



**HAL**  
open science

# Mécanotransduction au cours du cycle cellulaire : Rôle de la déformation de l'enveloppe nucléaire

Julien Aureille

► **To cite this version:**

Julien Aureille. Mécanotransduction au cours du cycle cellulaire : Rôle de la déformation de l'enveloppe nucléaire. Biologie cellulaire. Université Grenoble Alpes, 2018. Français. NNT : 2018GREAV072 . tel-02127487

**HAL Id: tel-02127487**

**<https://theses.hal.science/tel-02127487>**

Submitted on 13 May 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.

## THÈSE

Pour obtenir le grade de

### **DOCTEUR DE LA COMMUNAUTE UNIVERSITE GRENOBLE ALPES**

Spécialité : Biologie Cellulaire

Arrêté ministériel : 25 mai 2016

Présentée par

**Julien AUREILLE**

Thèse dirigée par **Sandrine FRABOULET**, Maître de conférences universitaire, UGA  
co-encadrée par **Christophe GUILLUY**, Chargé de recherche INSERM

préparée au sein du Centre de Recherche Oncologie/Développement : **Institut pour  
l'Avancée des Biosciences**, Grenoble

dans l'École Doctorale Chimie et Science du Vivant

## **Mécanotransduction au cours du cycle cellulaire : rôle de la déformation de l'enveloppe nucléaire**

### ***Mechanotransduction during the cell cycle : role of nuclear envelope deformation***

Thèse soutenue publiquement le **19 décembre 2018**,  
devant le jury composé de :

**Isabelle TARDIEUX (Présidente du jury)**

Directrice de recherche INSERM, Institut pour l'Avancée des Biosciences INSERM  
U1209 CNRS UMR 5309, Grenoble, Examinatrice

**Catherine COIRALT**

Directrice de recherche INSERM, Institut de Myologie INSERM UMRS 974 - UPMC  
Université Paris 6 – G.H. Pitié-Sapétrière, Paris, Rapporteur

**Roland LE BORGNE**

Directeur de recherche CNRS, Institut de Génétique & Développement de Rennes  
Faculté de Médecine Campus santé de Villejean – Rennes, Rapporteur

**Laurent MULLER**

Chargé de recherche INSERM, Centre interdisciplinaire de recherche en biologie  
(CIRB) UMR7241, Collège de France, Paris, Examinateur



# Remerciements

En premier lieu, je tiens à remercier M<sup>me</sup> Catherine Coirault et M. Roland Le Borgne, qui ont accepté d'être les rapporteurs de cette thèse et pour le temps qu'ils ont bien voulu consacrer à la lecture de ce manuscrit ainsi que pour leur participation au jury. Je remercie également M<sup>me</sup> Isabelle Tardieu et M. Laurent Muller pour avoir consenti à être examinateurs lors de ma soutenance.

J'adresse toute ma gratitude au Directeur de l'Institut de l'Avancée des Biosciences, M. Pierre Hainaut qui m'a permis d'effectuer ma thèse au sein de son laboratoire.

Je remercie également Benoit Ladoux, Thomas Boudou et Cyril Boyault pour leurs participations à mes comités de suivi de thèse au cours desquels des précisions et des points de réflexion particulièrement intéressants ont contribué à l'avancement de ce projet.

Je tiens à adresser mes profonds remerciements à Christophe Guilluy, mon encadrant de thèse, qui grâce à ses conseils précieux et le temps qu'il a bien voulu me consacrer, m'a permis d'avancer considérablement dans ma formation.

Grâce à Christophe, j'ai découvert le monde extraordinaire de la science fondamentale. Par la suite, lorsque j'ai quitté Nantes pour Grenoble dans le but d'intégrer sa nouvelle équipe, c'était bien plus qu'un simple choix, c'était une évidence. Cela m'a ouvert de nouveaux horizons, j'ai pu travailler avec de nouvelles personnes, j'ai découvert de nouvelles disciplines. Sa vision scientifique a été d'une grande inspiration pour moi tout au long de ces années. Christophe, je te remercie sincèrement pour ton écoute, ton soutien, ta bienveillance, et pour toutes les discussions enrichissantes que j'ai eu la joie de partager avec toi.

Je tiens chaleureusement à remercier Sandrine Fraboulet, ma directrice de thèse, pour sa disponibilité, et son soutien. Je la remercie pour tous ses conseils qui ont contribué à alimenter ma réflexion. Merci pour m'avoir donné tous les outils nécessaires à la réalisation de cette thèse que j'ai pu réaliser grâce à toi dans d'excellentes conditions.

A tous les membres de l'équipe GUILLUY, un grand merci !

Merci Lydia pour ta gentillesse, ton dynamisme et toutes les petites attentions que tu as régulièrement porté à l'ensemble de l'équipe. Grâce à toi, porter la blouse au labo n'est plus si dur ! Merci pour toutes ces photos de paysages outre-Atlantique que tu

nous donne la chance de contempler. J'ai maintenant quelques idées de nos futures destinations. Merci également de m'avoir fait découvrir le hockey sur glace. Difficile de ne pas se rappeler cette finale des play-offs en ligue Magnus 2017, Grenoble vs Rouen. J'ai également été ravi de rencontrer Tanguy, mes amitiés à lui. Même si je n'ai pas été le plus facile à convaincre au départ, je trouve que tu as fait un travail remarquable d'AP, en nous apportant cet aspect essentiel avec tact et diplomatie. Merci également pour ta disponibilité et les super soirées que nous avons passées chez toi.

Valentin, moi qui suis un adapte fervent du bon beurre d'Echiré et des œufs de poules élevées au plein air de ma campagne charentaise, j'avoue que j'ai été agréablement surpris par la qualité de ta cuisine végétarienne ! Merci pour cette découverte. Merci également pour ton soutien au cours de cette dernière année de thèse. J'espère que tu continueras à garder cette passion pour la science et que tu perceras un jour le secret de l'histone H3 et de son omni-variabilité !

Merci Monika pour m'avoir permis de découvrir la culture polonaise grâce entre autres, à tous les gâteaux/chocolats que tu nous fais goûter ! Merci de nous faire découvrir les lampes à plasma portatives, et les substrats de PDMS sous-pression. Je suis impatient de commencer à travailler avec toi dès janvier et de découvrir ton univers de biophysicienne. Merci également pour tes conseils quant à l'arrivée de « bébé ». Si j'ai bien retenu une leçon, c'est que le rhume du bébé est pire que tout !

Thank you Ben for all your advices regarding my english! It's very nice to have you in the team. To know you makes me want to better learn about UK culture. I hope you enjoy your stay in Grenoble. Be care with the bus and have fun with your new VTT!

Pour terminer avec l'équipe de Christophe, j'aimerais tout particulièrement remercier Néma. Merci Néma pour toutes ces années où nous avons travaillé ensemble. Je te connais maintenant depuis 2012 et nous revoie encore courir le long de l'Isère à Nantes en se demandant ce qu'on deviendrait dans les prochaines années. Aujourd'hui nous y sommes, tu vas être *Research Associate* à Cambridge, et je termine ma thèse à 600 km de l'amphithéâtre Denis Escande ! Je te souhaite toute la réussite que tu mérites à Cambridge. J'espère te revoir avec Alexandre autour de ce fameux barbecue et en attendant, merci pour tout, tu me manqueras, c'est certain.

Merci professeur Rio pour vos conseils avisés ces dernières années sur ce monde abstrait qu'est la biologie moléculaire ! C'était vraiment chouette de te voir dans la région dauphinoise. Je ne démords pas l'idée de te mettre dans une valise en bois de hêtre (ou du noyer) avec Nathalie Vaillant, pendant votre sommeil, pour vous ramener ici à

Grenoble. Il faut juste qu'on planche, avec Christophe et Nájma, sur le décor de l'IAB pour vous faire croire que vous êtes encore au 1087 !

Merci Nathalie Vaillant pour ta bonne humeur, ton sens de l'humour et ta gentillesse qui resteront à jamais graver dans ma mémoire. Il faudra qu'on se mette ensemble les classiques des années 90 (les films que Christophe aime par-dessus tout) : Armageddon, Rock, etc...

Merci à l'équipe 3, Laurence Lafanechère, Sacnicté Ramirez-Rios, Lauralie Peronne, Karin Sadoul, Anne-Sophie Ribba et Sophie Michallet. Nous avons partagé ensemble les bureaux et laboratoires pendant ces 3 ans et quoi de mieux que de travailler dans de telles conditions. Merci Laurence pour tous ces festins d'équipe que nous avons partagés chez toi sans oublier le fameux guacamole de Sacnicté.

Merci à mes conscrits de thèse ! Lauralie, merci pour ta gentillesse et ton soutien. Être deux thésards dans un même bureau permet de relativiser ! C'est toujours plus facile d'aborder les choses lorsqu'on est dans le même bateau. Franky, Flo et Arnaud, merci pour ces soirées Raclette-Chicha et ces moments de debriefing que nous avons passés au Nippon Grill. Thanks so much Tomas for your help at LIPhy. I hope (and I am pretty sure about that) you will enjoy your stay in Australia !

Merci Sacnicté pour tout ! Tu as été ce souffle de fraîcheur indispensable durant ces 3 années. Grâce à toi, j'ai rajouté quelques mots à mon vocabulaire espagnol : « un poquito más » pour te redemander du ponche Mexicain que tu nous as préparé l'année dernière avec Amaris. Merci pour ta gentillesse et ton soutien. Merci aussi pour les spots de grimpe que tu m'as fait découvrir dans le secteur. En 3 ans, nous n'avons jamais trouvé le temps d'aller grimper ensemble mais j'espère qu'on trouvera une occasion avant que je parte et j'espère bien faire la connaissance de ton mari et de tes petits grimpeurs !

Merci Cyril Boyault pour toutes nos discussions et tous tes conseils. J'ai pu, grâce à toi, côtoyer rapidement le monde circadien qui est passionnant et si l'avenir me le permet, j'aspire un jour à approfondir le sujet. Je te remercie pour ces *Big Pictures* que tu nous dessines au travers des réseaux d'intéraction que tu mets en place et qui nous facilitent grandement la tâche !

Merci Charlotte Bonnet de nous avoir passé toutes ces commandes et de t'être occupée de nous ! Je pense que ça n'a pas toujours été évident, surtout au début, lorsque l'on passait une commande toutes les heures ! Merci pour ton efficacité et ta bonne humeur. Un jour, promis, je commanderai un tableau Picasso ! Merci également Aude Marchand

pour ta grande disponibilité. Merci à toutes les deux d'avoir accepté de céder votre bureau dès notre arrivée, il faut avouer que cette magnifique vue sur Décathlon, n'a pas de prix !

Merci Jacques, Mylène et Alexeï pour tous vos conseils sur la plateforme de microscopie, de m'avoir rapidement formé dès mon arrivée et pour votre aide à chaque fois que j'ai rencontré un problème sur l'OBFR.

Merci Sandrine Benitski-Curtet pour ton accueil lors de mon arrivée à l'IAB en 2015 et encore félicitation pour cette titularisation !

Merci Michail Gidopoulos et Alexandre Babin pour votre support tout au long de ces années. Vous vous montrez toujours disponibles et de surcroît avec le sourire.

Merci Corinne Albiges-Rizo de m'avoir accueilli dans ton équipe durant mes premiers mois à l'Institut. J'en profite pour remercier également l'ensemble de l'équipe 1 pour leur accueil et leur gentillesse à mon égard. Ce fut très agréable de commencer dans ces conditions.

Merci à l'ensemble de mes amis et à ma famille et plus particulièrement à mes parents qui ont été d'un grand soutien tout au long de cette aventure. Une pensée particulière à mon frère, sa femme, et mes deux petits neveux qui vivent au Japon. Vous me manquez !

Pour terminer, merci du fond du cœur à mon épouse Bertille, qui redéfinit chaque jour la notion de bonheur et pour l'arrivée de ce petit bébé que nous attendons avec impatience.

*« Il est inutile d'accomplir par un plus grand nombre de moyens ce qu'un nombre moindre de moyens suffit à produire. »*

Guillaume d'Ockham (1280-1349)

## PREFACE

La question de comprendre comment les tissus et les organismes vivants perçoivent l'environnement mécanique et comment ils y répondent, a probablement fasciné les scientifiques depuis longtemps mais a émergé dans la littérature depuis 1870 avec les travaux de Julius Wolff concernant l'adaptation des os aux forces (Wolff, 2010), ou l'ouvrage de référence de D'Arcy Thompson lorsqu'il s'intéressait en 1917 à comprendre le rôle de la gravité sur la forme et les fonctions des organismes vivants (Thompson, 1942). Une cinquantaine d'année plus tard, les premières descriptions de la mécanotransduction apparaissaient avec les théories de la réciprocité « matrice extracellulaire-expression de gènes » de Mina Bissell (Bissell et al., 1982), la théorie du *mecanostat* de Harold Frost (Frost, 1988), et les travaux pionniers de tous ceux qui étudiaient le cytosquelette et les adhérences (Burrige, 1981; Folkman and Moscona, 1978; Sims et al., 1992; White et al., 1983; Wong et al., 1983). Leurs travaux visaient à disséquer d'un point de vue moléculaire et à modéliser, les mécanismes qui permettent la transduction dans la cellule des signaux mécaniques et leurs transformations en événements biochimiques. En 2011, Martin Schwartz proposa de diviser la mécanotransduction en trois étapes de processus moléculaires dynamiques: i) la transmission des forces mécaniques (ou mécanotransmission) ii) la mécanosensibilité, et enfin iii) la réponse à l'environnement mécanique (ou mécanoréponse) (Hoffman et al., 2011). Cette proposition a évolué au gré des nouvelles réponses apportées dans ce domaine de recherche, mais reste à ce jour, une définition communément acceptée. Néanmoins, il semble important de souligner que l'appartenance à l'une ou l'autre de ces catégories n'est en rien mutuellement exclusive. Au contraire, il apparaît souvent que les acteurs de la mécanotransduction appartiennent à deux voir à l'ensemble de cette compartimentation. Par exemple, les filaments d'actomyosine qui forment les fibres de stress sont nécessaires pour transmettre les signaux mécaniques, mais elles sont également le résultat de la réponse de la cellule à ces mêmes signaux.

