.0808602106
- Sakaki, M., Koike, H., Takahashi, N., Sasagawa, N., Tomioka, S., Arahata, K., et al. (2001). Interaction between emerin and nuclear lamins. *J. Biochem.* 129, 321–327. doi: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a002860
- Sanger, J. W., Wang, J., Fan, Y., White, J., and Sanger, J. M. (2010). Assembly and dynamics of myofibrils. *J. Biomed. Biotechnol.* 2010:858606. doi: 10.1155/2010/858606
- Segura-Totten, M., and Wilson, K. L. (2004). BAF: roles in chromatin, nuclear structure and retrovirus integration. *Trends Cell Biol.* 14, 261–266. doi: 10.1016/j.tcb.2004.03.004
- Shackleton, S., Lloyd, D. J., Jackson, S. N., Evans, R., Niermeijer, M. F., Singh, B. M., et al. (2000). LMNA, encoding lamin A/C, is mutated in partial lipodystrophy. *Nat. Genet.* 24, 153–156. doi: 10.1038/72807
- Shindo, Y., Kim, M.-R., Miura, H., Yuuki, T., Kanda, T., Hino, A., et al. (2010). Lrmp/Jaw1 is expressed in sweet, bitter, and umami receptor-expressing cells. *Chem. Senses* 35, 171–177. doi: 10.1093/chemse/bjp097
- Shumaker, D. K., Dechat, T., Kohlmaier, A., Adam, S. A., Bozovsky, M. R., Erdos, M. R., et al. (2006). Mutant nuclear lamin A leads to progressive alterations of epigenetic control in premature aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 8703–8708. doi: 10.1073/pnas.0602569103
- Simpson, J. G., and Roberts, R. G. (2008). Patterns of evolutionary conservation in the nesprin genes highlight probable functionally important protein domains and isoforms. *Biochem. Soc. Trans.* 36, 1359–1367. doi: 10.1042/BST0361359
- Solovei, I., Wang, A. S., Thanisch, K., Schmidt, C. S., Krebs, S., Zwergner, M., et al. (2013). LBR and lamin A/C sequentially tether peripheral heterochromatin and inversely regulate differentiation. *Cell* 152, 584–598. doi: 10.1016/j.cell.2013.01.009
- Starr, D. A., and Fridolfsson, H. N. (2010). Interactions between nuclei and the cytoskeleton are mediated by SUN-KASH nuclear-envelope bridges. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 26, 421–444. doi: 10.1146/annurev-cellbio-100109-104037
- Staszewska, I., Fischer, I., and Wiche, G. (2015). Plectin isoform 1-dependent nuclear docking of desmin networks affects myonuclear architecture and expression of mechanotransducers. *Hum. Mol. Genet.* 24, 7373–7389. doi: 10.1093/hmg/ddv438
- Stewart, C. L., and Burke, B. (2014). The missing LINC: a mammalian KASH-domain protein coupling meiotic chromosomes to the cytoskeleton. *Nucleus* 5, 3–10. doi: 10.4161/nucl.27819
- Stierlé, V., Couprie, J., Ostlund, C., Krimm, I., Zinn-Justin, S., Hossenlopp, P., et al. (2003). The carboxyl-terminal region common to lamins A and C contains a DNA binding domain. *Biochemistry* 42, 4819–4828. doi: 10.1021/bi020704g
- Stroud, M. J., Banerjee, I., Veevers, J., and Chen, J. (2014). Linker of nucleoskeleton and cytoskeleton complex proteins in cardiac structure, function, and disease. *Circ. Res.* 114, 538–548. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.114.301236
- Stroud, M. J., Feng, W., Zhang, J., Veevers, J., Fang, X., Gerace, L., et al. (2017). Nesprin 1 α 2 is essential for mouse postnatal viability and nuclear positioning in skeletal muscle. *J. Cell Biol.* 216, 1915–1924. doi: 10.1083/jcb.201612128
- Stuurman, N., Heins, S., and Aebi, U. (1998). Nuclear lamins: their structure, assembly, and interactions. *J. Struct. Biol.* 122, 42–66. doi: 10.1006/jsbi.1998.3987
- Synofzik, M., Smets, K., Mallaret, M., Di Bella, D., Gallenmüller, C., Baets, J., et al. (2016). SYNE1 ataxia is a common recessive ataxia with major non-cerebellar features: a large multi-centre study. *Brain* 139, 1378–1393. doi: 10.1093/brain/aww079

- Tajik, A., Zhang, Y., Wei, F., Sun, J., Jia, Q., Zhou, W., et al. (2016). Transcription upregulation via force-induced direct stretching of chromatin. *Nat. Mater.* 15, 1287–1296. doi: 10.1038/nmat4729
- Tapley, E. C., and Starr, D. A. (2013). Connecting the nucleus to the cytoskeleton by SUN-KASH bridges across the nuclear envelope. *Curr. Opin. Cell Biol.* 25, 57–62. doi: 10.1016/j.cob.2012.10.014
- Taranum, S., Vaylann, E., Meinke, P., Abraham, S., Yang, L., Neumann, S., et al. (2012). LINC complex alterations in DMD and EDMD/CMT fibroblasts. *Eur. J. Cell Biol.* 91, 614–628. doi: 10.1016/j.ejcb.2012.03.003
- Tedesco, F. S., Dellavalle, A., Diaz-Manera, J., Messina, G., and Cossu, G. (2010). Repairing skeletal muscle: regenerative potential of skeletal muscle stem cells. *J. Clin. Invest.* 120, 11–19. doi: 10.1172/JCI40373
- Tzatsos, A., Paskaleva, P., Lymperi, S., Contino, G., Stoykova, S., Chen, Z., et al. (2011). Lysine-specific demethylase 2B (KDM2B)-let-7-enhancer of zester homolog 2 (EZH2) pathway regulates cell cycle progression and senescence in primary cells. *J. Biol. Chem.* 286, 33061–33069. doi: 10.1074/jbc.M111.257667
- Vadrot, N., Duband-Goulet, I., Cabet, E., Attanda, W., Barateau, A., Vicart, P., 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. doi: 10.1093/hmg/ddu728
- van Berlo, J. H., de Voegt, W. G., van der Kooij, A. J., van Tintelen, J. P., Bonne, G., Yaou, R. B., et al. (2005). Meta-analysis of clinical characteristics of 299 carriers of LMNA gene mutations: do lamin A/C mutations portend a high risk of sudden death? *J. Mol. Med.* 83, 79–83. doi: 10.1007/s00109-004-0589-1
- Vartiainen, M. K., Guettler, S., Larjani, B., and Treisman, R. (2007). Nuclear actin regulates dynamic subcellular localization and activity of the SRF cofactor MAL. *Science* 316, 1749–1752. doi: 10.1126/science.1141084
- Wang, S., Stoops, E., Cp, U., Markus, B., Reuveny, A., Ordan, E., et al. (2018). Mechanotransduction via the LINC complex regulates DNA replication in myonuclei. *J. Cell Biol.* 217, 2005–2018. doi: 10.1083/jcb.201708137
- Wang, Y., Lichter-Konecki, U., Anyane-Yeboah, K., Shaw, J. E., Lu, J. T., Östlund, C., et al. (2016). A mutation abolishing the ZMPSTE24 cleavage site in prelamin A causes a progeroid disorder. *J. Cell Sci.* 129, 1975–1980. doi: 10.1242/jcs.187302
- Wilhelmsen, K., Litjens, S. H. M., Kuikman, I., Tshimbalanga, N., Janssen, H., van den Bout, I., et al. (2005). Nesprin-3, a novel outer nuclear membrane protein, associates with the cytoskeletal linker protein plectin. *J. Cell Biol.* 171, 799–810. doi: 10.1083/jcb.200506083
- Wilson, M. H., and Holzbaun, E. L. F. (2015). Nesprins anchor kinesin-1 motors to the nucleus to drive nuclear distribution in muscle cells. *Dev. Camb. Engl.* 142, 218–228. doi: 10.1242/dev.114769
- Winter, L., Kuznetsov, A. V., Grimm, M., Zeöld, A., Fischer, I., and Wiche, G. (2015). Plectin isoform P1b and P1d deficiencies differentially affect mitochondrial morphology and function in skeletal muscle. *Hum. Mol. Genet.* 24, 4530–4544. doi: 10.1093/hmg/ddv184
- Wu, L., Xiang, B., Zhang, H., He, X., Shih, C., Chen, X., et al. (2017). Three novel recessive mutations in LAMA2, SYNE1, and TTN are identified in a single case with congenital muscular dystrophy. *Neuromuscul. Disord.* 27, 1018–1022. doi: 10.1016/j.nmd.2017.06.558
- Yang, L., Muncik, M., Swaminathan, K., Kapinos, L. E., Noegel, A. A., and Neumann, S. (2013). Mutations in LMNA modulate the lamin A - nesprin-2 interaction and cause LINC complex alterations. *PLoS One* 8:e71850. doi: 10.1371/journal.pone.0071850
- Yin, H., Price, F., and Rudnicki, M. A. (2013). Satellite cells and the muscle stem cell niche. *Physiol. Rev.* 93, 23–67. doi: 10.1152/physrev.00043.2011
- Yu, J., Starr, D. A., Wu, X., Parkhurst, S. M., Zhuang, Y., Xu, T., et al. (2006). The KASH domain protein MSP-300 plays an essential role in nuclear anchoring during drosophila oogenesis. *Dev. Biol.* 289, 336–345. doi: 10.1016/j.ydbio.2005.10.027
- Yu, T. W., Chahrouh, M. H., Coulter, M. E., Jiralerspong, S., Okamura-Ikeda, K., Ataman, B., et al. (2013). Using whole-exome sequencing to identify inherited causes of autism. *Neuron* 77, 259–273. doi: 10.1016/j.neuron.2012.11.002
- Yuan, J., Simos, G., Blobel, G., and Georgatos, S. D. (1991). Binding of lamin A to polynucleosomes. *J. Biol. Chem.* 266, 9211–9215.
- Zhang, J., Felder, A., Liu, Y., Guo, L. T., Lange, S., Dalton, N. D., et al. (2010). Nesprin 1 is critical for nuclear positioning and anchorage. *Hum. Mol. Genet.* 19, 329–341. doi: 10.1093/hmg/ddp499
- Zhang, Q. (2005). Nesprin-2 is a multi-isomeric protein that binds lamin and emerin at the nuclear envelope and forms a subcellular network in skeletal muscle. *J. Cell Sci.* 118, 673–687. doi: 10.1242/jcs.01642
- Zhang, Q., Bethmann, C., Worth, N. F., Davies, J. D., Wasner, C., Feuer, A., et al. (2007a). Nesprin-1 and -2 are involved in the pathogenesis of emery dreifuss muscular dystrophy and are critical for nuclear envelope integrity. *Hum. Mol. Genet.* 16, 2816–2833. doi: 10.1093/hmg/ddm238
- Zhang, Q., Skepper, J. N., Yang, F., Davies, J. D., Hegyi, L., Roberts, R. G., et al. (2001). Nesprins: a novel family of spectrin-repeat-containing proteins that localize to the nuclear membrane in multiple tissues. *J. Cell Sci.* 114, 4485–4498.
- Zhang, X., Xu, R., Zhu, B., Yang, X., Ding, X., Duan, S., et al. (2007b). Syne-1 and Syne-2 play crucial roles in myonuclear anchorage and motor neuron innervation. *Development* 134, 901–908. doi: 10.1242/dev.02783
- Zhong, Z., Chang, S. A., Kalinowski, A., Wilson, K. L., and Dahl, K. N. (2010). Stabilization of the spectrin-like domains of nesprin-1 α by the evolutionarily conserved "Adaptive" domain. *Cell. Mol. Bioeng.* 3, 139–150. doi: 10.1007/s12195-010-0121-3
- Zhou, C., Li, C., Zhou, B., Sun, H., Koullourou, V., Holt, I., et al. (2017). Novel nesprin-1 mutations associated with dilated cardiomyopathy cause nuclear envelope disruption and defects in myogenesis. *Hum. Mol. Genet.* 26, 2258–2276. doi: 10.1093/hmg/ddx116
- Zhou, C., Rao, L., Shanahan, C. M., and Zhang, Q. (2018). Nesprin-1/2: roles in nuclear envelope organisation, myogenesis and muscle disease. *Biochem. Soc. Trans.* 46, 311–320. doi: 10.1042/BST20170149

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

The reviewer JR and handling editor declared their shared affiliation at the time of the review.

Copyright © 2018 Janin and Gache. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

BIBLIOGRAPHIE

1. Frontera WR, Ochala J. Skeletal Muscle: A Brief Review of Structure and Function. *Calcif Tissue Int.* mars 2015;96(3):183-95.
2. Nedergaard A, Karsdal MA, Sun S, Henriksen K. Serological muscle loss biomarkers: an overview of current concepts and future possibilities. *J Cachexia Sarcopenia Muscle.* mars 2013;4(1):1-17.
3. Clark KA, McElhinny AS, Beckerle MC, Gregorio CC. Striated muscle cytoarchitecture: an intricate web of form and function. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2002;18:637-706.
4. Gilbert R, Kelly MG, Mikawa T, Fischman DA. The carboxyl terminus of myosin binding protein C (MyBP-C, C-protein) specifies incorporation into the A-band of striated muscle. *J Cell Sci.* janv 1996;109 (Pt 1):101-11.
5. Stelzer JE, Fitzsimons DP, Moss RL. Ablation of myosin-binding protein-C accelerates force development in mouse myocardium. *Biophys J.* 1 juin 2006;90(11):4119-27.
6. Vale RD, Milligan RA. The way things move: looking under the hood of molecular motor proteins. *Science.* 7 avr 2000;288(5463):88-95.
7. Mauro A. Satellite cell of skeletal muscle fibers. *J Biophys Biochem Cytol.* févr 1961;9:493-5.
8. Scharner J, Zammit PS. The muscle satellite cell at 50: the formative years. *Skelet Muscle.* 17 août 2011;1(1):28.
9. Spalding KL, Bhardwaj RD, Buchholz BA, Druid H, Frisén J. Retrospective birth dating of cells in humans. *Cell.* 15 juill 2005;122(1):133-43.
10. Moss FP, Leblond CP. Satellite cells as the source of nuclei in muscles of growing rats. *Anat Rec.* août 1971;170(4):421-35.
11. Schultz E, McCormick KM. Skeletal muscle satellite cells. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* 1994;123:213-57.
12. Charifi N, Kadi F, Féasson L, Denis C. Effects of endurance training on satellite cell frequency in skeletal muscle of old men. *Muscle Nerve.* juill 2003;28(1):87-92.
13. Maier F, Bornemann A. Comparison of the muscle fiber diameter and satellite cell frequency in human muscle biopsies. *Muscle Nerve.* mai 1999;22(5):578-83.
14. Watkins SC, Cullen MJ. A quantitative study of myonuclear and satellite cell nuclear size in Duchenne's muscular dystrophy, polymyositis and normal human skeletal muscle. *Anat Rec.* sept 1988;222(1):6-11.
15. Verdijk LB. Satellite cell activation as a critical step in skeletal muscle plasticity. *Exp Physiol.* nov 2014;99(11):1449-50.

16. Verdijk LB, Snijders T, Drost M, Delhaas T, Kadi F, van Loon LJC. Satellite cells in human skeletal muscle; from birth to old age. *Age Dordr Neth.* avr 2014;36(2):545-7.
17. Dhawan J, Rando TA. Stem cells in postnatal myogenesis: molecular mechanisms of satellite cell quiescence, activation and replenishment. *Trends Cell Biol.* déc 2005;15(12):666-73.
18. Lindström M, Thornell L-E. New multiple labelling method for improved satellite cell identification in human muscle: application to a cohort of power-lifters and sedentary men. *Histochem Cell Biol.* août 2009;132(2):141-57.
19. Yin H, Price F, Rudnicki MA. Satellite cells and the muscle stem cell niche. *Physiol Rev.* janv 2013;93(1):23-67.
20. Relaix F, Montarras D, Zaffran S, Gayraud-Morel B, Rocancourt D, Tajbakhsh S, et al. Pax3 and Pax7 have distinct and overlapping functions in adult muscle progenitor cells. *J Cell Biol.* 2 janv 2006;172(1):91-102.
21. Relaix F, Marcelle C. Muscle stem cells. *Curr Opin Cell Biol.* déc 2009;21(6):748-53.
22. Zammit PS, Golding JP, Nagata Y, Hudon V, Partridge TA, Beauchamp JR. Muscle satellite cells adopt divergent fates: a mechanism for self-renewal? *J Cell Biol.* 2 août 2004;166(3):347-57.
23. Zammit PS. All muscle satellite cells are equal, but are some more equal than others? *J Cell Sci.* 15 sept 2008;121(Pt 18):2975-82.
24. Mourikis P, Sambasivan R, Castel D, Rocheteau P, Bizzarro V, Tajbakhsh S. A critical requirement for notch signaling in maintenance of the quiescent skeletal muscle stem cell state. *Stem Cells Dayt Ohio.* févr 2012;30(2):243-52.
25. Fukada S. The roles of muscle stem cells in muscle injury, atrophy and hypertrophy. *J Biochem (Tokyo).* 1 mai 2018;163(5):353-8.
26. Hetzer MW. The nuclear envelope. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* mars 2010;2(3):a000539.
27. Dechat T, Pflieger K, Sengupta K, Shimi T, Shumaker DK, Solimando L, et al. Nuclear lamins: major factors in the structural organization and function of the nucleus and chromatin. *Genes Dev.* 1 avr 2008;22(7):832-53.
28. Puckelwartz MJ, Depreux FF, McNally EM. Gene expression, chromosome position and lamin A/C mutations. *Nucl Austin Tex.* juin 2011;2(3):162-7.
29. Kite GL. The relative permeability of the surface and interior portions of the cytoplasm of animal and plant cells : (a preliminary paper.). *Biol Bull.* 1 juin 1913;25(1):1-7.
30. Watson ML. The nuclear envelope; its structure and relation to cytoplasmic membranes. *J Biophys Biochem Cytol.* 25 mai 1955;1(3):257-70.
31. Janin A, Bauer D, Ratti F, Millat G, Méjat A. Nuclear envelopathies: a complex LINC between nuclear envelope and pathology. *Orphanet J Rare Dis.* 30 août 2017;12(1):147.

32. Watson ML. Further observations on the nuclear envelope of the animal cell. *J Biophys Biochem Cytol.* oct 1959;6:147-56.
33. Hetzer MW, Walther TC, Mattaj IW. Pushing the envelope: structure, function, and dynamics of the nuclear periphery. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2005;21:347-80.
34. Tapley EC, Starr DA. Connecting the nucleus to the cytoskeleton by SUN-KASH bridges across the nuclear envelope. *Curr Opin Cell Biol.* févr 2013;25(1):57-62.
35. Smoyer CJ, Katta SS, Gardner JM, Stoltz L, McCroskey S, Bradford WD, et al. Analysis of membrane proteins localizing to the inner nuclear envelope in living cells. *J Cell Biol.* 21 nov 2016;215(4):575-90.
36. Méjat A, Misteli T. LINC complexes in health and disease. *Nucleus.* févr 2010;1(1):40-52.
37. Janin A, Gache V. Nesprins and Lamins in Health and Diseases of Cardiac and Skeletal Muscles. *Front Physiol* [Internet]. 7 sept 2018 [cité 30 oct 2018];9. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fphys.2018.01277/full>
38. Pappas GD. The fine structure of the nuclear envelope of *Amoeba proteus*. *J Biophys Biochem Cytol.* 25 juill 1956;2(4 Suppl):431-4.
39. Fawcett DW. On the occurrence of a fibrous lamina on the inner aspect of the nuclear envelope in certain cells of vertebrates. *Am J Anat.* juill 1966;119(1):129-45.
40. McKeon FD, Kirschner MW, Caput D. Homologies in both primary and secondary structure between nuclear envelope and intermediate filament proteins. *Nature.* 6 févr 1986;319(6053):463-8.
41. Fisher DZ, Chaudhary N, Blobel G. cDNA sequencing of nuclear lamins A and C reveals primary and secondary structural homology to intermediate filament proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* sept 1986;83(17):6450-4.
42. Peter M, Kitten GT, Lehner CF, Vorbürger K, Bailer SM, Maridor G, et al. 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. *J Mol Biol.* 5 août 1989;208(3):393-404.
43. Parry DAD, Strelkov SV, Burkhard P, Aebi U, Herrmann H. Towards a molecular description of intermediate filament structure and assembly. *Exp Cell Res.* 10 juin 2007;313(10):2204-16.
44. Wydner KL, McNeil JA, Lin F, Worman HJ, Lawrence JB. Chromosomal assignment of human nuclear envelope protein genes LMNA, LMNB1, and LBR by fluorescence in situ hybridization. *Genomics.* 15 mars 1996;32(3):474-8.
45. Lin F, Worman HJ. Structural organization of the human gene encoding nuclear lamin A and nuclear lamin C. *J Biol Chem.* 5 août 1993;268(22):16321-6.

46. Machiels BM, Zorenc AH, Endert JM, Kuijpers HJ, van Eys GJ, Ramaekers FC, et al. An alternative splicing product of the lamin A/C gene lacks exon 10. *J Biol Chem.* 19 avr 1996;271(16):9249-53.
47. Furukawa K, Inagaki H, Hotta Y. Identification and cloning of an mRNA coding for a germ cell-specific A-type lamin in mice. *Exp Cell Res.* juin 1994;212(2):426-30.
48. Lopez-Mejia IC, Vautrot V, De Toledo M, Behm-Ansmant I, Bourgeois CF, Navarro CL, et al. A conserved splicing mechanism of the LMNA gene controls premature aging. *Hum Mol Genet.* 1 déc 2011;20(23):4540-55.
49. Broers JLV, Ramaekers FCS, Bonne G, Yaou RB, Hutchison CJ. Nuclear lamins: laminopathies and their role in premature ageing. *Physiol Rev.* juill 2006;86(3):967-1008.
50. Lin F, Worman HJ. Structural organization of the human gene (LMNB1) encoding nuclear lamin B1. *Genomics.* 20 mai 1995;27(2):230-6.
51. Dittmer TA, Misteli T. The lamin protein family. *Genome Biol.* 2011;12(5):222.
52. Furukawa K, Hotta Y. cDNA cloning of a germ cell specific lamin B3 from mouse spermatocytes and analysis of its function by ectopic expression in somatic cells. *EMBO J.* janv 1993;12(1):97-106.
53. Herrmann H, Aebi U. Intermediate Filaments: Structure and Assembly. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 1 nov 2016;8(11).
54. Hutchison CJ, Worman HJ. A-type lamins: Guardians of the soma? *Nat Cell Biol.* nov 2004;6(11):1062-7.
55. Frangioni JV, Neel BG. 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. *J Cell Sci.* juin 1993;105 (Pt 2):481-8.
56. Shumaker DK, Solimando L, Sengupta K, Shimi T, Adam SA, Grunwald A, et al. The highly conserved nuclear lamin Ig-fold binds to PCNA: its role in DNA replication. *J Cell Biol.* 21 avr 2008;181(2):269-80.
57. Herrmann H, Aebi U. Intermediate Filaments: Molecular Structure, Assembly Mechanism, and Integration Into Functionally Distinct Intracellular Scaffolds. *Annu Rev Biochem.* 2004;73(1):749-89.
58. Krimm I, Ostlund C, Gilquin B, Couprie J, Hossenlopp P, Mornon J-P, et al. The Ig-like structure of the C-terminal domain of lamin A/C, mutated in muscular dystrophies, cardiomyopathy, and partial lipodystrophy. *Struct Lond Engl* 1993. juin 2002;10(6):811-23.
59. Dhe-Paganon S, Werner ED, Chi Y-I, Shoelson SE. Structure of the globular tail of nuclear lamin. *J Biol Chem.* 17 mai 2002;277(20):17381-4.

60. Delbarre E, Tramier M, Coppey-Moisan M, Gaillard C, Courvalin J-C, Buendia B. The truncated prelamin A in Hutchinson-Gilford progeria syndrome alters segregation of A-type and B-type lamin homopolymers. *Hum Mol Genet.* 1 avr 2006;15(7):1113-22.
61. Röber RA, Weber K, Osborn M. Differential timing of nuclear lamin A/C expression in the various organs of the mouse embryo and the young animal: a developmental study. *Dev Camb Engl.* févr 1989;105(2):365-78.
62. Furukawa K, Inagaki H, Naruge T, Tabata S, Tomida T, Yamaguchi A, et al. cDNA cloning and functional characterization of a meiosis-specific protein (MNS1) with apparent nuclear association. *Chromosome Res Int J Mol Supramol Evol Asp Chromosome Biol.* mars 1994;2(2):99-113.
63. Lehner CF, Fürstenberger G, Eppenberger HM, Nigg EA. Biogenesis of the nuclear lamina: in vivo synthesis and processing of nuclear protein precursors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* avr 1986;83(7):2096-9.
64. Barrowman J, Michaelis S. ZMPSTE24, an integral membrane zinc metalloprotease with a connection to progeroid disorders. *Biol Chem.* août 2009;390(8):761-73.
65. Goldman AE, Moir RD, Montag-Lowy M, Stewart M, Goldman RD. Pathway of incorporation of microinjected lamin A into the nuclear envelope. *J Cell Biol.* nov 1992;119(4):725-35.
66. Saksena S, Summers MD, Burks JK, Johnson AE, Braunagel SC. Importin-alpha-16 is a translocon-associated protein involved in sorting membrane proteins to the nuclear envelope. *Nat Struct Mol Biol.* juin 2006;13(6):500-8.
67. Antonin W, Ungricht R, Kutay U. Traversing the NPC along the pore membrane: targeting of membrane proteins to the INM. *Nucl Austin Tex.* avr 2011;2(2):87-91.
68. Wu D, Flannery AR, Cai H, Ko E, Cao K. Nuclear localization signal deletion mutants of lamin A and progerin reveal insights into lamin A processing and emerin targeting. *Nucl Austin Tex.* févr 2014;5(1):66-74.
69. Bridger JM, Foeger N, Kill IR, Herrmann H. The nuclear lamina. Both a structural framework and a platform for genome organization. *FEBS J.* mars 2007;274(6):1354-61.
70. Gerace L, Blum A, Blobel G. Immunocytochemical localization of the major polypeptides of the nuclear pore complex-lamina fraction. Interphase and mitotic distribution. *J Cell Biol.* nov 1978;79(2 Pt 1):546-66.
71. Broers JL, Machiels BM, van Eys GJ, Kuijpers HJ, Manders EM, van Driel R, et al. Dynamics of the nuclear lamina as monitored by GFP-tagged A-type lamins. *J Cell Sci.* oct 1999;112 (Pt 20):3463-75.
72. Burla R, La Torre M, Saggio I. Mammalian telomeres and their partnership with lamins. *Nucl Austin Tex.* 25 avr 2016;7(2):187-202.