L'émergence des outils biotechnologiques ces dernières années, avec notamment la création des biosenseurs et les approches d'immunofluorescence de transfert d'énergie par résonance de type Förster, a permis de mettre en exergue le rôle clé de la maturation des adhérences et du remodelage du cytosquelette dans le contrôle des fonctions cellulaires, en réponse aux stimuli mécaniques. En revanche, les travaux sur l'implication du noyau cellulaire dans les processus de mécanotransduction ont commencé seulement depuis peu, à prendre un intérêt tout particulier, bien que Donald



Ingber l'aït anticipé au début des années 90 (Maniotis et al., 1997; Sims et al., 1992). Les changements importants de forme du noyau, observés lors des remodelages du cytosquelette, ou lors de la migration dans des espaces confinés, favoriseraient ainsi l'activation de voies de signalisation de mécanotransduction. Si l'on applique le principe du rasoir d'Ockham, ou principe de simplicité ou de parcimonie, l'intérêt d'un noyau sensible à l'environnement mécanique serait un gain de temps et d'énergie pour la cellule. Sans pour autant court-circuiter les voies de signalisation contrôlées par les adhérences et le cytosquelette, ces processus de mécanotransduction déclenchés à l'intérieur du noyau permettraient de moduler l'expression de gènes en parallèle ou en synergie et il n'est peut-être pas étonnant que de plus en plus de preuves aillent dans ce sens. C'est dans ce contexte que j'ai commencé ma thèse dans l'équipe de Christophe Guilluy, au laboratoire de recherche *Institute for Advanced Biosciences* de Grenoble. Je me suis intéressé à savoir si des changements de forme du noyau, pouvaient à eux seuls, influencer le comportement cellulaire.

# SOMMAIRE

Remerciements .....	I
Préface .....	VI
Liste des publications et des communications.....	3
Liste des figures .....	5
Liste des tableaux .....	7
Liste des abréviations .....	8
<b>INTRODUCTION - Partie I.....</b>	<b>10</b>
<b>I. L'environnement mécanique de la cellule.....</b>	<b>11</b>
1) La matrice extracellulaire.....	11
2) Les différents types de forces .....	15
<b>II. Transmission des forces mécaniques et mécanosensibilité.....</b>	<b>18</b>
1) Transmission des forces .....	18
2) Les protéines sensibles aux forces .....	19
3) Mécanosensibilité des complexes d'adhérence.....	20
<b>III. La réponse cellulaire aux forces .....</b>	<b>24</b>
1) Les fibres de stress.....	24
2) La maturation des complexes d'adhérence.....	28
3) L'activation des cofacteurs de transcription .....	30
<b>IV. Exemple de fonctions contrôlées par l'environnement mécanique.....</b>	<b>34</b>
1) Le cycle cellulaire.....	34
2) La différenciation .....	36
3) La migration.....	38
Résumé chapitre I .....	41
<b>INTRODUCTION - Partie II.....</b>	<b>42</b>
<b>I. L'enveloppe nucléaire.....</b>	<b>43</b>
1. La lamina.....	43
1. Les protéines associées à la lamina .....	47
2. Le complexe LINC.....	50
3. Les complexes du pore nucléaire.....	54
<b>II. Contraintes mécaniques et déformation du noyau.....</b>	<b>57</b>
1. Déformation de l'enveloppe nucléaire en réponse aux contraintes mécaniques .....	57
2. Les propriétés mécaniques du noyau .....	59
3. Le cytosquelette associé au noyau .....	61
4. Déformation nucléaire au cours de l'adhérence.....	63
5. Déformation nucléaire au cours de la migration.....	64

<b>III. Conséquence de la déformation du noyau</b> .....	67
1. Déformation du noyau et mécanotransduction nucléaire.....	68
2. La déformation du noyau régule les fonctions cellulaires.....	69
<b>Résumé chapitre II</b> .....	75
<b>Objectif de la thèse</b> .....	76
<b>Matériel et Méthodes</b> .....	78
1) Culture cellulaire et réactifs.....	79
2) Anticorps et marquage de l'actine.....	79
3) Compression nucléaire et coussin d'agarose.....	80
4) Plasmides.....	81
5) Analyse de l'activité des facteurs de transcription.....	82
6) Microscopie.....	83
7) Micromotifs .....	83
8) shRNAs.....	84
9) siRNAs.....	84
10) Microscopie à force atomique.....	85
11) PCR en temps réel avec rétrotranscription.....	85
12) Cytométrie en flux.....	87
13) Réseau d'intéraction protéine--protéine.....	87
14) Statistique .....	88
<b>Résultats</b> .....	89
Article n°1 <i>Nuclear Shape regulates AP1 and TEAD-dependent gene expression</i> .....	90
<b>Discussion et Perspectives</b> .....	117
<b>Conclusion</b> .....	129
<b>ANNEXES</b> .....	131
Article n°2 <i>SUN2 regulates mitotic duration in response to extracellular matrix rigidity</i> .....	132
Article n°3 <i>Analyzing Mechanotransduction Through the LINC Complex in Isolated Nuclei</i> .....	156
Article n°4 <i>Analyzing Cell Surface Adhesion Remodeling in Response to Mechanical Tension Using Magnetic Beads</i> .....	165
Revue n°1 <i>Mechanotransduction via the nuclear envelope a distance reflection of the cell surface</i> .....	173
Revue n°2 <i>Under Pressure : Mechanical Stress Management in the Nucleus</i> .....	183
<b>Références bibliographiques</b> .....	195

# LISTE DES PUBLICATIONS ET DES COMMUNICATIONS

## Articles

**Nuclear shape regulates AP1 and TEAD-dependent gene expression.**

Aureille J, Buffière-Ribot V, Boyault C, Pernet L, Andersen T, Bacola G, Balland M, Fraboulet S, Van Landeghem L and Guilluy C

Article soumis dans PNAS

**SUN2 regulates mitotic duration in response to extracellular matrix rigidity.**

Belaadi N, Pernet L, Aureille J, Chadeuf G, Rio M, Nguyen L, Vaillant N, Louarn G, Vitiello E, Loirand G and Guilluy C

Lettre soumise dans Nature Communications

**Analyzing Mechanotransduction Through the LINC Complex in Isolated Nuclei.**

Belaadi N, Millon-Frémillon A, Aureille J, Guilluy C

Methods Mol Biol. 2018

**Analyzing Cell Surface Adhesion Remodeling in Response to Mechanical Tension Using Magnetic Beads.**

Millon-Frémillon A\*, Aureille J\*, Guilluy C (\*Co-auteurs)

J Vis Exp. 2017

## Revues

**Mechanotransduction *via* the nuclear envelope: a distant reflection of the cell surface.**

Aureille J, Belaadi N, Guilluy C

Curr Opin Cell Biol. 2017

**Under Pressure: Mechanical Stress Management in the Nucleus.**

Belaadi N, Aureille J, Guilluy C

Cells. 2016

## Communication orale

**RasGRFs regulate cell survival in response to matrix rigidity**

Avril 2016 - Congrès Printemps de la Cardiologie, Dijon

## Posters

**Mechanotransduction: from nuclear shape to gene expression regulation,** Aureille J, Fraboulet S., Guilluy C.

2017 Journée Annuelle des Doctorants, Grenoble

**RasGRFs regulate cell survival in response to matrix rigidity,** Aureille J, Belaadi N, Loirand G, Guilluy C.

Avril 2016 - Congrès Printemps de la Cardiologie, Montpellier

**The Ras GEFs RasGRFs regulate cell survival in response to matrix rigidity.,** Aureille J, Belaadi N, Loirand G, Guilluy C.

MOLECULAR BIOLOGY OF THE CELL Volume: 26 Meeting Abstract: P2246

Décembre 2015 – *American Society for Cell Biology Meeting*, San Diego

**Formins mediate smooth muscle cell response to matrix stiffening,** Aureille J, Rio M, Vaillant N, Loirand G and Guilluy C.

Mai 2015 - Retraite Institut du Thorax INSERM U1209, St Brévin Les Pins – Prix poster

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1</b> : Représentation de la relation contrainte et déformation au niveau de la peau, du muscle et du cerveau.....	13
<b>Figure 2</b> : Les différents modules d'élasticité des matrices extracellulaires retrouvés dans le corps humain .....	14
<b>Figure 3</b> : Étalement de la cellule en fonction de la topographie de la MEC.....	15
<b>Figure 4</b> : Les forces mécaniques en biologie cellulaire .....	16
<b>Figure 5</b> : Les protéines mécanosensibles jouent le rôle de senseur de l'environnement mécanique. ....	20
<b>Figure 6</b> : Caractérisation de la vinculine.....	21
<b>Figure 7</b> : Exemple des états d'activations de l'intégrine $\alpha L\beta 2$ . ....	22
<b>Figure 8</b> : Les trois types de fibre de stress rencontrés dans une cellule.....	25
<b>Figure 9</b> : Le cytosquelette d'actine en réponse à la rigidité. ....	26
<b>Figure 10</b> : Le cycle de RhoA.....	28
<b>Figure 11</b> : les différents types d'adhérences retrouvés dans une cellule au cours de la migration.....	29
<b>Figure 12</b> : MAL subit une translocation dans le noyau en réponse à une stimulation mécanique .....	31
<b>Figure 13</b> : L'environnement mécanique contrôle l'activité de YAP/TAZ .....	32
<b>Figure 14</b> : les différentes phases du cycle cellulaire et les cyclines impliquées.....	35
<b>Figure 15</b> : La différenciation des cellules souches en fonction de la rigidité de la MEC. ....	37
<b>Figure 16</b> : Schéma illustrant la durotaxis. ....	39
<b>Figure 17</b> : Modèle de prédiction de la méchanosensibilité.....	40
<b>Figure 18</b> : La composition de l'enveloppe nucléaire. ....	43
<b>Figure 19</b> : Illustration schématique de l'assemblage des lamines.....	44
<b>Figure 20</b> : Rapport stœchiométrique de l'expression de lamine A et lamine B, analysé par spectrométrie de masse, dans différents tissus, des cellules primaires et des lignées cellulaires .....	45
<b>Figure 21</b> : La famille des protéines à domaines LEM.....	49
<b>Figure 22</b> : Représentation schématique du complexe LINC.....	50
<b>Figure 23</b> : Caractérisation moléculaire de la protéine SUN2.....	51
<b>Figure 24</b> : Le complexe SUN-KASH. ....	53
<b>Figure 25</b> : Représentation schématique d'un complexe de pore nucléaire. ....	55

<b>Figure 26</b> : Les différentes propriétés visco-élastiques des composants de l'enveloppe nucléaire.....	60
<b>Figure 27</b> : Schéma descriptif de l'actine cap périnucléaire .....	61
<b>Figure 28</b> : Représentation schématique des contraintes mécaniques exercées sur le noyau .....	62
<b>Figure 29</b> : Déformation du noyau au cours de l'étalement.....	64
<b>Figure 30</b> : Représentation schématique de la migration lobopodiale d'un fibroblaste dans un environnement tridimensionnel.....	66
<b>Figure 31</b> : Représentation schématique des différentes approches développées pour caractériser les stimuli mécaniques et topographiques ressentis par la cellule dans leur environnement naturel .....	67
<b>Figure 32</b> : L'organisation fonctionnelle du génome. ....	70
<b>Figure 33</b> : Déformation de l'enveloppe nucléaire et inflammation.....	74
<b>Figure 34</b> : Schéma représentatif de la méthode utilisée pour appliquer une contrainte sur le noyau, indépendamment du cytosquelette.....	81
<b>Figure 35</b> : La forme du noyau contrôle la transition G <sub>1</sub> /S du cycle cellulaire.....	130

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau 1:</b> Laminopathies et gènes associés.....	47
<b>Tableau 2 :</b> Les différentes contraintes mécaniques exercées sur le noyau cellulaire au cours de l'adhérence et durant la migration avec les réponses de l'enveloppe nucléaire associées.....	58
<b>Tableau 3 :</b> Liste des anticorps .....	80
<b>Tableau 4 :</b> Références des sondes utilisées .....	86



## LISTE DES ABREVIATIONS

**Actine F.** Actine Fibrillaire  
**Actine G.** Actine Globulaire  
**AFM.** Microscope à Force Atomique  
**AP-1.** Activator Protein 1  
**ARP2/3.** Actin-Related Protein 2/3  
**ATR.** Ataxia telangiectasia and Rad3-related protein  
**BAF.** Barrier-to-Autointegration Factor  
**Cdc42.** Cell Division Control protein 42 homolog  
**CSM.** Cellules Souches Mésenchymateuses  
**ESCRT III.** Endosomal Sorting Complexes Required for Transport III  
**FAK.** Focal Adhesion Kinase  
**FERM.** 4.1/Ezrin/Radixin/Moesin  
**FHOD1.** FH1/FH2 domain-containing protein 1  
**FRET.** Förster Resonance Energy Transfer  
**GEF-H1.** Guanine Nucleotide Exchange Factor H1  
**H3K27me3.** tri-méthylation sur la lysine 27 de l'histone 3  
**H3K9me3.** tri-méthylation de la lysine 9 sur l'histone 3  
**H4K5ac.** H4 hyperacétylée sur la lysine 5  
**HP1.** Heterochromatin Protein 1  
**Ig.** Immunoglobuline  
**Kank.** KN motif and ankyrin repeat domain-containing protein  
**KASH.** Klarsicht, ANC-1, and Syne Homology  
**LAD.** Lamins-Associated Domain  
**LAP.** Lamina-associated Polypeptides  
**LAP2.** Lamina-Associated Polypeptides 2  
**LARG.** Leukemia-Associated Rho-GEF  
**LATS1/2.** Large Tumor Suppressor homolog 1/2  
**LBR.** Lamin B Receptor  
**LEM.** LAP2-emerin-MAN1  
**LINC.** Linker of Nucleoskeleton and Cytoskeleton  
**Lmo7.** LIM Domain Only 7  
**LOX.** Lysyl-Oxydase  
**LRMP.** Lymphoid Restricted Membrane Protein  
**mDia1.** mammalian Dia1  
**MEC.** Matrice Extracellulaire  
**MKL1.** Megakaryoblastic Leukemia 1  
**MMP.** Métalloprotéase matricielle  
**MNE.** Membrane Nucléaire Externe  
**MNI.** Membrane Nucléaire Interne