73. Güttinger S, Laurell E, Kutay U. Orchestrating nuclear envelope disassembly and reassembly during mitosis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* mars 2009;10(3):178-91.
74. Georgatos SD, Pyrpasopoulou A, Theodoropoulos PA. Nuclear envelope breakdown in mammalian cells involves stepwise lamina disassembly and microtubule-drive deformation of the nuclear membrane. *J Cell Sci.* sept 1997;110 (Pt 17):2129-40.
75. Moriuchi T, Kuroda M, Kusumoto F, Osumi T, Hirose F. Lamin A reassembly at the end of mitosis is regulated by its SUMO-interacting motif. *Exp Cell Res.* 1 mars 2016;342(1):83-94.
76. Strelkov SV, Schumacher J, Burkhard P, Aebi U, Herrmann H. Crystal structure of the human lamin A coil 2B dimer: implications for the head-to-tail association of nuclear lamins. *J Mol Biol.* 29 oct 2004;343(4):1067-80.
77. Peter M, Nakagawa J, Dorée M, Labbé JC, Nigg EA. In vitro disassembly of the nuclear lamina and M phase-specific phosphorylation of lamins by cdc2 kinase. *Cell.* 18 mai 1990;61(4):591-602.
78. Peter M, Heitlinger E, Häner M, Aebi U, Nigg EA. Disassembly of in vitro formed lamin head-to-tail polymers by CDC2 kinase. *EMBO J.* juin 1991;10(6):1535-44.
79. Ward GE, Kirschner MW. Identification of cell cycle-regulated phosphorylation sites on nuclear lamin C. *Cell.* 18 mai 1990;61(4):561-77.
80. Eggert M, Radomski N, Tripier D, Traub P, Jost E. Identification of phosphorylation sites on murine nuclear lamin C by RP-HPLC and microsequencing. *FEBS Lett.* 4 nov 1991;292(1-2):205-9.
81. Zaremba-Czogalla M, Piekarowicz K, Wachowicz K, Koziół K, Dubińska-Magiera M, Rzepecki R. The different function of single phosphorylation sites of *Drosophila melanogaster* lamin Dm and lamin C. *PloS One.* 2012;7(2):e32649.
82. Buendia B, Courvalin JC, Collas P. Dynamics of the nuclear envelope at mitosis and during apoptosis. *Cell Mol Life Sci CMLS.* nov 2001;58(12-13):1781-9.
83. Collas P. Sequential PKC- and Cdc2-mediated phosphorylation events elicit zebrafish nuclear envelope disassembly. *J Cell Sci.* mars 1999;112 (Pt 6):977-87.
84. Cenni V, Bertacchini J, Beretti F, Lattanzi G, Bavelloni A, Riccio M, et al. Lamin A Ser404 is a nuclear target of Akt phosphorylation in C2C12 cells. *J Proteome Res.* nov 2008;7(11):4727-35.
85. Ferraro A, Eufemi M, Cervoni L, Marinetti R, Turano C. Glycosylated forms of nuclear lamins. *FEBS Lett.* 6 nov 1989;257(2):241-6.
86. Wells L, Vosseller K, Cole RN, Cronshaw JM, Matunis MJ, Hart GW. Mapping sites of O-GlcNAc modification using affinity tags for serine and threonine post-translational modifications. *Mol Cell Proteomics MCP.* oct 2002;1(10):791-804.

87. Wang Z, Udeshi ND, Slawson C, Compton PD, Sakabe K, Cheung WD, et al. Extensive crosstalk between O-GlcNAcylation and phosphorylation regulates cytokinesis. *Sci Signal*. 12 janv 2010;3(104):ra2.
88. Alfaro JF, Gong C-X, Monroe ME, Aldrich JT, Clauss TRW, Purvine SO, et al. Tandem mass spectrometry identifies many mouse brain O-GlcNAcylated proteins including EGF domain-specific O-GlcNAc transferase targets. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 8 mai 2012;109(19):7280-5.
89. Glozak MA, Sengupta N, Zhang X, Seto E. Acetylation and deacetylation of non-histone proteins. *Gene*. 19 déc 2005;363:15-23.
90. Zullo JM, Demarco IA, Piqué-Regi R, Gaffney DJ, Epstein CB, Spooner CJ, et al. DNA sequence-dependent compartmentalization and silencing of chromatin at the nuclear lamina. *Cell*. 22 juin 2012;149(7):1474-87.
91. Gareau JR, Lima CD. The SUMO pathway: emerging mechanisms that shape specificity, conjugation and recognition. *Nat Rev Mol Cell Biol*. déc 2010;11(12):861-71.
92. Geiss-Friedlander R, Melchior F. Concepts in sumoylation: a decade on. *Nat Rev Mol Cell Biol*. déc 2007;8(12):947-56.
93. Wilkinson KA, Henley JM. Mechanisms, regulation and consequences of protein SUMOylation. *Biochem J*. 13 mai 2010;428(2):133-45.
94. Henley JM, Carmichael RE, Wilkinson KA. Extranuclear SUMOylation in Neurons. *Trends Neurosci*. 9 mars 2018;
95. Zhang Y-Q, Sarge KD. Sumoylation regulates lamin A function and is lost in lamin A mutants associated with familial cardiomyopathies. *J Cell Biol*. 14 juill 2008;182(1):35-9.
96. Simon DN, Domaradzki T, Hofmann WA, Wilson KL. Lamin A tail modification by SUMO1 is disrupted by familial partial lipodystrophy-causing mutations. *Mol Biol Cell*. févr 2013;24(3):342-50.
97. Guo D, Han J, Adam B-L, Colburn NH, Wang M-H, Dong Z, et al. Proteomic analysis of SUMO4 substrates in HEK293 cells under serum starvation-induced stress. *Biochem Biophys Res Commun*. 2 déc 2005;337(4):1308-18.
98. Galisson F, Mahrouche L, Courcelles M, Bonneil E, Meloche S, Chelbi-Alix MK, et al. A novel proteomics approach to identify SUMOylated proteins and their modification sites in human cells. *Mol Cell Proteomics MCP*. févr 2011;10(2):M110.004796.
99. Neutzner M, Neutzner A. Enzymes of ubiquitination and deubiquitination. *Essays Biochem*. 2012;52:37-50.
100. Strieter ER, Korasick DA. Unraveling the complexity of ubiquitin signaling. *ACS Chem Biol*. 20 janv 2012;7(1):52-63.

101. Simon DN, Wilson KL. Partners and post-translational modifications of nuclear lamins. *Chromosoma*. mars 2013;122(1-2):13-31.
102. Pekovic V, Gibbs-Seymour I, Markiewicz E, Alzoghaibi F, Benham AM, Edwards R, et al. Conserved cysteine residues in the mammalian lamin A tail are essential for cellular responses to ROS generation. *Aging Cell*. déc 2011;10(6):1067-79.
103. Barascu A, Le Chalony C, Pennarun G, Genet D, Zaarour N, Bertrand P. Oxydative stress alters nuclear shape through lamins dysregulation. *Nucleus*. 1 sept 2012;3(5):411-7.
104. Senior A, Gerace L. Integral membrane proteins specific to the inner nuclear membrane and associated with the nuclear lamina. *J Cell Biol*. déc 1988;107(6 Pt 1):2029-36.
105. Martin L, Crimauco C, Gerace L. cDNA cloning and characterization of lamina-associated polypeptide 1C (LAP1C), an integral protein of the inner nuclear membrane. *J Biol Chem*. 14 avr 1995;270(15):8822-8.
106. Kondo Y, Kondoh J, Hayashi D, Ban T, Takagi M, Kamei Y, et al. Molecular cloning of one isotype of human lamina-associated polypeptide 1s and a topological analysis using its deletion mutants. *Biochem Biophys Res Commun*. 21 juin 2002;294(4):770-8.
107. Santos M, Domingues SC, Costa P, Muller T, Galozzi S, Marcus K, et al. Identification of a novel human LAP1 isoform that is regulated by protein phosphorylation. *PloS One*. 2014;9(12):e113732.
108. Snyers L, Erhart R, Laffer S, Pusch O, Weipoltshammer K, Schöfer C. LEM4/ANKLE-2 deficiency impairs post-mitotic re-localization of BAF, LAP2 α and LaminA to the nucleus, causes nuclear envelope instability in telophase and leads to hyperploidy in HeLa cells. *Eur J Cell Biol*. janv 2018;97(1):63-74.
109. Cai M, Huang Y, Suh J-Y, Louis JM, Ghirlando R, Craigie R, et al. Solution NMR Structure of the Barrier-to-Autointegration Factor-Emerin Complex. *J Biol Chem*. 5 nov 2007;282(19):14525-35.
110. Berger R, Theodor L, Shoham J, Gokkel E, Brok-Simoni F, Avraham KB, et al. The characterization and localization of the mouse thymopoietin/lamina-associated polypeptide 2 gene and its alternatively spliced products. *Genome Res*. 5 janv 1996;6(5):361-70.
111. Dechat T, Korbei B, Vaughan OA, Vlcek S, Hutchison CJ, Foisner R. Lamina-associated polypeptide 2 α binds intranuclear A-type lamins. *J Cell Sci*. 1 oct 2000;113(19):3473-84.
112. Dechat T, Gajewski A, Korbei B, Gerlich D, Daigle N, Haraguchi T, et al. LAP2 α and BAF transiently localize to telomeres and specific regions on chromatin during nuclear assembly. *J Cell Sci*. 1 déc 2004;117(25):6117-28.

113. Vlcek S, Just H, Dechat T, Foisner R. Functional diversity of LAP2alpha and LAP2beta in postmitotic chromosome association is caused by an alpha-specific nuclear targeting domain. *EMBO J.* 15 nov 1999;18(22):6370-84.
114. Gajewski A, Csaszar E, Foisner R. A phosphorylation cluster in the chromatin-binding region regulates chromosome association of LAP2alpha. *J Biol Chem.* 20 août 2004;279(34):35813-21.
115. Dorner D, Vlcek S, Foeger N, Gajewski A, Makolm C, Gotzmann J, et al. Lamina-associated polypeptide 2alpha regulates cell cycle progression and differentiation via the retinoblastoma-E2F pathway. *J Cell Biol.* 10 avr 2006;173(1):83-93.
116. Markiewicz E, Dechat T, Foisner R, Quinlan RA, Hutchison CJ. Lamin A/C binding protein LAP2alpha is required for nuclear anchorage of retinoblastoma protein. *Mol Biol Cell.* déc 2002;13(12):4401-13.
117. Gesson K, Rescheneder P, Skoruppa MP, Haeseler A von, Dechat T, Foisner R. A-type lamins bind both hetero- and euchromatin, the latter being regulated by lamina-associated polypeptide 2 alpha. *Genome Res.* 4 janv 2016;26(4):462-73.
118. Naetar N, Korbei B, Kozlov S, Kerényi MA, Dorner D, Kral R, et al. Loss of nucleoplasmic LAP2alpha-lamin A complexes causes erythroid and epidermal progenitor hyperproliferation. *Nat Cell Biol.* nov 2008;10(11):1341-8.
119. Pekovic V, Harborth J, Broers JLV, Ramaekers FCS, Engelen B van, Lammens M, et al. Nucleoplasmic LAP2 α -lamin A complexes are required to maintain a proliferative state in human fibroblasts. *J Cell Biol.* 15 janv 2007;176(2):163-72.
120. Markiewicz E, Ledran M, Hutchison CJ. Remodelling of the nuclear lamina and nucleoskeleton is required for skeletal muscle differentiation in vitro. *J Cell Sci.* 15 janv 2005;118(2):409-20.
121. Naetar N, Hutter S, Dorner D, Dechat T, Korbei B, Gotzmann J, et al. LAP2 α -binding protein LINT-25 is a novel chromatin-associated protein involved in cell cycle exit. *J Cell Sci.* 1 mars 2007;120(5):737-47.
122. Naetar N, Ferraioli S, Foisner R. Lamins in the nuclear interior - life outside the lamina. *J Cell Sci.* 1 juill 2017;130(13):2087-96.
123. Suzuki Y, Yang H, Craigie R. LAP2alpha and BAF collaborate to organize the Moloney murine leukemia virus preintegration complex. *EMBO J.* 24 nov 2004;23(23):4670-8.
124. Holaska JM, Lee KK, Kowalski AK, Wilson KL. Transcriptional repressor germ cell-less (GCL) and barrier to autointegration factor (BAF) compete for binding to emerin in vitro. *J Biol Chem.* 28 févr 2003;278(9):6969-75.

125. Simon DN, Zastrow MS, Wilson KL. Direct actin binding to A- and B-type lamin tails and actin filament bundling by the lamin A tail. *Nucl Austin Tex.* juin 2010;1(3):264-72.
126. Vadrot N, Duband-Goulet I, Cabet E, Attanda W, Barateau A, Vicart P, et al. The p.R482W substitution in A-type lamins deregulates SREBP1 activity in Dunnigan-type familial partial lipodystrophy. *Hum Mol Genet.* 1 avr 2015;24(7):2096-109.
127. Tskhovrebova L, Trinick J. Titin: properties and family relationships. *Nat Rev Mol Cell Biol.* sept 2003;4(9):679-89.
128. Machado C, Sunkel CE, Andrew DJ. Human autoantibodies reveal titin as a chromosomal protein. *J Cell Biol.* 20 avr 1998;141(2):321-33.
129. Machado C, Andrew DJ. Titin as a chromosomal protein. *Adv Exp Med Biol.* 2000;481:221-32; discussion 232-236.
130. Zastrow MS, Flaherty DB, Benian GM, Wilson KL. Nuclear titin interacts with A- and B-type lamins in vitro and in vivo. *J Cell Sci.* 15 janv 2006;119(Pt 2):239-49.
131. Bouvier D, Hubert J, Seve AP, Bouteille M. Characterization of lamina-bound chromatin in the nuclear shell isolated from HeLa cells. *Exp Cell Res.* févr 1985;156(2):500-12.
132. Burke B. On the cell-free association of lamins A and C with metaphase chromosomes. *Exp Cell Res.* janv 1990;186(1):169-76.
133. Yuan J, Simos G, Blobel G, Georgatos SD. Binding of lamin A to polynucleosomes. *J Biol Chem.* 15 mai 1991;266(14):9211-5.
134. Mattout A, Goldberg M, Tzur Y, Margalit A, Gruenbaum Y. Specific and conserved sequences in *D. melanogaster* and *C. elegans* lamins and histone H2A mediate the attachment of lamins to chromosomes. *J Cell Sci.* 1 janv 2007;120(Pt 1):77-85.
135. Stierlé V, Couprie J, Ostlund C, Krimm I, Zinn-Justin S, Hossenlopp P, et al. The carboxyl-terminal region common to lamins A and C contains a DNA binding domain. *Biochemistry.* 6 mai 2003;42(17):4819-28.
136. Croft JA, Bridger JM, Boyle S, Perry P, Teague P, Bickmore WA. Differences in the localization and morphology of chromosomes in the human nucleus. *J Cell Biol.* 14 juin 1999;145(6):1119-31.
137. Cremer T, Cremer M. Chromosome territories. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* mars 2010;2(3):a003889.
138. Guelen L, Pagie L, Brasset E, Meuleman W, Faza MB, Talhout W, et al. Domain organization of human chromosomes revealed by mapping of nuclear lamina interactions. *Nature.* 12 juin 2008;453(7197):948-51.

139. Malhas A, Lee CF, Sanders R, Saunders NJ, Vaux DJ. Defects in lamin B1 expression or processing affect interphase chromosome position and gene expression. *J Cell Biol.* 26 févr 2007;176(5):593-603.
140. Solovei I, Wang AS, Thanisch K, Schmidt CS, Krebs S, Zwerger M, et al. LBR and lamin A/C sequentially tether peripheral heterochromatin and inversely regulate differentiation. *Cell.* 31 janv 2013;152(3):584-98.
141. Cohen M, Tzur YB, Neufeld E, Feinstein N, Delannoy MR, Wilson KL, et al. Transmission electron microscope studies of the nuclear envelope in *Caenorhabditis elegans* embryos. *J Struct Biol.* déc 2002;140(1-3):232-40.
142. Shumaker DK, Dechat T, Kohlmaier A, Adam SA, Bozovsky MR, Erdos MR, et al. Mutant nuclear lamin A leads to progressive alterations of epigenetic control in premature aging. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 6 juin 2006;103(23):8703-8.
143. Sullivan T, Escalante-Alcalde D, Bhatt H, Anver M, Bhat N, Nagashima K, et al. Loss of A-type lamin expression compromises nuclear envelope integrity leading to muscular dystrophy. *J Cell Biol.* 29 nov 1999;147(5):913-20.
144. Nikolova V, Leimena C, McMahan AC, Tan JC, Chandar S, Jogia D, et al. Defects in nuclear structure and function promote dilated cardiomyopathy in lamin A/C-deficient mice. *J Clin Invest.* févr 2004;113(3):357-69.
145. Lammerding J, Schulze PC, Takahashi T, Kozlov S, Sullivan T, Kamm RD, et al. Lamin A/C deficiency causes defective nuclear mechanics and mechanotransduction. *J Clin Invest.* févr 2004;113(3):370-8.
146. Broers JLV, Kuijpers HJH, Ostlund C, Worman HJ, Endert J, Ramaekers FCS. Both lamin A and lamin C mutations cause lamina instability as well as loss of internal nuclear lamin organization. *Exp Cell Res.* 1 avr 2005;304(2):582-92.
147. Mislow JMK, Kim MS, Davis DB, McNally EM. Myne-1, a spectrin repeat transmembrane protein of the myocyte inner nuclear membrane, interacts with lamin A/C. *J Cell Sci.* 1 janv 2002;115(Pt 1):61-70.
148. Muchir A, van Engelen BG, Lammens M, Mislow JM, McNally E, Schwartz K, et al. Nuclear envelope alterations in fibroblasts from LGMD1B patients carrying nonsense Y259X heterozygous or homozygous mutation in lamin A/C gene. *Exp Cell Res.* 10 déc 2003;291(2):352-62.
149. Lenz-Böhme B, Wismar J, Fuchs S, Reifegerste R, Buchner E, Betz H, et al. Insertional mutation of the *Drosophila* nuclear lamin Dm0 gene results in defective nuclear envelopes, clustering of nuclear pore complexes, and accumulation of annulate lamellae. *J Cell Biol.* 2 juin 1997;137(5):1001-16.

150. Buendia B, Santa-Maria A, Courvalin JC. Caspase-dependent proteolysis of integral and peripheral proteins of nuclear membranes and nuclear pore complex proteins during apoptosis. *J Cell Sci.* juin 1999;112 (Pt 11):1743-53.
151. Daigle N, Beaudouin J, Hartnell L, Imreh G, Hallberg E, Lippincott-Schwartz J, et al. Nuclear pore complexes form immobile networks and have a very low turnover in live mammalian cells. *J Cell Biol.* 9 juill 2001;154(1):71-84.
152. Houben F, Willems CHMP, Declercq ILJ, Hochstenbach K, Kamps MA, Snoeckx LHEH, et al. Disturbed nuclear orientation and cellular migration in A-type lamin deficient cells. *Biochim Biophys Acta.* févr 2009;1793(2):312-24.
153. Pajerowski JD, Dahl KN, Zhong FL, Sammak PJ, Discher DE. Physical plasticity of the nucleus in stem cell differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2 oct 2007;104(40):15619-24.
154. Ostlund C, Bonne G, Schwartz K, Worman HJ. Properties of lamin A mutants found in Emery-Dreifuss muscular dystrophy, cardiomyopathy and Dunnigan-type partial lipodystrophy. *J Cell Sci.* déc 2001;114(Pt 24):4435-45.
155. Vaughan A, Alvarez-Reyes M, Bridger JM, Broers JL, Ramaekers FC, Wehnert M, et al. Both emerin and lamin C depend on lamin A for localization at the nuclear envelope. *J Cell Sci.* juill 2001;114(Pt 14):2577-90.
156. Vigouroux C, Auclair M, Dubosclard E, Pouchelet M, Capeau J, Courvalin JC, et al. Nuclear envelope disorganization in fibroblasts from lipodystrophic patients with heterozygous R482Q/W mutations in the lamin A/C gene. *J Cell Sci.* déc 2001;114(Pt 24):4459-68.
157. Favreau C, Dubosclard E, Ostlund C, Vigouroux C, Capeau J, Wehnert M, et al. 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.* 1 janv 2003;282(1):14-23.
158. Barateau A, Vadrot N, Vicart P, Ferreiro A, Mayer M, Héron D, et al. A Novel Lamin A Mutant Responsible for Congenital Muscular Dystrophy Causes Distinct Abnormalities of the Cell Nucleus. *PloS One.* 2017;12(1):e0169189.
159. Ferrera D, Canale C, Marotta R, Mazzaro N, Gritti M, Mazzanti M, et al. Lamin B1 overexpression increases nuclear rigidity in autosomal dominant leukodystrophy fibroblasts. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol.* sept 2014;28(9):3906-18.
160. Swift J, Ivanovska IL, Buxboim A, Harada T, Dingal PCDP, Pinter J, et al. Nuclear lamin-A scales with tissue stiffness and enhances matrix-directed differentiation. *Science.* 30 août 2013;341(6149):1240104.

161. Rowat AC, Jaalouk DE, Zwerger M, Ung WL, Eydelnant IA, Olins DE, et al. Nuclear envelope composition determines the ability of neutrophil-type cells to passage through micron-scale constrictions. *J Biol Chem*. 22 mars 2013;288(12):8610-8.
162. Shin J-W, Spinler KR, Swift J, Chasis JA, Mohandas N, Discher DE. Lamins regulate cell trafficking and lineage maturation of adult human hematopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 19 nov 2013;110(47):18892-7.
163. Vargas JD, Hatch EM, Anderson DJ, Hetzer MW. Transient nuclear envelope rupturing during interphase in human cancer cells. *Nucl Austin Tex*. févr 2012;3(1):88-100.
164. Chang W, Worman HJ, Gundersen GG. Accessorizing and anchoring the LINC complex for multifunctionality. *J Cell Biol*. 5 janv 2015;208(1):11-22.
165. Rajgor D, Shanahan CM. Nesprins: from the nuclear envelope and beyond. *Expert Rev Mol Med*. 5 juill 2013;15:e5.
166. Wilson MH, Holzbaur ELF. Nesprins anchor kinesin-1 motors to the nucleus to drive nuclear distribution in muscle cells. *Dev Camb Engl*. 1 janv 2015;142(1):218-28.
167. Fridolfsson HN, Ly N, Meyerzon M, Starr DA. UNC-83 coordinates kinesin-1 and dynein activities at the nuclear envelope during nuclear migration. *Dev Biol*. 15 févr 2010;338(2):237-50.
168. Wilhelmsen K, Litjens SHM, Kuikman I, Tshimbalanga N, Janssen H, van den Bout I, et al. Nesprin-3, a novel outer nuclear membrane protein, associates with the cytoskeletal linker protein plectin. *J Cell Biol*. 5 déc 2005;171(5):799-810.
169. Roux KJ, Crisp ML, Liu Q, Kim D, Kozlov S, Stewart CL, et al. Nesprin 4 is an outer nuclear membrane protein that can induce kinesin-mediated cell polarization. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 17 févr 2009;106(7):2194-9.
170. Kirby TJ, Lammerding J. Emerging views of the nucleus as a cellular mechanosensor. *Nat Cell Biol* [Internet]. 21 févr 2018 [cité 31 mars 2018]; Disponible sur: <http://www.nature.com/articles/s41556-018-0038-y>
171. Banerjee I, Zhang J, Moore-Morris T, Pfeiffer E, Buchholz KS, Liu A, et al. Targeted ablation of nesprin 1 and nesprin 2 from murine myocardium results in cardiomyopathy, altered nuclear morphology and inhibition of the biomechanical gene response. *PLoS Genet*. févr 2014;10(2):e1004114.
172. Staszewska I, Fischer I, Wiche G. Plectin isoform 1-dependent nuclear docking of desmin networks affects myonuclear architecture and expression of mechanotransducers. *Hum Mol Genet*. 20 déc 2015;24(25):7373-89.
173. Konieczny P, Fuchs P, Reipert S, Kunz WS, Zeöld A, Fischer I, et al. Myofiber integrity depends on desmin network targeting to Z-disks and costameres via distinct plectin isoforms. *J Cell Biol*. 19 mai 2008;181(4):667-81.

174. Stroud MJ, Feng W, Zhang J, Veevers J, Fang X, Gerace L, et al. Nesprin 1 α 2 is essential for mouse postnatal viability and nuclear positioning in skeletal muscle. *J Cell Biol.* 3 juill 2017;216(7):1915-24.
175. Bone CR, Starr DA. Nuclear migration events throughout development. *J Cell Sci.* 15 2016;129(10):1951-61.
176. Collins MA, Mandigo TR, Camuglia JM, Vazquez GA, Anderson AJ, Hudson CH, et al. Emery-Dreifuss muscular dystrophy-linked genes and centronuclear myopathy-linked genes regulate myonuclear movement by distinct mechanisms. *Mol Biol Cell.* 15 août 2017;28(17):2303-17.
177. Zuela N, Zwerger M, Levin T, Medalia O, Gruenbaum Y. Impaired mechanical response of an EDMD mutation leads to motility phenotypes that are repaired by loss of prenylation. *J Cell Sci.* 01 2016;129(9):1781-91.
178. Zwerger M, Jaalouk DE, Lombardi ML, Isermann P, Mauermann M, Dialynas G, et al. Myopathic lamin mutations impair nuclear stability in cells and tissue and disrupt nucleocytoskeletal coupling. *Hum Mol Genet.* 15 juin 2013;22(12):2335-49.
179. De Vos WH, Houben F, Kamps M, Malhas A, Verheyen F, Cox J, et al. Repetitive disruptions of the nuclear envelope invoke temporary loss of cellular compartmentalization in laminopathies. *Hum Mol Genet.* 1 nov 2011;20(21):4175-86.
180. Ramdas NM, Shivashankar GV. Cytoskeletal control of nuclear morphology and chromatin organization. *J Mol Biol.* 13 févr 2015;427(3):695-706.
181. Chen H, Chen J, Muir LA, Ronquist S, Meixner W, Ljungman M, et al. Functional organization of the human 4D Nucleome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 30 juin 2015;112(26):8002-7.
182. Wang Y, Nagarajan M, Uhler C, Shivashankar GV. Orientation and repositioning of chromosomes correlate with cell geometry-dependent gene expression. *Mol Biol Cell.* 7 juill 2017;28(14):1997-2009.
183. Cui Y, Bustamante C. Pulling a single chromatin fiber reveals the forces that maintain its higher-order structure. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 4 janv 2000;97(1):127-32.
184. Tajik A, Zhang Y, Wei F, Sun J, Jia Q, Zhou W, et al. Transcription upregulation via force-induced direct stretching of chromatin. *Nat Mater.* déc 2016;15(12):1287-96.
185. Guilluy C, Osborne LD, Van Landeghem L, Sharek L, Superfine R, Garcia-Mata R, et al. Isolated nuclei adapt to force and reveal a mechanotransduction pathway in the nucleus. *Nat Cell Biol.* avr 2014;16(4):376-81.
186. Ihalainen TO, Aires L, Herzog FA, Schwartlander R, Moeller J, Vogel V. Differential basal-to-apical accessibility of lamin A/C epitopes in the nuclear lamina regulated by changes in cytoskeletal tension. *Nat Mater.* déc 2015;14(12):1252-61.