**MRTF-A.** Myocardin-Related Transcription Factor A  
**MSC.** Man1/Src1p/C-terminal  
**MST 1/2.** Mammalian STE20-like protein kinase 1/2  
**Nesprines.** Nuclear Envelope Spectrin Repeat Proteins  
**NLS.** Nuclear Localization Signal  
**NPC,** Nuclear Pore Complex  
**Pa.** Pascal  
**PPAR  $\gamma$ .** Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\gamma$   
**Rac.** Ras Related C3 botulinum toxin substrate  
**Ran.** Ras-related nuclear  
**RE.** Réticulum Endoplasmique  
**Rb.** Rétinoblastome  
**ROCK.** Rho-Associated Kinase  
**Samp1.** Spindle Associated Membrane Protein 1  
**SCMu.** Cellules Souches Musculaires  
**Smads.** Mothers against decapentaplegic homolog  
**SPAG4.** Sperm Associated Antigen 4  
**SPAG4L.** SPAG4-Like  
**Src.** proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src  
**SRF.** Serum Response Factor  
**SUN.** Sad1 Unc-84  
**TAN lines.** Transmembrane Actin-associated Nuclear lines  
**TAZ.** Transcriptional co-activator with PDZ-binding motif  
**TEAD.** TEA Domain family member  
**YAP.** Yes-Associated Proteins

INTRODUCTION - Partie I

Propriété mécanique du  
microenvironnement et réponse cellulaire

# I. L'environnement mécanique de la cellule

Il existe un large panel de paramètres biomécaniques qui diffèrent selon le contexte tissulaire et qui peuvent être altérés lors de maladies. Ces paramètres physiques, tels que l'élasticité, les forces de tension, de friction et de compression, influencent le comportement cellulaire à différentes échelles (Chen, 2008). Ils orchestrent ainsi, en concert avec le microenvironnement biochimique, le maintien et le devenir des structures de l'organisme. La matrice extracellulaire (MEC), qui assure le rôle de soutien structural des cellules et les organise en tissus, peut être décrite et caractérisée d'un point de vue physique, par ses propriétés élastiques sa topographie et sa porosité. C'est le principal composant extracellulaire de tous les tissus et organes et sa structure dynamique en fait un élément clef dans l'initiation des stimuli mécaniques sur la cellule. Le rôle interdépendant des propriétés visco-élastiques et topographiques a conduit à l'élaboration de nouvelles technologies visant à dissocier l'effet de ces paramètres sur le comportement de la cellule, et quelques exemples de ces approches seront décrits dans ce chapitre.

## 1) La matrice extracellulaire

### a. Composition

La MEC est composée de différentes protéines qui peuvent être regroupées en 4 classes (Frantz et al., 2010; Hynes and Naba, 2012) :

- i) Les polysaccharides qui regroupent les glycosaminoglycanes et permettent notamment la rétention de l'eau.
- ii) Les glycoprotéines, qui regroupent les molécules d'adhérence comme la fibronectine et la laminine.
- iii) Les protéines fibreuses qui regroupent le collagène et l'élastine.
- iv) Les protéines associées telles que les facteurs de croissance et les enzymes de la MEC.

La MEC est continuellement renouvelée grâce à la synthèse de ses constituants par des cellules spécialisées comme les fibroblastes, présentes de façon abondante dans le tissu conjonctif, ou les cellules épithéliales qui reposent sur la lame basale (Bonnans et al., 2014; Frantz et al., 2010) et grâce à la dégradation assurée par des enzymes protéolytiques, comme les métalloprotéases matricielles (MMP) (Fanjul-Fernández et

al., 2010; Mott and Werb, 2004). De plus, au cours de leur assemblage, les protéines de la MEC peuvent subir des modifications post-traductionnelles comme la transglutamination, la glycosylation ou la réticulation (Hynes and Naba, 2012). Cette dernière modification est assurée par les enzymes lysyl-oxydases (LOX) qui catalysent une réaction de désamination oxydative des résidus lysine du collagène ou de l'élastine (Csiszar, 2001; Lucero and Kagan, 2006) mais de nombreuses autres protéines de la MEC peuvent également être associées entre-elles par des processus enzymatiques ou non (Mosher and Schad, 1979; Schneider and Kohn, 1980; Wiberg et al., 2003).

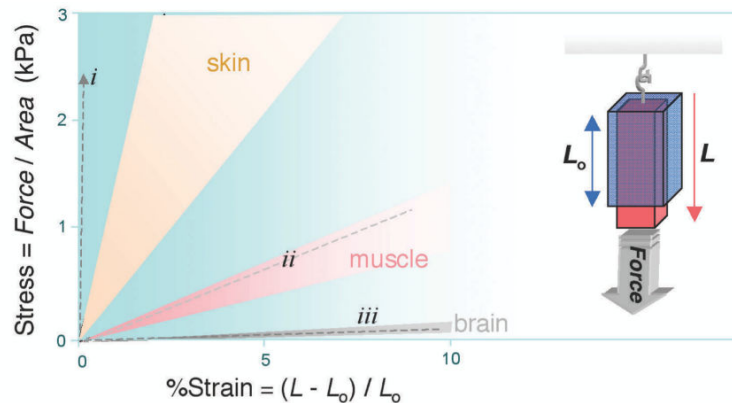
L'équilibre entre dégradation et synthèse de la MEC est dynamiquement régulé au cours du temps, et joue un rôle primordial lors du développement (Bonnans et al., 2014), comme dans l'angiogenèse (Marchand et al., 2018) ou au cours de la réparation tissulaire (Xue and Jackson, 2015). De plus, compte tenu de sa structure hétérogène, la MEC possède des propriétés viscoélastiques qui peuvent fortement influencer le comportement de la cellule.

## b. Rigidité

Bien que les caractéristiques visqueuses de la MEC et son influence sur la cellule soient peu étudiées, l'élasticité de la MEC est, quant à elle, mieux caractérisée. Pour un matériau purement élastique, on définit le module de Young, ou le module élastique comme le rapport entre la contrainte appliquée et la déformation résultante en géométrie de traction simple. Elle reflète la résistance à une déformation et elle est le plus souvent exprimée en Pascal (Pa) ou  $\text{N}/\mu\text{m}^2$ . Elle témoigne donc de la composition macromoléculaire de cette matrice et de la nature des interactions cellules-matrice (**figure 1**). La mesure de cette rigidité se fait classiquement par des approches d'indentation. Une des techniques les plus utilisées reste le microscope à force atomique (AFM). Mais d'autres approches, comme la nano-indentation (Rho et al., 1999), ou la microscopie acoustique (Jensen et al., 2006) permettent également de caractériser le module de Young (Akhtar et al., 2011).

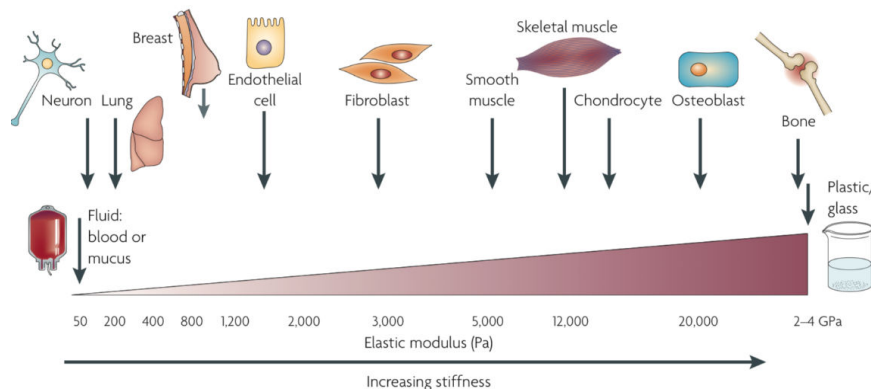
La proportion de chacune des classes de protéines qui composent la MEC peut fortement varier d'un tissu à l'autre (Hay, 1981; Labat-Robert et al., 1990) et la classe des protéines fibreuses est principalement responsable de la structure et de l'élasticité de la MEC due à sa composition en collagène et en fibres élastiques. De plus, les niveaux de réticulation des protéines de la MEC influencent également son élasticité (Hynes and Naba, 2012). De ce fait, la rigidité va différer grandement selon la nature du microenvironnement. Par exemple, celle des tissus soumis à d'importantes contraintes

mécaniques comme les os ou les tendons, possède une structure fibrillaire très organisée majoritairement composée de collagène. Ce dernier, bien que possédant des propriétés élastiques, résiste fortement à l'étirement (Green et al., 2014; Shen et al., 2011). La compliance de cette matrice sera ainsi très faible, et l'application d'une forte contrainte entrainera peu de déformation (Boschetti et al., 2004; Mow, 1977). Au contraire, dans des tissus en continuelle adaptation, comme le cerveau, la MEC est riche en éléments hydrophiles comme les glycosaminoglycanes avec peu d'éléments fibreux (Janna K. Mouw, et al., 2014). De par sa nature, cette MEC va présenter une forte compliance, et l'application d'une même contrainte, entrainera alors une forte déformation (Hirakawa et al., 1981; Miller et al., 2000). La **figure 2** illustre les différentes rigidités retrouvées dans le corps humain. Il est intéressant de noter qu'il peut exister, de façon physiologique, une différence d'un facteur 100 entre deux types de tissus.



**Figure 1** : Représentation de la relation contrainte et déformation au niveau de la peau, du muscle et du cerveau. D'après Discher et al., 2005.

Afin d'étudier le rôle de la rigidité de la MEC sur le comportement de la cellule, de nombreuses techniques ont été développées (Zhu et al., 2000). Parmi les précurseurs, on peut citer Folkman et Moscona (Folkman and Moscona, 1978) ou Pelham et Wang qui, en 1997, ont développé la première technique de gel avec différentes rigidités. Ils ont ainsi montré que la morphologie et la migration de fibroblastes étaient directement affectées par la rigidité de leur substrat (Pelham and Wang, 1997). Pour cette approche, une matrice de polyacrylamide est réalisée avec des modules de Young qui seront fonctions des pourcentages de bis-acrylamide présents dans la solution. Une fois le gel terminé, celui-ci est fonctionnalisé avec une protéine désirée de la MEC, habituellement du collagène ou de la fibronectine. Cependant, l'inconvénient mis en avant ces dernières années est qu'avec cette approche, il est difficile de contrôler la topographie du substrat.

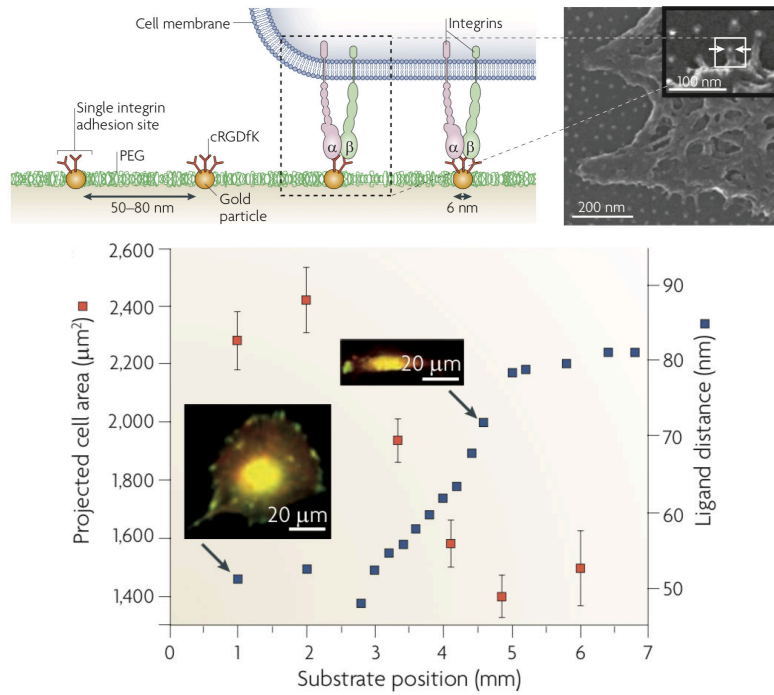


**Figure 2 :** Les différents modules d'élasticité des matrices extracellulaires retrouvés dans le corps humain. D'après Butcher et al., 2009

### c. Topographie

La topographie de la MEC fait référence à la troisième dimension de sa surface et regroupe les caractéristiques telles que des géométries en sommets et vallées ou des changements de rugosité. Elle ne constitue pas une propriété mécanique, à la différence de l'élasticité, mais elle joue un rôle important dans la réponse cellulaire en favorisant notamment le rapprochement des intégrines entre elles, en jouant sur la polarisation, l'attachement et la forme de la cellule (Dickinson et al., 1994; Meshel et al., 2005; Provenzano et al., 2008; Wang et al., 2002) (**figure 3**).

Afin de dissocier les propriétés topographiques de la rigidité, qui sont interdépendantes dans des matrices de gels de polyacrylamide, d'autres techniques ont vu le jour, comme la technique des micropiliers (Saez et al., 2005), les microenvironnements fibrillaires (Baker et al., 2015), les matrices composées de polyéthylène glycol (Peyton et al., 2006), d'alginate (Huebsch et al., 2010) ou d'acide hyaluronique (Khetan et al., 2013). Grâce à cette dichotomie, l'équipe de David Monney a pu montrer, par exemple, que l'augmentation de la rigidité de la matrice induit le phénotype malin des cellules épithéliales mammaires, et que ce phénotype est abrogé lorsque cette rigidité est accompagnée d'un changement de répartition géométrique des ligands au niveau de la membrane basale (Chaudhuri et al., 2014). Cependant, la relation rigidité-topographie ne semble pas linéaire lorsque les cellules sont cultivées sur une matrice très rigide, comme le suggère les travaux de Peyton et Putnam. La capacité d'étalement des cellules musculaires lisses dépend fortement de la densité de ligand sur une matrice souple, alors que sur substrat rigide, la densité de ligand n'influence plus l'étalement (Peyton and Putnam, 2005).



**Figure 3:** Étalement de la cellule en fonction de la topographie de la MEC. L'image du haut représente la méthode utilisée pour calculer l'aire projetée des cellules en fonction de la position du substrat. Des particules d'or sont déposées dans du polyéthylène glycol avec un espacement variant entre 50 et 80 nm. Chaque particule d'or est fonctionnalisée avec un seul site d'adhérence pour une intégrine. On peut voir grâce au graphique du bas que l'étalement cellulaire dépend étroitement de cet espace. Plus les particules sont espacées (position 4, 5, 6 ; courbe bleue), moins la cellule est étalée (en rouge). D'après Geiger et al., 2009.

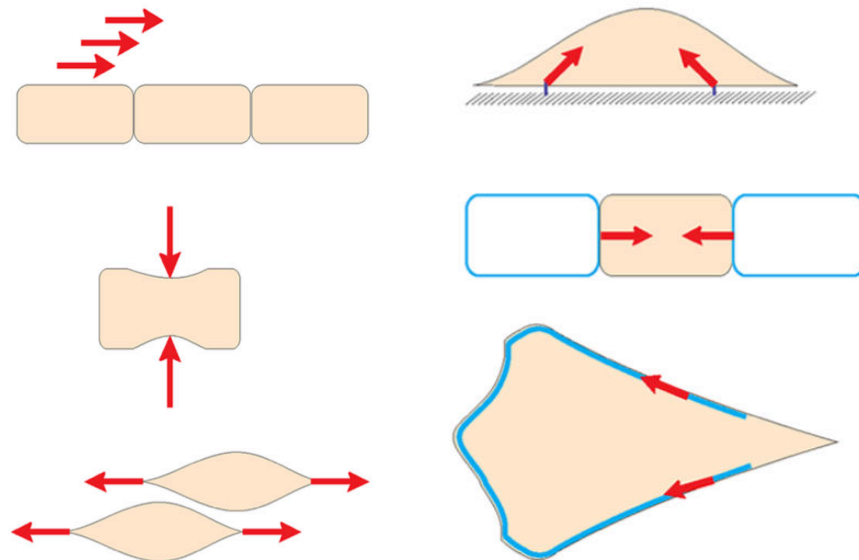
## 2) Les différents types de forces

A côté des propriétés physiques de la MEC, le comportement de la cellule va également être influencé par les forces externes qui lui sont appliquées et par les forces qu'elle génère. Ainsi, selon le contexte tissulaire, la cellule peut être soumise à différents types de force (**figure 4**). Dans le système vasculaire par exemple, les cellules qui bordent l'endothélium sont soumises à des forces parallèles, appelées forces de friction, générées par le passage du sang (Dewey et al., 1981). La compression, qu'elle soit anisotrope ou hydrostatique est retrouvée au sein des cellules au cours de divisions durant la morphogénèse (Lancaster et al., 2013) ou dans des environnements tumoraux (Dolega et al., 2017). Enfin, les forces de tension, qu'elles soient cycliques ou non, vont engendrer un étirement de la cellule, comme par exemple dans le système vasculaire, lors de l'effet Windkessel (Belz, 1995), ou dans le muscle squelettique pendant son étirement (Maganaris, 2001) (**figure 4**). De plus, les cellules peuvent également générer des forces de tension, par la contractilité de leur cytosquelette (Chen, 2008), ou *via* la



formation de protrusions qui augmentent la tension de membrane (Arthur and Burridge, 2001) (**figure 4**).

L'existence de forces générées par le cytosquelette sur la MEC a été démontrée pour la première fois dans les années 80 (Harris et al., 1980; Stopak and Harris, 1982) lorsque des fibroblastes ont été cultivés sur des fins films d'élastomère de silicone (Harris et al., 1980). Il a été ainsi observé que les forces de traction endogènes, générées par les cellules, sont suffisamment fortes pour déformer ce film. Ces forces de tension sont le résultat de l'interaction entre un moteur moléculaire, la myosine II, isolé en 1973 par Pollard et Korn (Pollard and Korn, 1973), et les filaments d'actine.



**Figure 4 :** Les forces mécaniques en biologie cellulaire. Schémas représentatifs des différents types de force exercées sur la cellule (à gauche) ou générées par la cellule elle-même (à droite). Parmi celles appliquées par l'environnement externe, on retrouve de haut en bas, les forces de friction, les forces de compression, les forces de tension. Parmi les forces générées par la cellule, on retrouve, de haut en bas, la contractilité du cytosquelette qui génère des forces de tension sur les complexes d'adhérence de la MEC ou des cellules voisines, ainsi que les forces de tension sur la membrane plasmique, liées à la protrusion d'actine durant la migration. D'après Lessey et al., 2012.

Afin de mieux appréhender la réponse des cellules à ces paramètres physiques, des techniques visant à dissocier ces composantes mécaniques ont été mises au point. C'est le cas des systèmes de micro-fluidiques qui permettent d'imposer aux cellules des forces de friction bien définies, en jouant notamment avec la vitesse ou la viscosité du fluide (Dewey et al., 1981; Galbraith et al. 1998). Grâce à cette approche, l'équipe de

Davies a montré, par exemple, que des cellules endothéliales confluentes, exposées à des forces de frictions physiologiques de 5-10 dynes/cm<sup>2</sup>, qui dépend du territoire vasculaire, s'alignent dans le sens du flux en plus de changer leur forme polygonale à ellipsoïde (Dewey et al., 1981). Les forces de tension quant à elles peuvent être étudiées grâce à des appareils d'étirement dont on peut contrôler à la fois le pourcentage d'étirement de la cellule ainsi que la fréquence (Kaunas et al., 2005). Enfin, pour étudier l'effet de la compression sur les cellules, des modèles de contraintes isotropes comme les sphéroïdes multicellulaires (Sutherland, 1988), ou l'utilisation de l'AFM ou de rhéomètre pour des modèles anisotropes, ont été développés (Stewart et al., 2013). Par l'utilisation des sphéroïdes multicellulaires, par exemple, le groupe de Rakesh a montré ainsi que l'application d'une pression allant de 45 à 120 mmHg permettait d'inhiber la croissance de tumeur (Helmlinger et al., 1997).

La MEC et le système vasculaire ont été pris en exemple, mais ces contraintes sont transposables à une myriade d'autres contextes tissulaires tels que les poumons, la peau, le cœur, ou l'organisme au cours du développement. Les chapitres suivants traitent plus spécifiquement de la façon dont cet environnement est perçu, transmis et transformé en événement biochimique, et comment cet environnement va, *in fine*, influencer le comportement de la cellule en modulant l'expression de gènes.

## II. Transmission des forces mécaniques et mécanosensibilité

La transmission des forces mécaniques et leur perception par les cellules, abordées dans les deux premiers sous-chapitres, constituent les premiers stades de la mécanotransduction et sont parfois assurées par les mêmes structures. Ces deux étapes permettent de transduire les stimuli mécaniques qui vont déclencher par la suite, des réponses cellulaires bien précises qui feront l'objet d'un chapitre dédié (**Chapitre III : la réponse cellulaire**).

### 1) Transmission des forces

De nombreuses structures vont permettre la transmission des forces mécaniques aux protéines mécanosensibles (Hoffman et al., 2011). Une fois la force appliquée (le plus souvent à la surface de la cellule par la matrice ou les cellules voisines) elle va être transmise de l'extérieur vers l'intérieur de la cellule, puis jusqu'aux organelles.

Cette transmission est donc assurée par des structures à l'interface avec le microenvironnement comme les récepteurs extracellulaires tels que les intégrines (Campbell and Humphries, 2011), les cadhérines (Buckley et al., 2014) et d'autres récepteurs comme les protéoglycanes présents sur les cellules endothéliales (Moon et al., 2005), les protocadhérines des cellules ciliées de l'oreille interne (Ahmed et al., 2006), mais également la membrane plasmique qui permet de recruter les protéines sensibles aux courbures (Drin et al., 2007). Une fois dans la cellule, les forces peuvent se propager dans le cytosol à travers des structures du cytosquelette et tous les acteurs moléculaires qui constituent ces structures participent finalement à la transmission de ces forces.

Cette transmission des forces peut également s'opérer dans le sens inverse, de l'intérieur vers l'extérieur de la cellule, où des composants de la MEC joueront également un rôle indispensable dans leur transmission aux cellules ou aux tissus avoisinants (Evans et al., 2010).

## 2) Les protéines sensibles aux forces

La mécanosensibilité est assurée par l'ensemble des protéines dont la conformation est directement régulée par la tension. Parmi ces protéines mécanosensibles, on retrouve notamment les protéines dont les stimuli mécaniques permettent l'exposition de séquences peptidiques (Vogel, 2006), permettant le recrutement ou la phosphorylation d'autres partenaires, et également l'ouverture de certains canaux ioniques (Coste et al., 2010; Martinac, 2004). Dans le premier cas de figure, l'exposition de ces séquences peptidiques est étroitement liée à la tension générée par la cellule alors que dans le cas des canaux ioniques, l'activité est régulée par la tension de membranes ou l'attachement à des cils primaires qui assurent la transmission du signal mécanique (Soattin et al., 2016).

Bien que les canaux ioniques et la fibronectine (Sukharev et al., 2001; Zhong et al., 1998) furent les premiers éléments à être décrits dans les années 2000 comme des protéines mécanosensibles, la liste s'est depuis allongée. En effet, de nombreuses autres protéines possèdent également la faculté de voir leur conformation régulée par la tension. Parmi celles-ci on va retrouver les protéines des adhérences comme les intégrines (Friedland et al., 2009), la taline (del Rio et al., 2009), la vinculine (Auernheimer et al., 2015; Chen et al., 2006; Grashoff et al., 2010), les protéines de la famille Src (Sawada et al., 2006), mais on va retrouver également des structures du cytosquelette comme les lamines dans le noyau (Ihalainen et al., 2015), la myosine (Guo and Guilford, 2006) ou encore des récepteurs comme les protéines Notch pour lesquels la tension entraîne l'accessibilité au site de clivage du récepteur (Stephenson and Avis, 2012). De plus, certaines protéines, spécialisées dans la nucléation de l'actine comme les formines ont également été montrés comme étant sensibles à la tension (Courtemanche et al., 2013; Higashida et al., 2013; Jégou et al., 2013; Romet-Lemonne and Jégou, 2013).

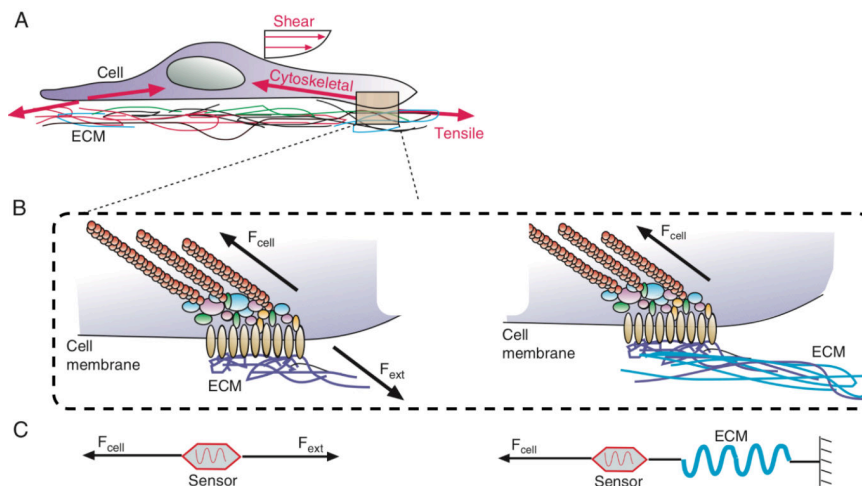
Le changement conformationnel de protéines en réponse à la tension mécanique peut également affecter la stabilité des interactions protéiques. D'un point de vue moléculaire, l'interaction protéine-protéine a une durée de vie limitée, et l'application d'une force de tension va diminuer la durée de cette interaction (Evans and Calderwood, 2007). Cependant, et bien que contre-intuitif au prime abord, certaines protéines voient leurs interactions non covalentes stabilisées en réponse aux forces (Hoffman et al., 2011). C'est le cas notamment de l'actine avec la myosine (Guo and Guilford, 2006), de la caténine avec l'actine (Buckley et al., 2014) ou de l'intégrine et la fibronectine (Kong et al., 2009) mais il existe d'autres molécules qui réagissent de

manière similaire et qui sont retrouvées dans d'autres structures du cytosquelette (Hoffman et al., 2011).

### 3) Mécanosensibilité des complexes d'adhérence

Les complexes d'adhérence sont des structures permettant le contact et l'attachement de la cellule avec sa MEC, et constituent l'interface physique entre des forces provenant du microenvironnement et des forces générées par le cytosquelette.