187. Buxboim A, Swift J, Irianto J, Spinler KR, Dingal PCDP, Athirasala A, et al. Matrix elasticity regulates lamin-A,C phosphorylation and turnover with feedback to actomyosin. *Curr Biol* CB. 18 août 2014;24(16):1909-17.
188. Enyedi B, Niethammer P. Nuclear membrane stretch and its role in mechanotransduction. *Nucl Austin Tex*. 4 mars 2017;8(2):156-61.
189. Heald R, Cohen-Fix O. Morphology and function of membrane-bound organelles. *Curr Opin Cell Biol*. févr 2014;26:79-86.
190. Shibata Y, Shemesh T, Prinz WA, Palazzo AF, Kozlov MM, Rapoport TA. Mechanisms determining the morphology of the peripheral ER. *Cell*. 24 nov 2010;143(5):774-88.
191. Le HQ, Ghatak S, Yeung C-YC, Tellkamp F, Günschmann C, Dieterich C, et al. Mechanical regulation of transcription controls Polycomb-mediated gene silencing during lineage commitment. *Nat Cell Biol*. 2016;18(8):864-75.
192. Solmaz SR, Blobel G, Melcák I. Ring cycle for dilating and constricting the nuclear pore. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 9 avr 2013;110(15):5858-63.
193. Bertrand AT, Ziaei S, Ehret C, Duchemin H, Mamchaoui K, Bigot A, et al. Cellular microenvironments reveal defective mechanosensing responses and elevated YAP signaling in LMNA-mutated muscle precursors. *J Cell Sci*. 1 juill 2014;127(Pt 13):2873-84.
194. Dupont S, Morsut L, Aragona M, Enzo E, Giulitti S, Cordenonsi M, et al. Role of YAP/TAZ in mechanotransduction. *Nature*. 8 juin 2011;474(7350):179-83.
195. Elosegui-Artola A, Andreu I, Beedle AEM, Lezamiz A, Uroz M, Kosmalka AJ, et al. Force Triggers YAP Nuclear Entry by Regulating Transport across Nuclear Pores. *Cell*. 30 nov 2017;171(6):1397-1410.e14.
196. Ivorra C, Kubicek M, González JM, Sanz-González SM, Alvarez-Barrientos A, O'Connor J-E, et al. A mechanism of AP-1 suppression through interaction of c-Fos with lamin A/C. *Genes Dev*. 1 févr 2006;20(3):307-20.
197. Dorner D, Gotzmann J, Foisner R. Nucleoplasmic lamins and their interaction partners, LAP2alpha, Rb, and BAF, in transcriptional regulation. *FEBS J*. mars 2007;274(6):1362-73.
198. Metzger T, Gache V, Xu M, Cadot B, Folker ES, Richardson BE, et al. MAP and kinesin-dependent nuclear positioning is required for skeletal muscle function. *Nature*. 18 mars 2012;484(7392):120-4.
199. Cadot B, Gache V, Gomes ER. Moving and positioning the nucleus in skeletal muscle – one step at a time. *Nucleus*. 4 sept 2015;6(5):373-81.
200. Mattioli E, Columbaro M, Capanni C, Maraldi NM, Cenni V, Scotlandi K, et al. Prelamin A-mediated recruitment of SUN1 to the nuclear envelope directs nuclear positioning in human muscle. *Cell Death Differ*. août 2011;18(8):1305-15.

201. Muchir A, Pavlidis P, Decostre V, Herron AJ, Arimura T, Bonne G, et al. Activation of MAPK pathways links LMNA mutations to cardiomyopathy in Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *J Clin Invest.* mai 2007;117(5):1282-93.
202. Choi JC, Muchir A, Wu W, Iwata S, Homma S, Morrow JP, et al. Temsirolimus activates autophagy and ameliorates cardiomyopathy caused by lamin A/C gene mutation. *Sci Transl Med.* 25 juill 2012;4(144):144ra102.
203. Ramos FJ, Chen SC, Garelick MG, Dai D-F, Liao C-Y, Schreiber KH, et al. Rapamycin reverses elevated mTORC1 signaling in lamin A/C-deficient mice, rescues cardiac and skeletal muscle function, and extends survival. *Sci Transl Med.* 25 juill 2012;4(144):144ra103.
204. Arimura T, Helbling-Leclerc A, Massart C, Varnous S, Niel F, Lacène E, et al. Mouse model carrying H222P-Lmna mutation develops muscular dystrophy and dilated cardiomyopathy similar to human striated muscle laminopathies. *Hum Mol Genet.* 1 janv 2005;14(1):155-69.
205. Cohen TV, Gnocchi VF, Cohen JE, Phadke A, Liu H, Ellis JA, et al. Defective skeletal muscle growth in lamin A/C-deficient mice is rescued by loss of Lap2 α . *Hum Mol Genet.* 15 juill 2013;22(14):2852-69.
206. Janin A, Bauer D, Ratti F, Valla C, Bertrand A, Christin E, et al. SMAD6 overexpression leads to accelerated myogenic differentiation of LMNA mutated cells. *Sci Rep.* 4 avr 2018;8(1):5618.
207. Lu D, Lian H, Zhang X, Shao H, Huang L, Qin C, et al. LMNA E82K mutation activates FAS and mitochondrial pathways of apoptosis in heart tissue specific transgenic mice. *PloS One.* 6 déc 2010;5(12):e15167.
208. Moir RD, Montag-Lowy M, Goldman RD. Dynamic properties of nuclear lamins: lamin B is associated with sites of DNA replication. *J Cell Biol.* juin 1994;125(6):1201-12.
209. Kennedy BK, Barbie DA, Classon M, Dyson N, Harlow E. Nuclear organization of DNA replication in primary mammalian cells. *Genes Dev.* 15 nov 2000;14(22):2855-68.
210. Liu B, Wang J, Chan KM, Tjia WM, Deng W, Guan X, et al. Genomic instability in laminopathy-based premature aging. *Nat Med.* juill 2005;11(7):780-5.
211. Manju K, Muralikrishna B, Parnaik VK. Expression of disease-causing lamin A mutants impairs the formation of DNA repair foci. *J Cell Sci.* 1 juill 2006;119(Pt 13):2704-14.
212. Gonzalez-Suarez I, Redwood AB, Perkins SM, Vermolen B, Lichtensztejn D, Grotzky DA, et al. Novel roles for A-type lamins in telomere biology and the DNA damage response pathway. *EMBO J.* 19 août 2009;28(16):2414-27.
213. Gibbs-Seymour I, Markiewicz E, Bekker-Jensen S, Mailand N, Hutchison CJ. Lamin A/C-dependent interaction with 53BP1 promotes cellular responses to DNA damage. *Aging Cell.* avr 2015;14(2):162-9.

214. Redwood AB, Perkins SM, Vanderwaal RP, Feng Z, Biehl KJ, Gonzalez-Suarez I, et al. A dual role for A-type lamins in DNA double-strand break repair. *Cell Cycle Georget Tex.* 1 août 2011;10(15):2549-60.
215. Spann TP, Goldman AE, Wang C, Huang S, Goldman RD. Alteration of nuclear lamin organization inhibits RNA polymerase II-dependent transcription. *J Cell Biol.* 18 févr 2002;156(4):603-8.
216. Shimi T, Pflieger K, Kojima S, Pack C-G, Solovei I, Goldman AE, et al. The A- and B-type nuclear lamin networks: microdomains involved in chromatin organization and transcription. *Genes Dev.* 15 déc 2008;22(24):3409-21.
217. Malhas AN, Lee CF, Vaux DJ. Lamin B1 controls oxidative stress responses via Oct-1. *J Cell Biol.* 12 janv 2009;184(1):45-55.
218. González JM, Navarro-Puche A, Casar B, Crespo P, Andrés V. Fast regulation of AP-1 activity through interaction of lamin A/C, ERK1/2, and c-Fos at the nuclear envelope. *J Cell Biol.* 17 nov 2008;183(4):653-66.
219. Dreuillet C, Tillit J, Kress M, Ernoult-Lange M. In vivo and in vitro interaction between human transcription factor MOK2 and nuclear lamin A/C. *Nucleic Acids Res.* 1 nov 2002;30(21):4634-42.
220. Lloyd DJ, Trembath RC, Shackleton S. A novel interaction between lamin A and SREBP1: implications for partial lipodystrophy and other laminopathies. *Hum Mol Genet.* 1 avr 2002;11(7):769-77.
221. Bonne G, Di Barletta MR, Varnous S, Bécane HM, Hammouda EH, Merlini L, et al. Mutations in the gene encoding lamin A/C cause autosomal dominant Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Nat Genet.* mars 1999;21(3):285-8.
222. Worman HJ. Nuclear lamins and laminopathies. *J Pathol.* janv 2012;226(2):316-25.
223. Quijano-Roy S, Mbieleu B, Bönnemann CG, Jeannot P-Y, Colomer J, Clarke NF, et al. De novo LMNA mutations cause a new form of congenital muscular dystrophy. *Ann Neurol.* août 2008;64(2):177-86.
224. Dialynas G, Speese S, Budnik V, Geyer PK, Wallrath LL. The role of Drosophila Lamin C in muscle function and gene expression. *Development.* 15 sept 2010;137(18):3067-77.
225. Ho CY, Jaalouk DE, Lammerding J. Novel insights into the disease etiology of laminopathies. *Rare Dis Austin Tex.* 1 janv 2013;1(1):e27002.
226. Li Y, Hassinger L, Thomson T, Ding B, Ashley J, Hassinger W, et al. Lamin Mutations Accelerate Aging via Defective Export of Mitochondrial mRNAs through Nuclear Envelope Budding. *Curr Biol CB.* 8 août 2016;26(15):2052-9.

227. Latour P, Vial C. [Molecular diagnosis of axonal forms of Charcot-Marie-Tooth disease]. *Rev Neurol (Paris)*. déc 2009;165(12):1122-6.
228. De Sandre-Giovannoli A, Chaouch M, Kozlov S, Vallat J-M, Tazir M, Kassouri N, et al. Homozygous defects in LMNA, encoding lamin A/C nuclear-envelope proteins, cause autosomal recessive axonal neuropathy in human (Charcot-Marie-Tooth disorder type 2) and mouse. *Am J Hum Genet*. mars 2002;70(3):726-36.
229. Hamadouche T, Poitelon Y, Genin E, Chaouch M, Tazir M, Kassouri N, et al. Founder effect and estimation of the age of the c.892C>T (p.Arg298Cys) mutation in LMNA associated to Charcot-Marie-Tooth subtype CMT2B1 in families from North Western Africa. *Ann Hum Genet*. sept 2008;72(Pt 5):590-7.
230. Poitelon Y, Kozlov S, Devaux J, Vallat J-M, Jamon M, Roubertoux P, et al. Behavioral and molecular exploration of the AR-CMT2A mouse model *Lmna* (R298C/R298C). *Neuromolecular Med*. mars 2012;14(1):40-52.
231. Watila MM, Balarabe SA. Molecular and clinical features of inherited neuropathies due to PMP22 duplication. *J Neurol Sci*. 15 août 2015;355(1-2):18-24.
232. Cao H, Hegele RA. Nuclear lamin A/C R482Q mutation in canadian kindreds with Dunnigan-type familial partial lipodystrophy. *Hum Mol Genet*. 1 janv 2000;9(1):109-12.
233. Shackleton S, Lloyd DJ, Jackson SN, Evans R, Niermeijer MF, Singh BM, et al. LMNA, encoding lamin A/C, is mutated in partial lipodystrophy. *Nat Genet*. févr 2000;24(2):153-6.
234. Speckman RA, Garg A, Du F, Bennett L, Veile R, Arioglu E, et al. 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. *Am J Hum Genet*. avr 2000;66(4):1192-8.
235. Novelli G, Muchir A, Sangiuolo F, Helbling-Leclerc A, D'Apice MR, Massart C, et al. Mandibuloacral dysplasia is caused by a mutation in LMNA-encoding lamin A/C. *Am J Hum Genet*. août 2002;71(2):426-31.
236. Yassaee VR, Khojaste A, Hashemi-Gorji F, Ravesh Z, Toosi P. A novel homozygous LMNA mutation (p.Met540Ile) causes mandibuloacral dysplasia type A. *Gene*. 10 févr 2016;577(1):8-13.
237. Oldenburg AR, Delbarre E, Thiede B, Vigouroux C, Collas P. 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*. 1 mars 2014;23(5):1151-62.
238. Kim Y-M, Shin H-T, Seo Y-H, Byun H-O, Yoon S-H, Lee I-K, et al. Sterol regulatory element-binding protein (SREBP)-1-mediated lipogenesis is involved in cell senescence. *J Biol Chem*. 17 sept 2010;285(38):29069-77.