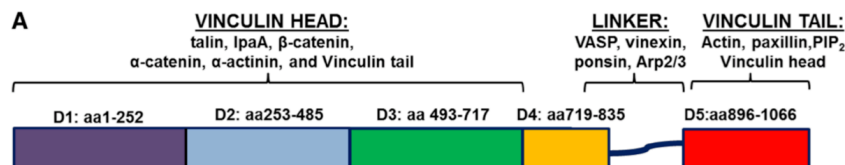
Les intégrines sont associées au cytosquelette d'actine par l'intermédiaire d'un réseau de plusieurs protéines incluant la vinculine et la taline, et constituent ensemble « l'adhésome » (Kuo et al., 2011a; Prager-Khoutorsky et al., 2011; Schiller et al., 2011; Zaidel-Bar et al., 2007). Cet ensemble est responsable principalement de deux fonctions au niveau des sites d'adhérence : i) il joue le rôle d'une plateforme d'échafaudage qui renforce le complexe d'adhérence pour supporter la transmission des stimuli mécaniques provenant de la MEC et ii) joue un rôle dans la perception de ces stimuli par le recrutement de protéines mécanosensibles (Oakes et al., 2012; Schiller et al., 2013a). Grâce à ce couplage, on peut considérer l'ensemble des protéines mécanosensibles liées aux protéines d'ancrage de la MEC comme étant un senseur à l'équilibre entre deux forces opposées (**figure 5**).



**Figure 5** : Les protéines mécanosensibles jouent le rôle de senseur de l'environnement mécanique. **A**. Une cellule expérimente différents types de contraintes mécaniques. **B**. La cellule perçoit les forces de tension exogènes grâce aux protéines mécanosensibles présentes au niveau des complexes d'adhérence. **C**. La cellule utilise ces protéines pour apprécier la rigidité de la MEC. D'après Chen, 2008.

L'émergence des techniques de microscopie à super-résolution et de transfert d'énergie par résonance de type Förster (FRET acronyme de *Förster resonance energy transfer*) a permis de mettre en exergue la hiérarchisation des protéines des adhérences (Kanchanawong et al., 2010). La taline et la vinculine sont, par exemple, deux protéines clés des processus permettant à la cellule de percevoir son environnement mécanique.

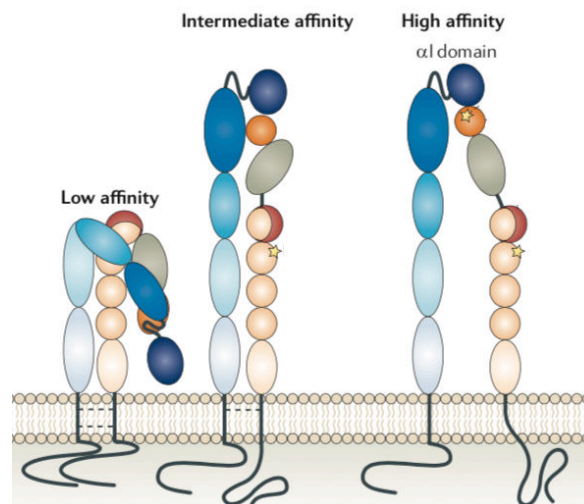
La taline, découverte en 1983 (Burridge and Connell, 1983; O'Halloran and Burridge, 1986), est une protéine localisée au niveau des adhérences. Sa partie globulaire en N-terminale possède des domaines 4.1/Ezrin/Radixin/Moesin (FERM) qui lient le domaine cytosolique des intégrines. En C-terminal, des structures en bâtonnet peuvent contenir jusqu'à 11 domaines de liaison à la vinculine (Critchley, 2000; Izard and Vornrhein, 2004). Certains de ces domaines de liaison à la vinculine sont inaccessibles lorsque la protéine est dans un état natif (Papagrigoriou et al., 2004; Patel et al., 2006). En combinant des approches de super-résolution, d'AFM et de pinces magnétiques, le groupe de Michael Sheetz a montré *in vitro* que l'application d'une force de tension de 12 pN induit un changement conformationnel de la taline, libérant ainsi des sites de liaison à la vinculine (del Rio et al., 2009). Ces travaux ont été corroborés plus récemment dans la cellule, à l'aide de la technique de FRET (Ringer et al., 2017). Une fois dépliée, la taline va donc permettre le recrutement de la vinculine qui va elle-même, à son tour, opérer des changements de conformation en fonction de l'environnement mécanique.



**Figure 6 :** Caractérisation de la vinculine. La protéine est composée de 5 domaines répartis entre la tête (domaine D1 à 3), le cou (domaine D4), et la queue (domaine D5). D'après Bays and DeMali, 2017.

La vinculine, également découverte au début des années 80 (Burridge and Feramisco, 1982; Geiger, 1979; Geiger et al., 1980; Price et al., 1989), est une protéine de 117 kDa, qui reste à ce jour la protéine des adhérences la mieux caractérisée (Case et al., 2015; Kanchanawong et al., 2010). Elle est formée de 5 domaines répartis en 3 groupes (**figure 6**). La « tête », qui comprend les 3 premiers domaines, est capable de lier la taline, et permet également de lier la « queue » de la protéine par le domaine 5 assurant ainsi son auto-inhibition (Cohen et al., 2005). C'est également par ce domaine

que la vinculine lie, entre autres, les filaments d'actine. Enfin les domaines 3 et 5 sont reliés par « le cou » composé du domaine 4, qui agit comme un bras de levier pour amplifier le mouvement généré par la tête (Izard and Vornrhein, 2004; Johnson and Craig, 1994). Bien que le recrutement de la vinculine au niveau des complexes d'adhérence ne semble pas être uniquement lié aux forces de traction générées par la cellule (Gilmore and Burridge, 1996), son changement de conformation est directement lié à la présence du cytosquelette d'actine qui permet de générer des tensions de l'ordre de 2,5 pN pour la stabiliser en conformation active (Auernheimer et al., 2015; Chen et al., 2006; Grashoff et al., 2010).



**Figure 7 :** Exemple des états d'activations de l'intégrine  $\alpha_L\beta_2$ . Les forces de friction et le renforcement du cytosquelette d'actine vont conduire à la succession de changements de conformation de l'intégrine, passant d'une affinité faible pour son ligand, ICAM-1, à une haute affinité. Selon la nature de son activation, des sites enfouis peuvent être accessibles. Ces épitopes (étoiles jaunes) sont ainsi utilisés pour évaluer, à l'aide d'anticorps, leurs états d'activation. D'après Hogg et al., 2011

Par ailleurs, la conformation des intégrines peut être également régulée par l'environnement mécanique suivant un modèle de « mouvement à cran-d'arrêt » (Luo et al., 2007). En 2009, les travaux de Julie Friedland et ses collaborateurs ont montré en effet que l'intégrine  $\alpha_5\beta_1$  change de conformation sous l'effet de l'augmentation de la tension générée de la cellule (Friedland et al., 2009). Ce changement de conformation, qui est dépendant du site « synergie », proche des peptides RGD de la fibronectine, permet le pontage de l'intégrine à la MEC, renforçant la liaison cellule-matrice. De plus, la phosphorylation de la *focal adhesion kinase* (FAK), qui est recrutée au niveau des complexes d'adhérence, est dépendante de cette transition (Friedland et al., 2009). La **figure 7** illustre un autre mode d'activation des intégrines  $\alpha_L\beta_2$ , exprimées à la surface

des lymphocytes. Selon la nature du microenvironnement, l'intégrine peut être ainsi activée plus ou moins rapidement et va passer par plusieurs stades conformationnels libérant, de ce fait, de nouveaux épitopes (Hogg et al., 2011).

Cette mécanosensibilité, partagée par d'autres protéines comme les protéines FAK (Barry and Critchley, 1994), les protéines de la famille Src (Sawada et al., 2006), certaines formines, qui jouent un rôle dans la nucléation de l'actine (Courtemanche et al., 2013; Higashida et al., 2013; Jégou et al., 2013; Romet-Lemonne and Jégou, 2013) ou encore des protéines de la MEC comme la fibronectine, fait que la dynamique des complexes d'adhérence est régulée par les forces et participe ainsi à la réponse cellulaire.



### III. La réponse cellulaire aux forces

La réponse de la cellule à l'environnement mécanique, définie par le terme « mécanoréponse », peut être arbitrairement divisée en deux catégories interdépendantes : les modifications structurelles qui vont conduire, *in fine*, à la régulation de l'expression de gènes. D'un point de vue structurel, elle concerne, par exemple, la maturation des complexes d'adhérence ou la formation des fibres de stress et tout ce qui concerne, au sens large, les remodelages du cytosquelette et des complexes protéiques associés aux membranes. En ce qui concerne la régulation de l'expression de gènes, la mécanoréponse englobe les voies de signalisation qui vont conduire à l'activation de cofacteurs de transcription tels que *Yes-associated proteins* (YAP), la  $\beta$ -caténine ou encore *myocardin-related transcription factor A* (MRTF-A). L'ensemble de ces réponses vont conduire à la régulation de fonctions cellulaires telles que la prolifération, la différenciation ou encore la migration qui seront traitées dans le **chapitre IV : Exemple de fonctions contrôlées par l'environnement mécanique.**

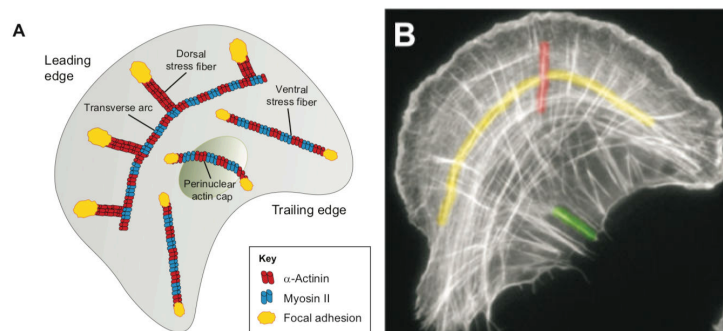
#### 1) Les fibres de stress

Bien qu'initialement découvertes en culture (Cooke, 1976; Depue and Rice, 1965; Hanson and Lowy, 1963; Huxley, 1963), les travaux de Ira Herman, Thomas Pollard et de Keigi Fujiwara ont mis en évidence au début des années 80, *in situ* et *in vivo* la présence de filaments d'acto-myosine dans les cellules endothéliales vasculaires exposées à de fortes contraintes hémodynamiques et qui s'alignent parallèlement le long de la direction du flux sanguin (White et al., 1983; Wong et al., 1983). Dans le même temps, Mina Bissel exposait sa théorie de la réciprocité dynamique dans laquelle elle suggérait que le remodelage du cytosquelette serait dépendant des composants de la MEC et vice-versa (Bissell et al., 1982).

Quatre sortes de fibres de filaments d'actine ont été décrites à ce jour, qui diffèrent selon leurs compositions, les voies de signalisation qui les contrôlent et leurs fonctions (**figure 8**) :

- 1) Les fibres dorsales sont particulièrement retrouvées dans les cellules en mouvement et pendant l'étalement. Elles sont enrichies en  $\alpha$ -actinine, une protéine décrite pour ponter les filaments d'actine-F parallèles entre-eux. Elle sont également pauvres en myosine II, et prennent naissance au niveau des adhérences focales pour polymériser vers le centre de la cellule (Hotulainen and Lappalainen, 2006; Oakes et al., 2012).

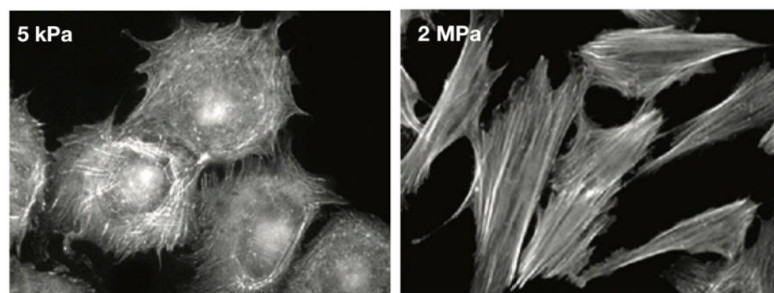
- 2) Les fibres transverses ou « fibres de stress en arc » prennent naissance à la jonction lamellipode/lamellum. Elles sont caractérisées par la présence de myosine II et bougent de façon centripète à partir de la périphérie cellulaire (Burnette et al., 2011; Heath, 1983; Tojkander et al., 2011).
- 3) Les fibres ventrales sont majoritairement présentes dans les cellules très étalées, qui migrent peu et lentement. Elles sont composées d' $\alpha$ -actinine et de myosine II et sont reliées aux adhérences focales par leurs extrémités. (Burridge, 1981a). Elles naissent de la fusion des fibres dorsales et des fibres transverses lors de l'étalement ou de la migration (Tee et al., 2015; Tojkander et al., 2012).
- 4) Les filaments périnucléaires, un sous-type de fibres ventrales présent spécifiquement autour du noyau, qui exercent des forces de compression et de tension *via* l'interaction aux complexes reliant le nucléosquelette (LINC pour *Linker of Nucleoskeleton and Cytoskeleton*) par l'intermédiaire des nesprines (Khatau et al., 2009; Kutscheidt et al., 2014; Luxton et al., 2010). Deux types de filaments périnucléaires ont été décrits : le réseau d'actine qui recouvre le noyau (*actin cap*), observé dans des cellules stationnaires ou lors de la migration (Khatau et al., 2009), et les lignes d'actine associées au noyau (*transmembrane actin-associated nuclear TAN lines*) qui sont perpendiculaire à l'axe de migration de cellules mésenchymateuses (Luxton et al., 2010).



**Figure 8** : Les trois types de fibre de stress rencontrés dans une cellule. **A.** On retrouve les arcs transverses, les fibres dorsales, les fibres ventrales et l'actine cap périnucléaire. **B.** En jaune : une fibre transverse, en rouge : une fibre dorsale, et vert : une fibre ventrale. D'après Tojkander et al., 2012.

La génération de forces par les fibres de stress est réalisée de deux manières : i) la polymérisation de l'actine contre la membrane cellulaire, qui permet de générer suffisamment de force pour la formation de protrusions membranaires pendant, par exemple, la migration. ii) L'association de ces polymères d'actine avec la myosine II pour générer des structures contractiles dépendant de l'ATP (Tojkander et al., 2012). La nucléation et l'élongation de l'actine globulaire (actine G) en actine fibrillaire (actine F) est assurée par trois groupes de protéines : le complexe *actin-related protein 2/3* (ARP2/3), spécialisé dans la polymérisation de l'actine branchée à 70° (Blanchoin et al., 2000; Mullins et al., 1998), les protéines Spire (Baum and Kunda, 2005; Ducka et al., 2010) et les formines (Schönichen and Geyer, 2010). La nucléation correspond au regroupement des trois premiers monomères d'actine G. L'élongation de l'actine F par polymérisation s'effectue au niveau de l'extrémité « barbée » ou (+) et la dissociation en monomère d'actine G s'effectue au niveau de l'extrémité « pointue » ou (-) (Campellone and Welch, 2010). La polymérisation de ces différents types de fibres de stress est interdépendante car l'abolition de la formation de l'une empêche la formation des autres (Tee et al., 2015).

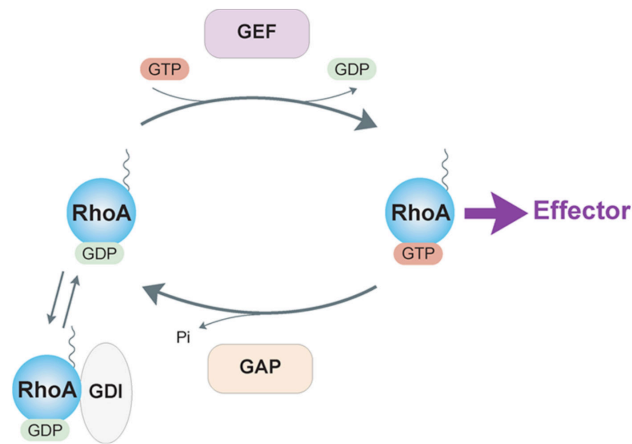
Ces structures filamenteuses d'actine-F sont des structures centrales de la réponse aux forces mécaniques et sont ainsi retrouvées principalement dans les cellules exposées à de fortes contraintes comme l'augmentation de la rigidité de la MEC (**figure 9**), l'exposition à des fortes contraintes hémodynamiques (White et al., 1983; Wong et al., 1983), ou encore en réponse à l'étirement cyclique (Peterson et al., 2004).



**Figure 9** : Le cytosquelette d'actine en réponse à la rigidité. A gauche, des fibroblastes sont cultivés sur une MEC de 5 kPa (forte compliance) et présentent peu de fibres de stress qui sont moins bien organisées en comparaison avec les fibroblastes cultivés sur une MEC de 2 MPa (faible compliance), à droite. D'après Prager-Khoutorsky et al., 2011.

La vitesse de polymérisation et de dépolymérisation de l'actine va dépendre de l'activité des nucléateurs, de la myosine II et des protéines de coiffe qui lient les extrémités des filaments d'actine F et sont finement régulés par des voies de signalisation au cours des processus de mécanotransduction (Lessey et al., 2012b). Les petites protéines G jouent ainsi un rôle central dans le contrôle spatio-temporel des assemblages de ces fibres en participant à la régulation de ces trois types de molécules (Heasman and Ridley, 2008). En effet, en réponse à l'environnement mécanique, ces commutateurs moléculaires sont activés par l'intermédiaire des protéines mécanosensibles. Leur activation est réalisée par l'intermédiaire de facteurs d'échange qui catalysent l'échange du GDP en GTP sur les petites protéines G (**figure 10**). Par exemple les protéines *Guanine nucleotide exchange factor H1* (GEF-H1) et *leukemia-associated Rho-GEF* (LARG) sont deux facteurs d'échange décrits pour être recrutés au niveau des adhérences (Guilluy et al., 2011). Ils sont responsables de l'activation de RhoA en réponse à la tension appliqué sur les intégrines (Guilluy et al., 2011; Zhao et al., 2007) ou en réponse à l'augmentation de la contractilité endogène (Kuo et al., 2011b; Schiller et al., 2013a). L'activité de la formine *mammalian Dia1* (mDia1) et de *Rho-associated kinase* (ROCK) sont directement régulées par RhoA. mDia1 permet la polymérisation de l'actine au niveau des fibres dorsales alors que ROCK module l'activité de la myosine II en plus d'inhiber certaines protéines de coiffe telle que la cofiline (Leung et al., 1996; Watanabe et al., 1997). Les protéines *Ras Related C3 botulinum toxin substrate* (Rac) et *Cell division control protein 42 homolog* (Cdc42), d'autres petites protéines G, vont quant à elles, moduler l'activité respective de ARP2/3 et de mDia1 qui jouent un rôle dans la polymérisation de l'actine au niveau des lamellipodes et des filopodes (Kozma et al., 1995; Pollard, 2007). Ces effecteurs vont permettre la formation des arcs transverses qui fusionneront avec les fibres dorsales lors des mouvements d'extension et de rétractions au cours de la migration ou de l'étalement (Tojkander et al., 2012).

En plus de voir leur formation régulée par la tension, les fibres de stress disposent également d'un système de réparation en réponse aux forces de tension excessives (Smith et al., 2010). La principale fonction de génération de forces intracellulaires est notamment renforcée par les travaux du groupe de Mary Berkerle. En effet, à cause de la tension, les fibres subissent des fragilisations. Une partie de ces fibres sera rompue (environ 20%) et le reste sera réparé grâce au recrutement de la zyxin et de ses partenaires (Smith et al., 2010).

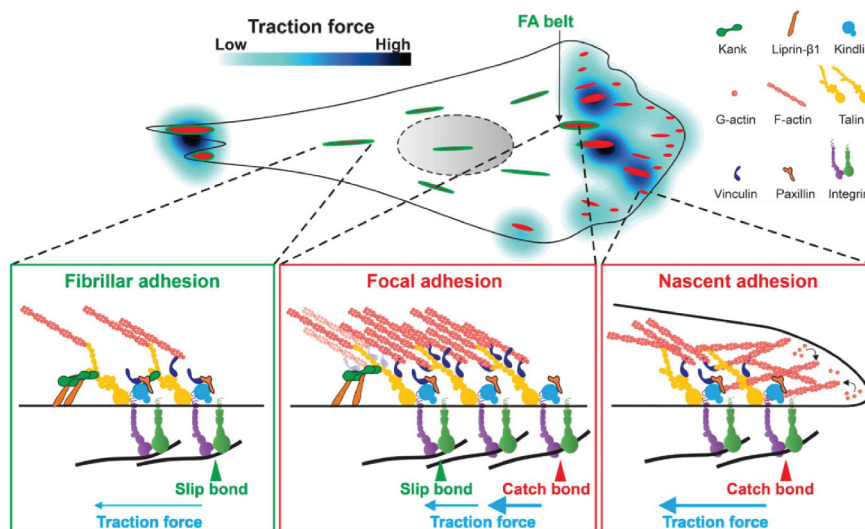


**Figure 10 :** Le cycle de RhoA. Comme la plupart des protéines G, RhoA alterne entre une forme inactive, liée au GDP, et une forme active, liée au GTP. L'activation est réalisée par l'intermédiaire des facteurs d'échanges (GEF pour *Guanine Exchange Factor*) qui catalysent l'échange du GDP en GTP. Les protéines d'activation de la GTPase (GAP pour *GTPase-activating proteins*) inactivent RhoA en stimulant son activité GTPasique intrinsèque. Les protéines *GTP-dissociation inhibitor* (GDI) jouent quant à elles, un rôle d'inhibition de la protéine G en la séquestrant dans le cytoplasme. D'après Lessey et al., 2012.

## 2) La maturation des complexes d'adhérence

L'observation, à la fin des années 70, de la présence de fibres de stress au contact des complexes d'adhérence (Abercrombie and Dunn, 1975; Dunn and Heath, 1976; Heath and Dunn, 1978; Izzard and Lochner, 1976) suggérait déjà que la tension pouvait contribuer à la maturation des adhérences (Burrige, 1981). Ce processus, également appelé « renforcement des adhérences », a été confirmé quelques années plus tard avec des expériences visant à inhiber la myosine II, en micro-injectant par exemple des anticorps dirigés contre la chaîne lourde de ce moteur moléculaire (Höner et al., 1988) ou par l'utilisation d'inhibiteurs de l'activité ATPasique (Cramer and Mitchison, 1995; Higuchi and Takemori, 1989; McKillop et al., 1994). La découverte du rôle des petites protéines G dans le contrôle du cytosquelette, avec notamment les travaux du laboratoire de Allan Hall (Hall, 1990) et les travaux de Anne Ridley (Ridley and Hall, 1992), ont conduit à une meilleure caractérisation des voies de signalisation induisant ce renforcement des adhérences (Chrzanowska-Wodnicka and Burrige, 1996; Gilmore and Burrige, 1996; Kuo et al., 2011a). Ainsi, la protéine RhoA et son effecteur ROCK semblent être des acteurs clés de ce processus, car elles initient la tension émanant des fibres de stress. Cependant, ces acteurs peuvent être remplacés par la stimulation avec une tension extérieure. En effet, les travaux du groupe de Sasha Bershadsky ont montré

que cette maturation des adhérences peut se produire en l'absence de la protéine ROCK si une tension externe est appliquée (Riveline et al., 2001). La maturation des complexes d'adhérence en réponse aux forces peut être ainsi observée expérimentalement en appliquant des forces sur les intégrines au moyen de pinces magnétiques et des pinces optiques (Guilluy et al., 2011; Maniotis et al., 1997; Plopper and Ingber, 1993; Riveline et al., 2001). La tension, qu'elle soit générée par la cellule ou appliquée extérieurement provoque le regroupement des intégrines, ainsi que le recrutement de protéines telles que la vinculine, la paxilline, l' $\alpha$ -actinine qui renforce le complexe d'adhérence et la formine mDia qui favorise localement la polymérisation d'actine (Kuo et al., 2011b; Schiller et al., 2013b). L'ensemble de ces mécanismes permet ainsi la maturation des adhérences naissantes en adhérences focales (Choi et al., 2008; Iskratsch et al., 2013; Straight et al., 2003). Certaines protéines comme *KN motif and ankyrin repeat domain-containing protein* (Kank) vont moduler cette réponse dans la mesure où leur recrutement permet notamment de diminuer la tension exercée sur les sites d'adhérence, en rompant la liaison entre l'actine et la taline. Les adhérences matures vont, par la suite, en réponse à la diminution de la tension endogène, soit se désassembler par endocytose de façon clathrine-dépendante, soit devenir des adhérences fibrillaires (Plopper and Ingber, 1993; Sun et al., 2016a; Wang et al., 1993; Yu et al., 2015).



**Figure 11 :** les différents types d'adhérences retrouvés dans une cellule au cours de la migration. Les adhérences naissent au niveau du front de migration (adhérence naissante) où le lien entre les intégrines et la MEC est particulièrement fort. Elles vont par la suite donner les adhérences focales par recrutement de nouvelles protéines au niveau des sites d'adhérence grâce à la tension générée de la cellule. Dans les adhérences focales, la force de liaison intégrine-MEC commence à diminuer à cause de la protéine Kank, qui une fois recrutée, diminue la liaison entre actine et taline. Enfin, les adhérences fibrillaires génèrent quant à elles, peu de forces de traction. D'après Sun et al., 2016.

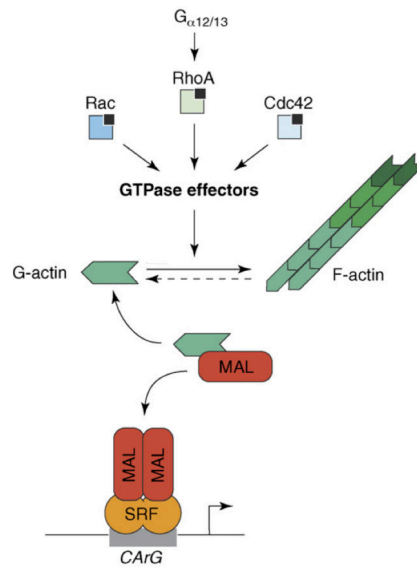
L'intégrité du cytosquelette d'actine semble donc être l'élément clef dans la mesure où elle permet de mettre sous tension les protéines mécanosensibles, quelle que soit l'origine de la tension, endogène ou induite par des stimuli externes. Cette mise en tension est proposée pour être contrôlée spatio-temporellement au cours de l'étalement ou de la migration, par un mécanisme « d'embrayage » appelé le *clutch*. Son concept a été décrit pour la première fois en 1988 par Tim Mitchison et Marc Kirschner et fait référence au lien mécanique qui existe dynamiquement entre les intégrines liées à la MEC et le cytosquelette d'actine sous tension (Mitchison and Kirschner, 1988). Au cours de la migration ou de l'étalement, la cellule va ainsi développer différents types d'adhérence répartis essentiellement en trois classes : les adhérences naissantes, les adhérences focales et les adhérences fibrillaires (**figure 11**).