239. Markiewicz E, Tilgner K, Barker N, Wetering M van de, Clevers H, Dorobek M, et al. The inner nuclear membrane protein Emerin regulates β -catenin activity by restricting its accumulation in the nucleus. *EMBO J*. 26 juill 2006;25(14):3275-85.
240. Maggi L, Carboni N, Bernasconi P. Skeletal Muscle Laminopathies: A Review of Clinical and Molecular Features. *Cells* [Internet]. 11 août 2016 [cité 19 juin 2017];5(3). Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5040975/>
241. Bonne G, Mercuri E, Muchir A, Urtizbera A, Bécane HM, Recan D, et al. Clinical and molecular genetic spectrum of autosomal dominant Emery-Dreifuss muscular dystrophy due to mutations of the lamin A/C gene. *Ann Neurol*. août 2000;48(2):170-80.
242. Madej-Pilarczyk A. Clinical aspects of Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Nucleus*. 10 avr 2018;00-00.
243. Mercuri E, Manzur AY, Jungbluth H, Bonne G, Muchir A, Sewry C, et al. Early and severe presentation of autosomal dominant Emery-Dreifuss muscular dystrophy (EMD2). *Neurology*. 25 avr 2000;54(8):1704-5.
244. Muchir A, Bonne G, van der Kooi AJ, van Meegen M, Baas F, Bolhuis PA, et al. Identification of mutations in the gene encoding lamins A/C in autosomal dominant limb girdle muscular dystrophy with atrioventricular conduction disturbances (LGMD1B). *Hum Mol Genet*. 22 mai 2000;9(9):1453-9.
245. Janin A, N'Guyen K, Habib G, Dauphin C, Chanavat V, Bouvagnet P, et al. Truncating mutations on myofibrillar myopathies causing genes as prevalent molecular explanations on patients with dilated cardiomyopathy. *Clin Genet*. 24 avr 2017;
246. van Berlo JH, de Voogt WG, van der Kooi AJ, van Tintelen JP, Bonne G, Yaou RB, et al. Meta-analysis of clinical characteristics of 299 carriers of LMNA gene mutations: do lamin A/C mutations portend a high risk of sudden death? *J Mol Med Berl Ger*. janv 2005;83(1):79-83.
247. Hasselberg NE, Haland TF, Saberniak J, Brekke PH, Berge KE, Leren TP, et al. Lamin A/C cardiomyopathy: young onset, high penetrance, and frequent need for heart transplantation. *Eur Heart J*. 7 mars 2018;39(10):853-60.
248. Captur G, Arbustini E, Bonne G, Syrris P, Mills K, Wahbi K, et al. Lamin and the heart. *Heart*. mars 2018;104(6):468-79.
249. Jahn D, Schramm S, Schnölzer M, Heilmann CJ, de Koster CG, Schütz W, et al. A truncated lamin A in the *Lmna* $-/-$ mouse line: implications for the understanding of laminopathies. *Nucl Austin Tex*. oct 2012;3(5):463-74.
250. Jat PS, Noble MD, Ataliotis P, Tanaka Y, Yannoutsos N, Larsen L, et al. Direct derivation of conditionally immortal cell lines from an H-2Kb-tsA58 transgenic mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 15 juin 1991;88(12):5096-100.

251. Morgan JE, Beauchamp JR, Pagel CN, Peckham M, Ataliotis P, Jat PS, et al. Myogenic cell lines derived from transgenic mice carrying a thermolabile T antigen: a model system for the derivation of tissue-specific and mutation-specific cell lines. *Dev Biol.* avr 1994;162(2):486-98.
252. Muses S, Morgan JE, Wells DJ. A new extensively characterised conditionally immortal muscle cell-line for investigating therapeutic strategies in muscular dystrophies. *PloS One.* 2011;6(9):e24826.
253. Kubben N, Voncken JW, Konings G, van Weeghel M, van den Hoogenhof MM, Gijbels M, et al. Post-natal myogenic and adipogenic developmental: defects and metabolic impairment upon loss of A-type lamins. *Nucl Austin Tex.* juin 2011;2(3):195-207.
254. Kim Y, Zheng Y. Generation and characterization of a conditional deletion allele for Lmna in mice. *Biochem Biophys Res Commun.* oct 2013;440(1):8-13.
255. Bertrand AT, Renou L, Papadopoulos A, Beuvin M, Lacène E, Massart C, et al. DelK32-lamin A/C has abnormal location and induces incomplete tissue maturation and severe metabolic defects leading to premature death. *Hum Mol Genet.* 1 mars 2012;21(5):1037-48.
256. Cattin M-E, Bertrand AT, Schlossarek S, Le Bihan M-C, Skov Jensen S, Neuber C, et al. Heterozygous Lmn^{delK32} mice develop dilated cardiomyopathy through a combined pathomechanism of haploinsufficiency and peptide toxicity. *Hum Mol Genet.* 1 août 2013;22(15):3152-64.
257. Mounkes LC, Kozlov SV, Rottman JN, Stewart CL. Expression of an LMNA-N195K variant of A-type lamins results in cardiac conduction defects and death in mice. *Hum Mol Genet.* 1 août 2005;14(15):2167-80.
258. Muchir A, Pavlidis P, Bonne G, Hayashi YK, Worman HJ. Activation of MAPK in hearts of EMD null mice: similarities between mouse models of X-linked and autosomal dominant Emery Dreifuss muscular dystrophy. *Hum Mol Genet.* 1 août 2007;16(15):1884-95.
259. Chatzifrangkeskou M, Yadin D, Marais T, Chardonnet S, Cohen-Tannoudji M, Mougnot N, et al. Cofilin-1 phosphorylation catalyzed by ERK1/2 alters cardiac actin dynamics in dilated cardiomyopathy caused by lamin A/C gene mutation. *Hum Mol Genet.* 5 juin 2018;
260. Lammerding J, Hsiao J, Schulze PC, Kozlov S, Stewart CL, Lee RT. Abnormal nuclear shape and impaired mechanotransduction in emerin-deficient cells. *J Cell Biol.* 29 août 2005;170(5):781-91.
261. Gesson K, Vidak S, Foisner R. Lamina-associated polypeptide (LAP)2 α and nucleoplasmic lamins in adult stem cell regulation and disease. *Semin Cell Dev Biol.* mai 2014;29:116-24.
262. Goldman RD, Shumaker DK, Erdos MR, Eriksson M, Goldman AE, Gordon LB, et al. Accumulation of mutant lamin A causes progressive changes in nuclear architecture in Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 15 juin 2004;101(24):8963-8.

263. Johnson BR, Nitta RT, Frock RL, Mounkes L, Barbie DA, Stewart CL, et al. A-type lamins regulate retinoblastoma protein function by promoting subnuclear localization and preventing proteasomal degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 29 juin 2004;101(26):9677-82.
264. Van Berlo JH, Voncken JW, Kubben N, Broers JLV, Duisters R, van Leeuwen REW, et al. A-type lamins are essential for TGF- β 1 induced PP2A to dephosphorylate transcription factors. *Hum Mol Genet*. 1 oct 2005;14(19):2839-49.
265. Frock RL, Kudlow BA, Evans AM, Jameson SA, Hauschka SD, Kennedy BK. Lamin A/C and emerin are critical for skeletal muscle satellite cell differentiation. *Genes Dev*. 15 févr 2006;20(4):486-500.
266. Bermeo S, Vidal C, Zhou H, Duque G. Lamin A/C Acts as an Essential Factor in Mesenchymal Stem Cell Differentiation Through the Regulation of the Dynamics of the Wnt/ β -Catenin Pathway. *J Cell Biochem*. oct 2015;116(10):2344-53.
267. Hernandez L, Roux KJ, Wong ESM, Mounkes LC, Mutalif R, Navasankari R, et al. Functional coupling between the extracellular matrix and nuclear lamina by Wnt signaling in progeria. *Dev Cell*. 14 sept 2010;19(3):413-25.
268. Mounkes LC, Kozlov S, Hernandez L, Sullivan T, Stewart CL. A progeroid syndrome in mice is caused by defects in A-type lamins. *Nature*. 15 mai 2003;423(6937):298-301.
269. Neumann S, Schneider M, Daugherty RL, Gottardi CJ, Eming SA, Beijer A, et al. Nesprin-2 interacts with α -catenin and regulates Wnt signaling at the nuclear envelope. *J Biol Chem*. 5 nov 2010;285(45):34932-8.
270. Stubenvoll A, Rice M, Wietelmann A, Wheeler M, Braun T. Attenuation of Wnt/ β -catenin activity reverses enhanced generation of cardiomyocytes and cardiac defects caused by the loss of emerin. *Hum Mol Genet*. 1 févr 2015;24(3):802-13.
271. Le Dour C, Macquart C, Sera F, Homma S, Bonne G, Morrow JP, et al. Decreased WNT/ β -catenin signalling contributes to the pathogenesis of dilated cardiomyopathy caused by mutations in the lamin a/C gene. *Hum Mol Genet*. 15 2017;26(2):333-43.
272. Bengtsson L. What MAN1 does to the Smads. TGFbeta/BMP signaling and the nuclear envelope. *FEBS J*. mars 2007;274(6):1374-82.
273. Hutchinson J. Congenital Absence of Hair and Mammary Glands with Atrophic Condition of the Skin and its Appendages, in a Boy whose Mother had been almost wholly Bald from Alopecia Areata from the age of Six. *Medico-Chir Trans*. 1886;69:473-7.
274. Pollex RL, Hegele RA. Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Clin Genet*. nov 2004;66(5):375-81.

275. Eriksson M, Brown WT, Gordon LB, Glynn MW, Singer J, Scott L, et al. Recurrent de novo point mutations in lamin A cause Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Nature*. 15 mai 2003;423(6937):293-8.
276. De Sandre-Giovannoli A, Bernard R, Cau P, Navarro C, Amiel J, Boccaccio I, et al. Lamin A truncation in Hutchinson-Gilford progeria. *Science*. 27 juin 2003;300(5628):2055.
277. Soria-Valles C, Carrero D, Gabau E, Velasco G, Quesada V, Bárcena C, et al. Novel LMNA mutations cause an aggressive atypical neonatal progeria without progerin accumulation. *J Med Genet*. 22 juin 2016;
278. Flavell RA, Sanjabi S, Wrzesinski SH, Licona-Limón P. The polarization of immune cells in the tumour environment by TGFbeta. *Nat Rev Immunol*. août 2010;10(8):554-67.
279. Heldin C-H, Landström M, Moustakas A. Mechanism of TGF-beta signaling to growth arrest, apoptosis, and epithelial-mesenchymal transition. *Curr Opin Cell Biol*. avr 2009;21(2):166-76.
280. Wu MY, Hill CS. Tgf-beta superfamily signaling in embryonic development and homeostasis. *Dev Cell*. mars 2009;16(3):329-43.
281. de Larco JE, Todaro GJ. Growth factors from murine sarcoma virus-transformed cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. août 1978;75(8):4001-5.
282. Moses HL, Branum EL, Proper JA, Robinson RA. Transforming growth factor production by chemically transformed cells. *Cancer Res*. juill 1981;41(7):2842-8.
283. Roberts AB, Anzano MA, Lamb LC, Smith JM, Sporn MB. New class of transforming growth factors potentiated by epidermal growth factor: isolation from non-neoplastic tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A*. sept 1981;78(9):5339-43.
284. Kretzschmar M, Liu F, Hata A, Doody J, Massagué J. The TGF-beta family mediator Smad1 is phosphorylated directly and activated functionally by the BMP receptor kinase. *Genes Dev*. 15 avr 1997;11(8):984-95.
285. Massagué J. TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem*. 1998;67:753-91.
286. Massagué J, Wotton D. Transcriptional control by the TGF- β /Smad signaling system. *EMBO J*. 17 avr 2000;19(8):1745-54.
287. Feng X-H, Derynck R. Specificity and versatility in tgf-beta signaling through Smads. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2005;21:659-93.
288. Hinck AP. Structural studies of the TGF- β s and their receptors - insights into evolution of the TGF- β superfamily. *FEBS Lett*. 4 juill 2012;586(14):1860-70.
289. Lafyatis R. Transforming growth factor β --at the centre of systemic sclerosis. *Nat Rev Rheumatol*. déc 2014;10(12):706-19.