Les adhérences naissantes sont retrouvées au niveau des lamellipodes et servent de précurseurs aux adhérences focales. Elles font environ 1  $\mu\text{m}$  de long et ressemblent à des points lorsqu'on les caractérise par immunofluorescence. Leur formation est dépendante de la GTPase Rac. (Bershadsky et al., 1985; Nobes and Hall, 1995; Rottner et al., 1999). Les adhérences focales, également appelées contacts focaux, sont des structures beaucoup plus élancées, de 2 à 5  $\mu\text{m}$  de long, qui sont situées au niveau de la périphérie cellulaire. Les adhérences fibrillaires sont plutôt localisées au centre de la cellule. Ce sont des structures ponctiformes ou élancées, et leur taille varie de 1 à 10  $\mu\text{m}$  (Chen and Singer, 1982; Zamir et al., 1999, 2000).

Finalement, la dynamique d'interaction des protéines des complexes d'adhérence associée au remodelage du cytosquelette d'actine va conduire à l'activation et à la translocation de cofacteurs de transcription dans le noyau en réponse à une stimulation mécanique.

### 3) L'activation des cofacteurs de transcription

L'expression de gènes peut être régulée en réponse aux signaux mécaniques tels que les forces et les changements de rigidités *via* l'activation de voies de signalisation qui vont conduire à la régulation de l'activité de facteurs ou cofacteurs de transcription tels que la protéine *Activator Protein 1* (AP-1) (Codelia et al., 2014; Kaunas et al., 2006; Kito et al., 2000), l'acide rétinoïque (Swift et al., 2013a), la  $\beta$ -caténine (Benham-Pyle et al., 2015) ou encore MRTF-A (Ho et al., 2013a) et YAP/TAZ (Dupont et al., 2011). De plus, les modifications épigénétiques ont certainement une influence sur l'expression de gènes en réponse à ces mêmes signaux (Damodaran et al., 2018), mais seront abordées dans la **partie II, l'enveloppe nucléaire dans la mécanotransduction**.

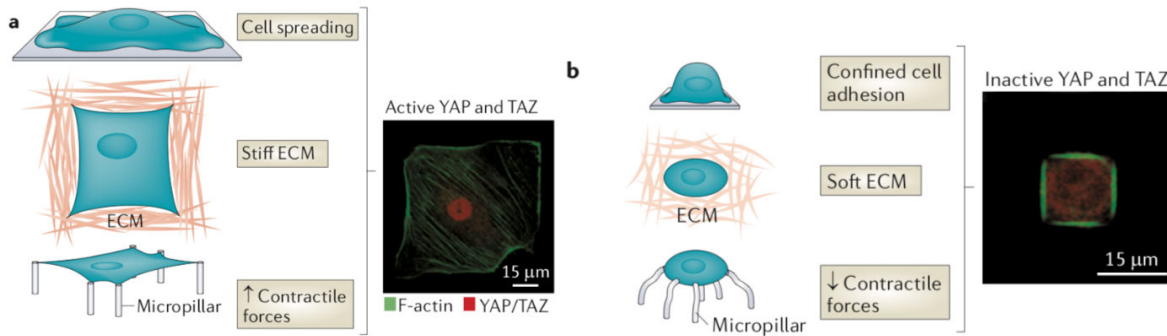


**Figure 12 :** MAL subit une translocation dans le noyau en réponse à une stimulation mécanique. L'activation des GTPases va conduire à la formation de fibres de stress. Ce remodelage du cytosquelette d'actine va conduire à une diminution d'actine G libérant MAL qui va conduire à sa translocation dans le noyau pour moduler l'activité de SRF. D'après Posern and Treisman, 2006.

MRTF-A, également appelé *megakaryoblastic leukemia 1* (MKL1) ou MAL, régule l'activité du facteur de transcription *serum response factor* (SRF) initialement découvert par Richard Treisman en 1987 (Treisman, 1987). Les gènes contrôlés par SRF contiennent spécifiquement des séquences multiples consensus de type CC(A/T)6GG appelées boîtes CARG et peuvent être divisées en trois classes (Philippart et al., 2004; Sun et al., 2006, Chai and Tarnawski, 2002). D'une part les gènes impliqués dans la réponse précoce (*immediate early genes*) dont l'expression est activée par des stimuli mitogènes. D'autre part, SRF contrôle les gènes impliqués dans l'organisation du cytosquelette et des adhérences parmi lesquels on peut retrouver l' $\alpha$ -actinine 1, la vinculine ou encore les sous-unités de certaines intégrines. Enfin SRF contrôle l'expression de gènes spécifiques des muscles squelettiques, cardiaques et lisses. En l'absence de stimulation, MRTF-A est principalement localisé dans le cytoplasme où il interagit avec les monomères d'actine G *via* son site en N-terminal qui possède un motif RPEL (Miralles et al., 2003a). La formation des fibres de stress, activée par exemple par RhoA, Rac ou encore Cdc42 (**figure 12**) va conduire à une diminution du pool d'actine G monomérique présent dans la cellule (Ridley and Hall, 1992b). MRTF-A, initialement séquestré par l'actine G, va ainsi être libéré et va pouvoir être transloqué dans le noyau pour aller réguler l'activité de SRF (Sotiropoulos et al., 1999; Vartiainen et al., 2007; Zhao et al., 2007). De plus, cette translocation semble être dépendante de



l'homéostasie de tension, dans la mesure où lorsque la cellule atteint son état de tension préférentiel, la translocation de MRTF-A est abrogée même en présence de stimuli chimiques ou mécaniques (McGee et al., 2011).



**Figure 13** : L'environnement mécanique contrôle l'activité de YAP/TAZ. **a.** Durant l'étalement, ou exposé à des fortes forces de contraction ou de résistance à l'étirement (*Stiff ECM*, matrice rigide), YAP/TAZ, visualisé en rouge, est localisé dans le noyau. **b.** Au contraire, lorsque la cellule est confinée, exposée à de faibles forces de tension ou cultivée sur un MEC de faible compliance (*Soft ECM*), YAP/TAZ est localisé de façon diffuse dans la cellule. D'après Halder et al., 2012.

Les cofacteurs YAP/TAZ (TAZ pour *Transcriptional co-activator with PDZ-binding motif*) sont décrits pour être les principaux effecteurs de la voie de signalisation Hippo (Meng et al., 2016). L'activation de la voie Hippo implique une cascade de signalisation avec de nombreuses kinases dont les protéines *mammalian STE20-like protein kinase 1/2* (MST 1/2) et *large tumor suppressor homolog 1/2* (LATS1/2). La protéine LATS activée par phosphorylation va conduire à la phosphorylation de YAP sur le résidu 127 de la sérine. Cette phosphorylation induit la séquestration de YAP dans le cytosol par la protéine 14-3-3 et conduit à sa dégradation par ubiquitination. En absence de phosphorylation, YAP et TAZ échappent à la dégradation et peuvent subir une translocation dans le noyau où le complexe va moduler l'expression de plus de 400 gènes par son interaction avec des facteurs de transcription comme *TEA domain family member* (TEAD), SMAD1/2/3 ou encore *peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$*  (PPAR  $\gamma$ ), jouant un rôle important dans la croissance cellulaire, la prolifération, la différenciation et la survie (Janmey et al., 2013; Meng et al., 2016; Piccolo et al., 2014). YAP/TAZ a été également identifié comme un des régulateurs d'expression génique en réponse à l'environnement mécanique (Chaudhuri et al., 2014; Dupont et al., 2011; Nakajima et al., 2017). En effet, alors que YAP/TAZ se retrouve dans le noyau dans une cellule étalée et riche en fibres de stress, le complexe reste cytoplasmique dans une cellule exposée à de faibles tensions (**Figure 13**). Cette régulation se fait indépendamment de la voie dite « Hippo » car les activités de LATS

et de MST sont faiblement impactées par les stimuli mécaniques (Dupont et al., 2011; Pathak et al., 2014). Bien que la présence de la taline au niveau des adhérences semble être indispensable pour la translocation de YAP/TAZ dans le noyau (Elosegui-Artola et al., 2016), d'autres protéines des adhérences focales comme FAK ou Src ne semblent pas jouer un rôle dans sa localisation (Zhao et al., 2012). De plus, son activation diffère de celle de MRTF-A car la balance Actine G / Actine F n'affecte pas non plus sa localisation (Dupont et al., 2011; Fernández et al., 2011; Wada et al., 2011). Néanmoins, l'intégrité du cytosquelette (Das et al., 2016), la contractilité myosine-dépendante des fibres de stress (Dupont et al., 2011; Valon et al., 2017), et les composants du nucléosquelette comme le complexe LINC et la lamine AC (Bertrand et al., 2014; Driscoll et al., 2015; Elosegui-Artola et al., 2017) semblent être indispensables à la régulation de son activité, en réponse à l'environnement mécanique.

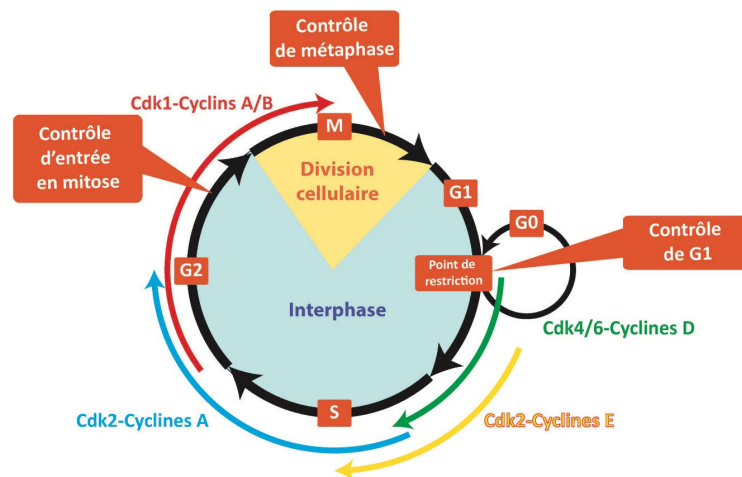
## IV. Exemple de fonctions contrôlées par l'environnement mécanique

Grâce aux processus de mécanotransduction, la cellule va pouvoir « sentir » et répondre à l'ensemble des paramètres biophysiques qu'elle perçoit. Parmi ces réponses, on retrouve par exemple le contrôle du cycle cellulaire, la motilité ou encore la différenciation. Elles peuvent être dérégulées dans des processus pathologiques soit parce que la cellule est soumise à un environnement mécanique inapproprié comme la formation d'une tumeur qui va conduire à une rigidification du microenvironnement, soit parce que la cellule n'est plus en mesure de sentir et de répondre à son microenvironnement.

### 1) Le cycle cellulaire

Différents éléments mécaniques ont été montrés pour jouer un rôle dans le cycle cellulaire, comme les forces de tension cyclique (Liu et al., 2007), les forces de friction (Ando et al., 1987; Fang et al., 2017; Lee et al., 2018), les forces d'étirement et la rigidité de la matrice (Klein et al., 2009). Dès le début des années 80, l'importance de l'adhérence et de l'étalement est montrée comme étant essentielle dans le contrôle du cycle cellulaire (Ben-Ze'ev et al., 1980; Folkman and Moscona, 1978). En effet, l'activation et le regroupement en clusters des intégrines sont corrélés avec le passage de la phase G0 à la phase G1 (**figure 14**) et l'activation de l'expression des gènes précoces (Dike and Ingber, 1996; McNamee et al., 1996; Schlaepfer et al., 1994; Schwartz et al., 1991; Vuori and Ruoslahti, 1993). De plus, l'inhibition de l'intégrité du cytosquelette par l'utilisation de la cytochalasine D, qui bloque la polymérisation de l'actine F, empêche le passage de la phase G1 à la phase S (Böhmer et al., 1996; Ingber et al., 1995; Iwig et al., 1995), appuyant ainsi les premières observations selon lesquelles l'étalement des cellules est crucial dans le contrôle de la prolifération (Ben-Ze'ev et al., 1980; Folkman and Moscona, 1978). L'implication spécifique des intégrines dans ces processus et les étapes indispensables d'étalement de la cellule, ont conduit les chercheurs à essayer de comprendre si le cycle cellulaire était dépendant des voies de signalisation des intégrines liées à MEC ou dépendant des remodelages du cytosquelette d'actine (Assoian and Zhu, 1997). En découplant le système « adhérence - étalement » par l'utilisation de micromotifs, le groupe de Donald Ingber a ainsi montré que la tension générée de la cellule en réponse à l'environnement, est essentielle pour la transition G1-S et que cette entrée en mitose est liée à l'augmentation de la cycline D1 (Huang et al., 1998). De plus, les acteurs clés de la formation des fibres de stress, tels

que RhoA, ROCK et mDia jouent un rôle dans cette transition (Mammoto et al., 2004). Ces résultats ont été plus tard enrichis avec les travaux du groupe de Richard Assoian qui a montré que l'élasticité de l'environnement affectait également le cycle cellulaire. L'augmentation de la rigidité influence l'expression de la cycline D1 et la phosphorylation de la protéine du rétinoblastome (Rb) nécessaire à l'entrée en phase S. Ces processus sont dépendant de la protéine FAK et la GTPase Rac, toutes deux impliquées dans les mécanismes de mécanotransduction (Klein et al., 2009).



**Figure 14 :** Les différentes phases du cycle cellulaire et les cyclines impliquées. En phase G0 les cellules sont quiescentes. Le passage en G1 requiert l'adhérence intégrine-dépendante à la MEC. Le passage de la phase G1 à la phase S est dépendant de la tension générée par la cellule et dépend de la rigidité du microenvironnement.