290. Taipale J, Lohi J, Saarinen J, Kovanen PT, Keski-Oja J. Human mast cell chymase and leukocyte elastase release latent transforming growth factor-beta 1 from the extracellular matrix of cultured human epithelial and endothelial cells. *J Biol Chem.* 3 mars 1995;270(9):4689-96.
291. Abe M, Oda N, Sato Y. Cell-associated activation of latent transforming growth factor-beta by calpain. *J Cell Physiol.* févr 1998;174(2):186-93.
292. Ge G, Greenspan DS. BMP1 controls TGFbeta1 activation via cleavage of latent TGFbeta-binding protein. *J Cell Biol.* 9 oct 2006;175(1):111-20.
293. Ribeiro SM, Poczatek M, Schultz-Cherry S, Villain M, Murphy-Ullrich JE. The activation sequence of thrombospondin-1 interacts with the latency-associated peptide to regulate activation of latent transforming growth factor-beta. *J Biol Chem.* 7 mai 1999;274(19):13586-93.
294. Munger JS, Huang X, Kawakatsu H, Griffiths MJ, Dalton SL, Wu J, et al. The integrin alpha v beta 6 binds and activates latent TGF beta 1: a mechanism for regulating pulmonary inflammation and fibrosis. *Cell.* 5 févr 1999;96(3):319-28.
295. Lee SJ, McPherron AC. Regulation of myostatin activity and muscle growth. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 31 juill 2001;98(16):9306-11.
296. Gregory KE, Ono RN, Charbonneau NL, Kuo C-L, Keene DR, Bächinger HP, et al. The prodomain of BMP-7 targets the BMP-7 complex to the extracellular matrix. *J Biol Chem.* 29 juill 2005;280(30):27970-80.
297. Schmierer B, Hill CS. TGFbeta-SMAD signal transduction: molecular specificity and functional flexibility. *Nat Rev Mol Cell Biol.* déc 2007;8(12):970-82.
298. Shi Y, Massagué J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell.* 13 juin 2003;113(6):685-700.
299. Groppe J, Hinck CS, Samavarchi-Tehrani P, Zubieta C, Schuermann JP, Taylor AB, et al. Cooperative assembly of TGF-beta superfamily signaling complexes is mediated by two disparate mechanisms and distinct modes of receptor binding. *Mol Cell.* 1 févr 2008;29(2):157-68.
300. Allendorph GP, Vale WW, Choe S. Structure of the ternary signaling complex of a TGF-beta superfamily member. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 16 mai 2006;103(20):7643-8.
301. Massagué J, Seoane J, Wotton D. Smad transcription factors. *Genes Dev.* 1 déc 2005;19(23):2783-810.
302. Qin BY, Chacko BM, Lam SS, de Caestecker MP, Correia JJ, Lin K. Structural basis of Smad1 activation by receptor kinase phosphorylation. *Mol Cell.* déc 2001;8(6):1303-12.
303. Chacko BM, Qin BY, Tiwari A, Shi G, Lam S, Hayward LJ, et al. Structural basis of heteromeric smad protein assembly in TGF-beta signaling. *Mol Cell.* 10 sept 2004;15(5):813-23.

304. Ross S, Cheung E, Petrakis TG, Howell M, Kraus WL, Hill CS. Smads orchestrate specific histone modifications and chromatin remodeling to activate transcription. *EMBO J.* 4 oct 2006;25(19):4490-502.
305. Ishida W, Hamamoto T, Kusanagi K, Yagi K, Kawabata M, Takehara K, et al. Smad6 is a Smad1/5-induced smad inhibitor. Characterization of bone morphogenetic protein-responsive element in the mouse Smad6 promoter. *J Biol Chem.* 3 mars 2000;275(9):6075-9.
306. López-Rovira T, Chalaux E, Massagué J, Rosa JL, Ventura F. Direct binding of Smad1 and Smad4 to two distinct motifs mediates bone morphogenetic protein-specific transcriptional activation of Id1 gene. *J Biol Chem.* 1 févr 2002;277(5):3176-85.
307. Korchynskiy O, ten Dijke P. Identification and functional characterization of distinct critically important bone morphogenetic protein-specific response elements in the Id1 promoter. *J Biol Chem.* 15 févr 2002;277(7):4883-91.
308. Derynck R, Zhang YE. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature.* 9 oct 2003;425(6958):577-84.
309. Moustakas A, Heldin C-H. Non-Smad TGF-beta signals. *J Cell Sci.* 15 août 2005;118(Pt 16):3573-84.
310. Zhang YE. Non-Smad pathways in TGF-beta signaling. *Cell Res.* janv 2009;19(1):128-39.
311. Zhang YE. Non-Smad Signaling Pathways of the TGF- β Family. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 1 févr 2017;9(2).
312. Sorrentino A, Thakur N, Grimsby S, Marcusson A, von Bulow V, Schuster N, et al. The type I TGF-beta receptor engages TRAF6 to activate TAK1 in a receptor kinase-independent manner. *Nat Cell Biol.* oct 2008;10(10):1199-207.
313. Yamashita M, Fatyol K, Jin C, Wang X, Liu Z, Zhang YE. TRAF6 mediates Smad-independent activation of JNK and p38 by TGF-beta. *Mol Cell.* 26 sept 2008;31(6):918-24.
314. Urist MR. Bone: formation by autoinduction. *Science.* 12 nov 1965;150(3698):893-9.
315. Luyten FP, Cunningham NS, Ma S, Muthukumaran N, Hammonds RG, Nevins WB, et al. Purification and partial amino acid sequence of osteogenin, a protein initiating bone differentiation. *J Biol Chem.* 15 août 1989;264(23):13377-80.
316. Wozney JM. The bone morphogenetic protein family and osteogenesis. *Mol Reprod Dev.* 1 juin 1992;32(2):160-7.
317. Miyazono K, Kamiya Y, Morikawa M. Bone morphogenetic protein receptors and signal transduction. *J Biochem (Tokyo).* janv 2010;147(1):35-51.
318. Hemmati-Brivanlou A, Thomsen GH. Ventral mesodermal patterning in *Xenopus* embryos: expression patterns and activities of BMP-2 and BMP-4. *Dev Genet.* 1995;17(1):78-89.

319. Zou H, Choe KM, Lu Y, Massagué J, Niswander L. BMP signaling and vertebrate limb development. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 1997;62:269-72.
320. Kobayashi T, Lyons KM, McMahon AP, Kronenberg HM. BMP signaling stimulates cellular differentiation at multiple steps during cartilage development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 13 déc 2005;102(50):18023-7.
321. Zou H, Niswander L. Requirement for BMP signaling in interdigital apoptosis and scale formation. *Science.* 3 mai 1996;272(5262):738-41.
322. Bobacz K, Gruber R, Soleiman A, Erlacher L, Smolen JS, Graninger WB. Expression of bone morphogenetic protein 6 in healthy and osteoarthritic human articular chondrocytes and stimulation of matrix synthesis in vitro. *Arthritis Rheum.* sept 2003;48(9):2501-8.
323. Tsuji K, Bandyopadhyay A, Harfe BD, Cox K, Kakar S, Gerstenfeld L, et al. BMP2 activity, although dispensable for bone formation, is required for the initiation of fracture healing. *Nat Genet.* déc 2006;38(12):1424-9.
324. Tsuji K, Cox K, Bandyopadhyay A, Harfe BD, Tabin CJ, Rosen V. BMP4 is dispensable for skeletogenesis and fracture-healing in the limb. *J Bone Joint Surg Am.* févr 2008;90 Suppl 1:14-8.
325. Huang Z, Wang D, Ihida-Stansbury K, Jones PL, Martin JF. Defective pulmonary vascular remodeling in Smad8 mutant mice. *Hum Mol Genet.* 1 août 2009;18(15):2791-801.
326. Andriopoulos B, Corradini E, Xia Y, Faasse SA, Chen S, Grgurevic L, et al. BMP6 is a key endogenous regulator of hepcidin expression and iron metabolism. *Nat Genet.* avr 2009;41(4):482-7.
327. Corradini E, Garuti C, Montosi G, Ventura P, Andriopoulos B, Lin HY, et al. Bone morphogenetic protein signaling is impaired in an HFE knockout mouse model of hemochromatosis. *Gastroenterology.* oct 2009;137(4):1489-97.
328. Wagner DO, Sieber C, Bhushan R, Börgermann JH, Graf D, Knaus P. BMPs: from bone to body morphogenetic proteins. *Sci Signal.* 2 févr 2010;3(107):mr1.
329. Krause C, Guzman A, Knaus P. Noggin. *Int J Biochem Cell Biol.* avr 2011;43(4):478-81.
330. Wardle FC, Angerer LM, Angerer RC, Dale L. Regulation of BMP signaling by the BMP1/TLD-related metalloprotease, SpAN. *Dev Biol.* 1 févr 1999;206(1):63-72.
331. Peluso CE, Umulis D, Kim Y-J, O'Connor MB, Serpe M. Shaping BMP morphogen gradients through enzyme-substrate interactions. *Dev Cell.* 16 août 2011;21(2):375-83.
332. Iemura S, Yamamoto TS, Takagi C, Uchiyama H, Natsume T, Shimasaki S, et al. Direct binding of follistatin to a complex of bone-morphogenetic protein and its receptor inhibits ventral and epidermal cell fates in early *Xenopus* embryo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 4 août 1998;95(16):9337-42.

333. Amthor H, Christ B, Rashid-Doubell F, Kemp CF, Lang E, Patel K. Follistatin regulates bone morphogenetic protein-7 (BMP-7) activity to stimulate embryonic muscle growth. *Dev Biol.* 1 mars 2002;243(1):115-27.
334. Thompson TB, Lerch TF, Cook RW, Woodruff TK, Jardetzky TS. The structure of the follistatin:activin complex reveals antagonism of both type I and type II receptor binding. *Dev Cell.* oct 2005;9(4):535-43.
335. Amthor H, Nicholas G, McKinnell I, Kemp CF, Sharma M, Kambadur R, et al. Follistatin complexes Myostatin and antagonises Myostatin-mediated inhibition of myogenesis. *Dev Biol.* 1 juin 2004;270(1):19-30.
336. Smith WC, Harland RM. Expression cloning of noggin, a new dorsalizing factor localized to the Spemann organizer in *Xenopus* embryos. *Cell.* 4 sept 1992;70(5):829-40.
337. Garcia-Fernández J, D'Aniello S, Escrivà H. Organizing chordates with an organizer. *BioEssays News Rev Mol Cell Dev Biol.* juill 2007;29(7):619-24.
338. Khokha MK, Hsu D, Brunet LJ, Dionne MS, Harland RM. Gremlin is the BMP antagonist required for maintenance of Shh and Fgf signals during limb patterning. *Nat Genet.* juill 2003;34(3):303-7.
339. Tan S, Huan P, Liu B. Expression patterns indicate that BMP2/4 and Chordin, not BMP5-8 and Gremlin, mediate dorsal-ventral patterning in the mollusk *Crassostrea gigas*. *Dev Genes Evol.* 2017;227(2):75-84.
340. Zhao J, Shi W, Chen H, Warburton D. Smad7 and Smad6 Differentially Modulate Transforming Growth Factor β -induced Inhibition of Embryonic Lung Morphogenesis. *J Biol Chem.* 8 avr 2000;275(31):23992-7.
341. Huang Y, Wang Z, Zhang J, Liang L, Chen F, Zhao J. [Smad7 instead of Smad6 blocks epithelial-mesenchymal transition induced by TGF-beta in human renal proximal tubule epithelial cells]. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi Chin J Cell Mol Immunol.* nov 2008;24(11):1074-8.
342. Stopa M, Anhuf D, Terstegen L, Gatsios P, Gressner AM, Dooley S. Participation of Smad2, Smad3, and Smad4 in transforming growth factor beta (TGF-beta)-induced activation of Smad7. THE TGF-beta response element of the promoter requires functional Smad binding element and E-box sequences for transcriptional regulation. *J Biol Chem.* 22 sept 2000;275(38):29308-17.
343. Imamura T, Takase M, Nishihara A, Oeda E, Hanai J, Kawabata M, et al. Smad6 inhibits signalling by the TGF-beta superfamily. *Nature.* 9 oct 1997;389(6651):622-6.
344. Goto K, Kamiya Y, Imamura T, Miyazono K, Miyazawa K. Selective inhibitory effects of Smad6 on bone morphogenetic protein type I receptors. *J Biol Chem.* 13 juill 2007;282(28):20603-11.

345. Hata A, Lagna G, Massagué J, Hemmati-Brivanlou A. Smad6 inhibits BMP/Smad1 signaling by specifically competing with the Smad4 tumor suppressor. *Genes Dev.* 15 janv 1998;12(2):186-97.
346. Murakami G, Watabe T, Takaoka K, Miyazono K, Imamura T. Cooperative inhibition of bone morphogenetic protein signaling by Smurf1 and inhibitory Smads. *Mol Biol Cell.* juill 2003;14(7):2809-17.
347. Lin X, Liang Y-Y, Sun B, Liang M, Shi Y, Brunnicardi FC, et al. Smad6 recruits transcription corepressor CtBP to repress bone morphogenetic protein-induced transcription. *Mol Cell Biol.* déc 2003;23(24):9081-93.
348. Katagiri T, Yamaguchi A, Komaki M, Abe E, Takahashi N, Ikeda T, et al. Bone morphogenetic protein-2 converts the differentiation pathway of C2C12 myoblasts into the osteoblast lineage. *J Cell Biol.* déc 1994;127(6 Pt 1):1755-66.
349. Yamamoto N, Akiyama S, Katagiri T, Namiki M, Kurokawa T, Suda T. Smad1 and smad5 act downstream of intracellular signalings of BMP-2 that inhibits myogenic differentiation and induces osteoblast differentiation in C2C12 myoblasts. *Biochem Biophys Res Commun.* 18 sept 1997;238(2):574-80.
350. Sémonin O, Fontaine K, Daviaud C, Ayuso C, Lucotte G. Identification of three novel mutations of the noggin gene in patients with fibrodysplasia ossificans progressiva. *Am J Med Genet.* 1 sept 2001;102(4):314-7.
351. Kaplan FS, Le Merrer M, Glaser DL, Pignolo RJ, Goldsby RE, Kitterman JA, et al. Fibrodysplasia ossificans progressiva. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* mars 2008;22(1):191-205.
352. Lounev VY, Ramachandran R, Wosczyzna MN, Yamamoto M, Maidment ADA, Shore EM, et al. Identification of progenitor cells that contribute to heterotopic skeletogenesis. *J Bone Joint Surg Am.* 1 mars 2009;91(3):652-63.
353. Wang H, Noulet F, Edom-Vovard F, Tozer S, Le Grand F, Duprez D. Bmp signaling at the tips of skeletal muscles regulates the number of fetal muscle progenitors and satellite cells during development. *Dev Cell.* 20 avr 2010;18(4):643-54.
354. Pourquoié O, Fan CM, Coltey M, Hirsinger E, Watanabe Y, Bréant C, et al. Lateral and axial signals involved in avian somite patterning: a role for BMP4. *Cell.* 9 févr 1996;84(3):461-71.
355. Hirsinger E, Duprez D, Jouve C, Malapert P, Cooke J, Pourquoié O. Noggin acts downstream of Wnt and Sonic Hedgehog to antagonize BMP4 in avian somite patterning. *Dev Camb Engl.* nov 1997;124(22):4605-14.
356. Amthor H, Christ B, Patel K. A molecular mechanism enabling continuous embryonic muscle growth - a balance between proliferation and differentiation. *Dev Camb Engl.* févr 1999;126(5):1041-53.

357. Amthor H, Christ B, Weil M, Patel K. The importance of timing differentiation during limb muscle development. *Curr Biol CB*. 21 mai 1998;8(11):642-52.
358. Tylzanowski P, Mebis L, Luyten FP. The Noggin null mouse phenotype is strain dependent and haploinsufficiency leads to skeletal defects. *Dev Dyn Off Publ Am Assoc Anat*. juin 2006;235(6):1599-607.
359. Ono Y, Calhabeu F, Morgan JE, Katagiri T, Amthor H, Zammit PS. BMP signalling permits population expansion by preventing premature myogenic differentiation in muscle satellite cells. *Cell Death Differ*. févr 2011;18(2):222-34.
360. Friedrichs M, Wirsdörfer F, Flohé SB, Schneider S, Wuelling M, Vortkamp A. BMP signaling balances proliferation and differentiation of muscle satellite cell descendants. *BMC Cell Biol*. 6 juin 2011;12(1):26.
361. Clever JL, Sakai Y, Wang RA, Schneider DB. Inefficient skeletal muscle repair in inhibitor of differentiation knockout mice suggests a crucial role for BMP signaling during adult muscle regeneration. *Am J Physiol Cell Physiol*. mai 2010;298(5):C1087-1099.
362. Méjat A, Decostre V, Li J, Renou L, Kesari A, Hantaï D, et al. Lamin A/C-mediated neuromuscular junction defects in Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *J Cell Biol*. 12 janv 2009;184(1):31-44.
363. Wang Y, Herron AJ, Worman HJ. Pathology and nuclear abnormalities in hearts of transgenic mice expressing M371K lamin A encoded by an LMNA mutation causing Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Hum Mol Genet*. 15 août 2006;15(16):2479-89.
364. Zhang H, Kieckhafer JE, Cao K. Mouse models of laminopathies. *Aging Cell*. 1 févr 2013;12(1):2-10.
365. Broers JLV, Peeters EAG, Kuijpers HJH, Endert J, Bouten CVC, Oomens CWJ, et al. Decreased mechanical stiffness in LMNA-/- cells is caused by defective nucleo-cytoskeletal integrity: implications for the development of laminopathies. *Hum Mol Genet*. 1 nov 2004;13(21):2567-80.
366. Burke B, Stewart CL. The laminopathies: the functional architecture of the nucleus and its contribution to disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2006;7:369-405.
367. Bakay M, Wang Z, Melcon G, Schiltz L, Xuan J, Zhao P, et al. Nuclear envelope dystrophies show a transcriptional fingerprint suggesting disruption of Rb-MyoD pathways in muscle regeneration. *Brain J Neurol*. avr 2006;129(Pt 4):996-1013.
368. Sartori R, Schirwis E, Blaauw B, Bortolanza S, Zhao J, Enzo E, et al. BMP signaling controls muscle mass. *Nat Genet*. nov 2013;45(11):1309-18.
369. Scharner J, Gnocchi VF, Ellis JA, Zammit PS. Genotype-phenotype correlations in laminopathies: how does fate translate? *Biochem Soc Trans*. févr 2010;38(Pt 1):257-62.

370. Bertrand AT, Chikhaoui K, Yaou RB, Bonne G. Clinical and genetic heterogeneity in laminopathies. *Biochem Soc Trans.* déc 2011;39(6):1687-92.
371. Malashicheva A, Bogdanova M, Zibirnyk A, Smolina N, Ignatieva E, Freilikhman O, et al. Various lamin A/C mutations alter expression profile of mesenchymal stem cells in mutation specific manner. *Mol Genet Metab.* juill 2015;115(2-3):118-27.
372. Furutani Y, Umemoto T, Murakami M, Matsui T, Funaba M. Role of endogenous TGF- β family in myogenic differentiation of C2C12 cells. *J Cell Biochem.* févr 2011;112(2):614-24.
373. Umemoto T, Furutani Y, Murakami M, Matsui T, Funaba M. Endogenous Bmp4 in myoblasts is required for myotube formation in C2C12 cells. *Biochim Biophys Acta.* déc 2011;1810(12):1127-35.
374. Winbanks CE, Chen JL, Qian H, Liu Y, Bernardo BC, Beyer C, et al. The bone morphogenetic protein axis is a positive regulator of skeletal muscle mass. *J Cell Biol.* 28 oct 2013;203(2):345-57.
375. Chou H-J, Lai D-M, Huang C-W, McLennan IS, Wang H-D, Wang P-Y. BMP4 is a peripherally-derived factor for motor neurons and attenuates glutamate-induced excitotoxicity in vitro. *PLoS One.* 2013;8(3):e58441.
376. Benavente F, Pinto C, Parada M, Henríquez JP, Osses N. Bone morphogenetic protein 2 inhibits neurite outgrowth of motor neuron-like NSC-34 cells and up-regulates its type II receptor. *J Neurochem.* août 2012;122(3):594-604.
377. Klaus A, Müller M, Schulz H, Saga Y, Martin JF, Birchmeier W. Wnt/ β -catenin and Bmp signals control distinct sets of transcription factors in cardiac progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 3 juill 2012;109(27):10921-6.
378. Kruithof BPT, Duim SN, Moerkamp AT, Goumans M-J. TGF β and BMP signaling in cardiac cushion formation: lessons from mice and chicken. *Differ Res Biol Divers.* juill 2012;84(1):89-102.
379. Méjat A, Decostre V, Li J, Renou L, Kesari A, Hantaï D, et al. Lamin A/C-mediated neuromuscular junction defects in Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *J Cell Biol.* 12 janv 2009;184(1):31-44.
380. Millat G, Bouvagnet P, Chevalier P, Sebbag L, Dulac A, Dauphin C, et al. Clinical and mutational spectrum in a cohort of 105 unrelated patients with dilated cardiomyopathy. *Eur J Med Genet.* déc 2011;54(6):e570-575.
381. Mounkes LC, Burke B, Stewart CL. The A-type lamins: nuclear structural proteins as a focus for muscular dystrophy and cardiovascular diseases. *Trends Cardiovasc Med.* oct 2001;11(7):280-5.
382. Nakao A, Afrakhte M, Morén A, Nakayama T, Christian JL, Heuchel R, et al. Identification of Smad7, a TGF β -inducible antagonist of TGF β signalling. *Nature.* 9 oct 1997;389(6651):631-5.

383. Chen JL, Walton KL, Hagg A, Colgan TD, Johnson K, Qian H, et al. Specific targeting of TGF- β family ligands demonstrates distinct roles in the regulation of muscle mass in health and disease. *Proc Natl Acad Sci*. 27 juin 2017;114(26):E5266-75.
384. Cohen TV, Kollias HD, Liu N, Ward CW, Wagner KR. Genetic disruption of Smad7 impairs skeletal muscle growth and regeneration. *J Physiol*. 1 juin 2015;593(11):2479-97.
385. Karystinou A, Roelofs AJ, Neve A, Cantatore FP, Wackerhage H, De Bari C. Yes-associated protein (YAP) is a negative regulator of chondrogenesis in mesenchymal stem cells. *Arthritis Res Ther*. 30 mai 2015;17:147.
386. Nishio M, Sugimachi K, Goto H, Wang J, Morikawa T, Miyachi Y, et al. Dysregulated YAP1/TAZ and TGF- β signaling mediate hepatocarcinogenesis in Mob1a/1b-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 5 janv 2016;113(1):E71-80.
387. Stantzou A, Schirwis E, Swist S, Alonso-Martin S, Polydorou I, Zarrouki F, et al. BMP signaling regulates satellite cell dependent postnatal muscle growth. *Development*. 1 janv 2017;dev.144089.

Altérations de la voie de signalisation BMP4 responsables de la différenciation accélérée de myoblastes mutés sur le gène *LMNA*.

Résumé

Les lamines A et C sont deux composants majeurs de la lamina nucléaire, réseau de filaments intermédiaires situé sous la membrane nucléaire interne. Les mutations du gène *LMNA*, codant les lamines A/C, ont été associées à de nombreuses pathologies humaines, appelées laminopathies, et affectant un ou plusieurs tissus dont le muscle. Les mécanismes physiopathologiques sous-jacents ne sont encore que partiellement élucidés. Les lamines A/C jouant un rôle crucial dans l'architecture nucléaire et l'organisation de la chromatine, l'hypothèse d'une altération de l'expression de facteurs de transcription ou de gènes tissu-spécifiques a été formulée. De plus, au niveau musculaire, il a été décrit que les lamines A/C jouent un rôle majeur dans la mise en place d'une différenciation musculaire efficace.

Afin d'identifier des altérations potentielles au sein des voies de signalisation régulant la différenciation musculaire, nous avons utilisé un modèle de myoblastes murins conditionnellement immortalisés et comparé le profil d'expression entre les myoblastes sauvages et inactivés pour le gène *Lmna* (*Lmna*^{-/-}). Nous avons ainsi identifié deux altérations majeures de la voie BMP (Bone Morphogenetic Pathway) : la diminution de l'expression du ligand *Bmp4* et l'augmentation de celle de *Smad6*, un inhibiteur intracellulaire de la voie. Cette surexpression de *Smad6* est responsable d'une séquestration cytoplasmique des *Smads* 1, 5 et 8 phosphorylées et d'une diminution de l'expression des gènes cibles, *Id1* et *Id2*. Les myoblastes *Lmna*^{-/-} montrent une différenciation myogénique prématurée, phénotype réversible par des expériences d'ARN interférent ciblant *Smad6*. Enfin, nous avons montré que ces défauts sont retrouvés dans des myoblastes humains de patient porteur hétérozygote de la mutation *LMNA* p.Arg310X.

Ces résultats apportent un nouveau mécanisme physiopathologique des laminopathies musculaires et identifient une nouvelle cible thérapeutique potentielle.

Mots-clés :

Altered BMP4 pathway leads to premature differentiation of *LMNA* mutated cells.

Summary

LMNA gene encodes lamins A and C, two major components of the nuclear lamina, a network of intermediate filaments underlying the inner nuclear membrane. *LMNA* mutations have been associated with a wide spectrum of human diseases collectively called "laminopathies" affecting one or several tissues, such as muscles. The physiopathological mechanisms underlying laminopathies remain unclear. Given the crucial role of lamins A/C in nuclear architecture and chromatin organization, the "gene regulation" hypothesis has been proposed. It suggests that *LMNA* mutations could alter in a tissue-specific manner transcription factors and/or genes expression. Moreover, lamins A/C have been described as important regulators in muscle differentiation regulation.

To identify potential alterations in signaling pathways regulating muscle differentiation in *LMNA*-mutated myoblasts, we used a previously described model of conditionally immortalized murine myoblasts and compared gene expression profiles in wild-type and *Lmna*^{-/-} H-2K myoblasts. We identified two major alterations of the Bone Morphogenetic Protein (BMP) pathway in *Lmna*^{-/-} myoblasts: *Bmp4* downregulation and *Smad6* overexpression. We demonstrated that *Smad6* overexpression lead to *Smad1/5/8* sequestration in the cytoplasm and to the downregulation of their target genes, *Id1* and *Id2*. As a consequence, *Lmna*-null myoblasts displayed a premature differentiation which could be rescued by downregulating *Smad6* expression. Finally, we showed that these defects are relevant for human laminopathies as they are also present in myoblasts from a human patient carrying a *LMNA*^{+ / Q310X} mutation. Taken together, these results provide a potential mechanism for the muscle stem cell exhaustion and muscle atrophy observed in muscle laminopathies and identify a new therapeutic target likely to reverse pathological phenotypes.

Keywords :

INTITULE et ADRESSE DU LABORATOIRE

Institut NeuroMyoGène – CNRS UMR 5310 - INSERM U1217 - Université de Lyon - Université Claude Bernard Lyon 1 – Equipe « Muscle Nuclear & Cytoskeleton Architecture »

8 Avenue Rockefeller – 69008 Lyon

Laboratoire de Biochimie et Biologie Moléculaire Grand Est – Laboratoire de Cardiogénétique moléculaire – Hospices Civils de Lyon – Groupement Hospitalier Est

Centre de Biologie et de Pathologie Est – 59 boulevard Pinel – 69677 Bron Cedex