Le cofacteur YAP/TAZ a également été montré pour jouer un rôle central dans le contrôle du cycle cellulaire. Dans les cellules épithéliales, par exemple, ce cofacteur de transcription joue un rôle important dans l'inhibition de contact de prolifération des cellules épithéliales (Zhao et al., 2007). Lorsque les cellules atteignent leur confluence, YAP/TAZ est retenu dans le cytosol par un mécanisme dépendant de la voie Hippo (Aragona et al., 2013; Zhao et al., 2007). L'augmentation de la rigidité de la MEC va activer la prolifération en empêchant l'inhibition de contact par la translocation de YAP/TAZ dans le noyau et permettre la modulation des gènes dépendant de TEAD qui contrôlent le cycle cellulaire (Aragona et al., 2013; Dupont et al., 2011; Kim and Asthagiri, 2011). De plus, l'application de forces d'étirement sur les E-cadhérines présentes au niveau des jonctions cellulaires, entraîne également l'accumulation de Yap dans le noyau (Benham-Pyle et al., 2015). Enfin, les travaux récents de Francesca Zanconato et ses collaborateurs ont montré, par une approche d'immunoprécipitation

de la chromatine dans des cellules cancéreuses de sein, que TEAD (activité par YAP/TAZ) coopérait avec le facteur de transcription AP-1 sur des séquences amplificatrices de région promotrice de gènes contrôlant la prolifération (Zanconato et al., 2015). Étant donné la nature rigide du microenvironnement tumoral, la synergie de tels facteurs de transcription ne peut qu'exacerber la prolifération anarchique caractéristique des cellules cancéreuses.

La géométrie de la cellule est également un paramètre important pour la division cellulaire et plus spécifiquement la mitose (Matthews et al., 2012; Zlotek-Zlotkiewicz et al., 2015). En effet, il a été montré que la cellule doit générer suffisamment de forces de répulsion, contrôlées soit par la pression osmotique dans un environnement peu rigide, soit grâce à la formation de l'actine corticale dans un environnement avec une forte pression, afin de poursuivre la mitose (Lancaster et al., 2013). De plus, le fuseau mitotique a tendance à s'orienter le long du grand axe de la cellule avant la division afin de générer des forces internes indispensables à sa stabilité (Dumont and Mitchison, 2009) et requiert ainsi une polarisation de la cellule en métaphase, qui peut être influencée par l'environnement mécanique.

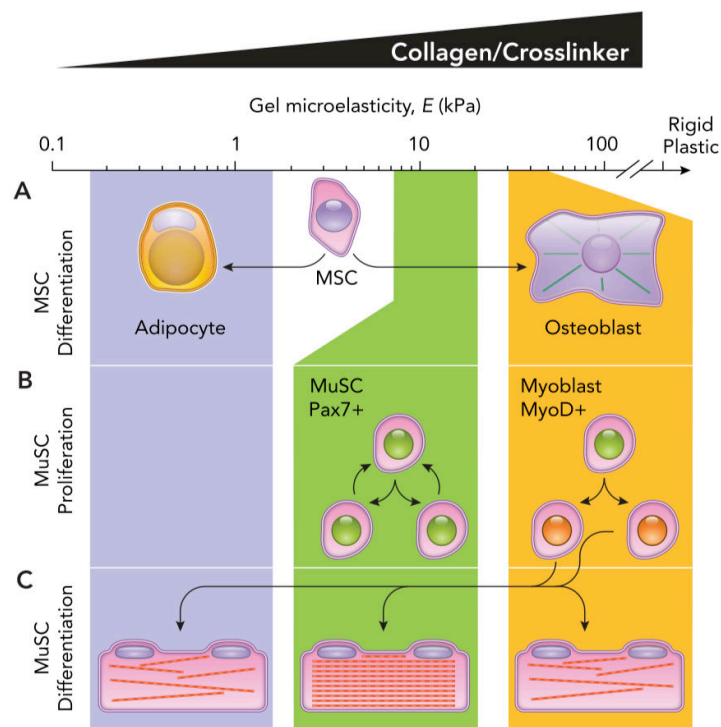
Ces propriétés mécaniques sont indispensables au maintien du phénotype des cellules dans des conditions physiologiques et particulièrement lors du développement. L'augmentation de la rigidité de la MEC et l'apparition de contraintes mécaniques aberrantes sont retrouvées dans de nombreuses pathologies comme dans le vieillissement vasculaire (Kovacic et al., 2011), le cancer (Zanconato et al., 2016), certaines maladies génétiques (Poerber et al., 2008) et vont conduire à la prolifération excessive des cellules mais peuvent également, selon le contexte tissulaire, conduire à leur différenciation.

## 2) La différenciation

En 2006, le groupe de Dennis Discher apporte la preuve que les cellules souches mésenchymateuses (CSM) sont sensibles à l'élasticité de leur microenvironnement (Engler et al., 2006). En fonction de la rigidité de la MEC sur laquelle les cellules souches sont cultivées, celles-ci vont se différencier en neurones, myoblastes ou en ostéoblastes (**figure 15**). De plus, l'inhibition de la myosine II, principal régulateur de la mécanosensibilité, annule cette réponse. Pour étudier spécifiquement le rôle de la rigidité indépendamment de la densité de ligand, le groupe de Christopher Chen a montré que la différenciation des CSMs en ostéoblastes ou en adipocytes est également contrôlée par la rigidité correspondant au tissu et que la tension générée des cellules

permettait de prévoir la voie de différenciation dans laquelle elles s'engagent (Fu et al., 2010).

Par ailleurs, la rigidité de la MEC influence les propriétés d'auto-renouvellements des cellules souches (Ivanova et al., 2006). En effet, en reproduisant la rigidité tissulaire des muscles, les travaux de Penney Gilbert et ses collaborateurs ont ainsi montré que les cellules souches musculaires (SCMu) se renouvellent et contribuent à la régénération musculaire lorsqu'elles sont injectées *in vivo* dans la souris (Gilbert et al., 2010). Enfin, les striations sarcomériques des cellules sont optimales lorsque celles-ci se différencient sur une MEC dont l'élasticité est proche des caractéristiques physiologiques (Cooper et al., 2004) (**Figure 15C**).



**Figure 15** : La différenciation des cellules souches en fonction de la rigidité de la MEC. **A.** Les CSMs (MSC) se différencient en adipocytes ou ostéoblastes selon la nature compliante ou rigide de la MEC. **B.** Le renouvellement des CSMu (MuSC) est assuré lorsque celles-ci sont cultivées sur une MEC dont la compliance est proche de celle du tissu (Pax7, marqueur des cellules souches) alors que la différenciation en myoblaste (marqueur MyoD, cellules MyoD+) est assurée lorsque celles-ci sont cultivées sur MEC plus rigide. **C.** La compliance de la MEC sur laquelle les CSMu se différencient impacte fortement la structure des sarcomères. D'après Smith et al., 2018.

L'observation selon laquelle l'utilisation d'inhibiteurs de la contractilité empêche la différenciation (Engler et al., 2006; Kwon and Yasuda, 2013; Lui et al., 2012; Young et al., 2013; Zouani et al., 2013) associée au fait que cette dernière est corrélée avec la tension générée des cellules (Fu et al., 2010), suggère fortement que les remodelages du cytosquelette, en réponse à l'environnement mécanique, semblent être une étape essentielle dans les processus de différenciation. Plusieurs travaux ont mis en avant l'importance des intégrines dans ces étapes (Du et al., 2011; Shih et al., 2011), ainsi que les protéines telles que la vinculine (Kuroda et al., 2017), FAK ou RhoA (Yu et al., 2013). De plus, l'augmentation des forces de traction vont conduire à la translocation des facteurs de transcription contrôlés par le cytosquelette tels que YAP/TAZ (Dupont et al., 2011), SRF (Connelly et al., 2010; Ho et al., 2013b) et du récepteur gamma de l'acide rétinoïque (Swift and Discher, 2014; Swift et al., 2013b). Ce dernier est impliqué directement dans la structure du noyau en contrôlant l'expression de la lamine A/C, composant de l'enveloppe nucléaire. Plus récemment, les travaux de Viola Vogel ont montré que la lamine A/C peut changer de conformation en réponse à la rigidité de la MEC, et que l'accessibilité des épitopes permet ainsi de contrôler la différenciation *via* des mécanismes qui restent à déterminer (Ihalainen et al., 2015).

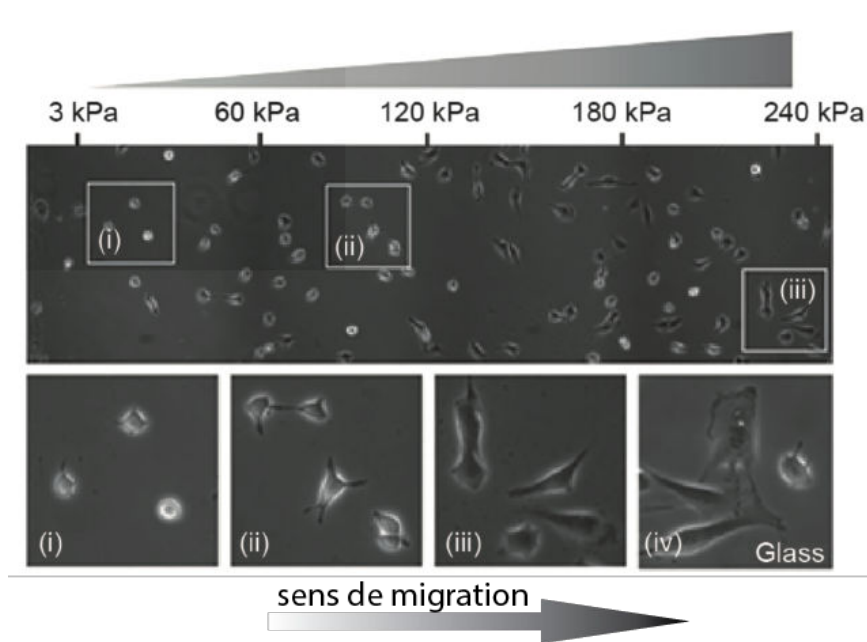
Durant le développement, les propriétés mécaniques des différents microenvironnements évoluent très rapidement. De concert avec les événements biochimiques, elles vont ainsi influencer le devenir des cellules, en jouant sur la prolifération et la différenciation, mais également sur leur pouvoir de migration et leur motilité.

### 3) La migration

La durotaxis est la migration au cours de laquelle la cellule va se diriger en fonction d'un gradient de rigidité (**figure 16**). Le terme a été introduit en 2000 avec les travaux de Yu-li Wang où des fibroblastes ont été cultivés sur une matrice de polyacrylamide dont la compliance est graduelle. Dès lors que les cellules approchent de la région rigide, elles s'étalent plus et augmentent leur force de traction (Lo et al., 2000).

L'utilisation des micropilliers a permis également de montrer que l'anisotropie de la MEC, à l'échelle cellulaire, influence directement l'organisation spatiale du cytosquelette avec une préférence d'étalement dans la direction qui présente la rigidité

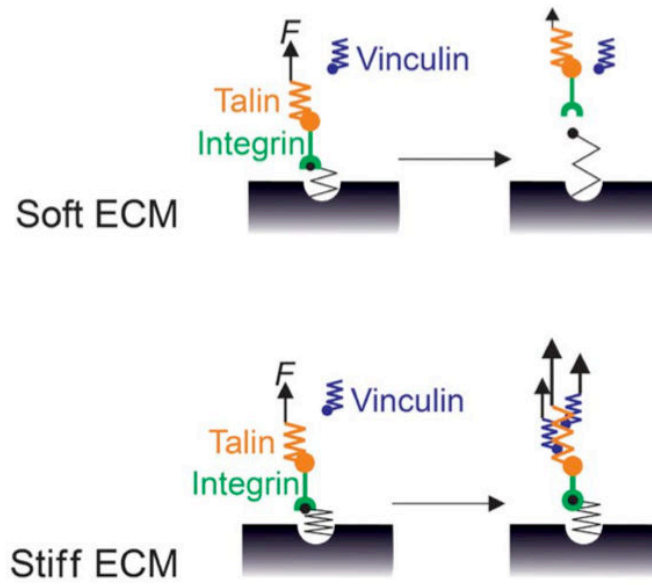
la plus importante (Saez et al., 2007). Cette anisotropie de tension influence directement les adhérences, de façon autonome (Riveline et al., 2001), provoquant l'activation spatiale de voies de signalisation qui conduisent à la génération de forces, et donc à la polarisation de la cellule au cours de la migration (Plotnikov et al., 2012). La découverte des protéines mécanosensibles avec la caractérisation de l'adhésome (Winograd-Katz et al., 2014) a permis notamment de mieux comprendre ce mécanisme de migration en fonction de la rigidité.



**Figure 16** : Schéma illustrant la durotaxie. Cellules 3T3 cultivées sur un substrat d'hydrogel avec un gradient de rigidité. Les cellules migrent vers l'environnement le plus rigide. D'après Yang et al., 2017.

En testant l'hypothèse de Tim Mitchison et ses collaborateurs sur le rôle du flux d'actine rétrograde dans la mécano-perception (Mitchison and Kirschner, 1988) avec des modèles de prédiction plus récents (Chan and Odde, 2008), les travaux du groupe de Roca-Cusachs ont montré que le point déterminant de la mécanosensibilité réside dans le fait que les forces de résistance liées à MEC doivent être transmises à la taline avant la dissociation entre l'intégrine et la MEC (Elosegui-Artola et al., 2016). Au cours de la migration, la probabilité de changement de conformation de la taline liée à la présence des forces de traction du flux rétrograde, serait plus grande à l'endroit où la MEC est plus rigide, favorisant spatialement la maturation des adhérences et la polarisation au cours de la migration (**figure 17**).





**Figure 17** : Modèle de prédiction de la mécanosensibilité. Sur un substrat souple, le changement de conformation de la taline n'est pas opéré car la liaison intégrine – MEC est rompue avant que les forces de tension du cytosquelette ne soient transmises aux intégrines. Sur matrice rigide, le changement de conformation de la taline est possible par la présence de forces de résistance dues à la liaison intégrine – MEC et des forces de tension du flux rétrograde d'actine. D'après Sun et al., 2016.

# Résumé chapitre I :

## Propriété mécanique du microenvironnement et Réponse Cellulaire

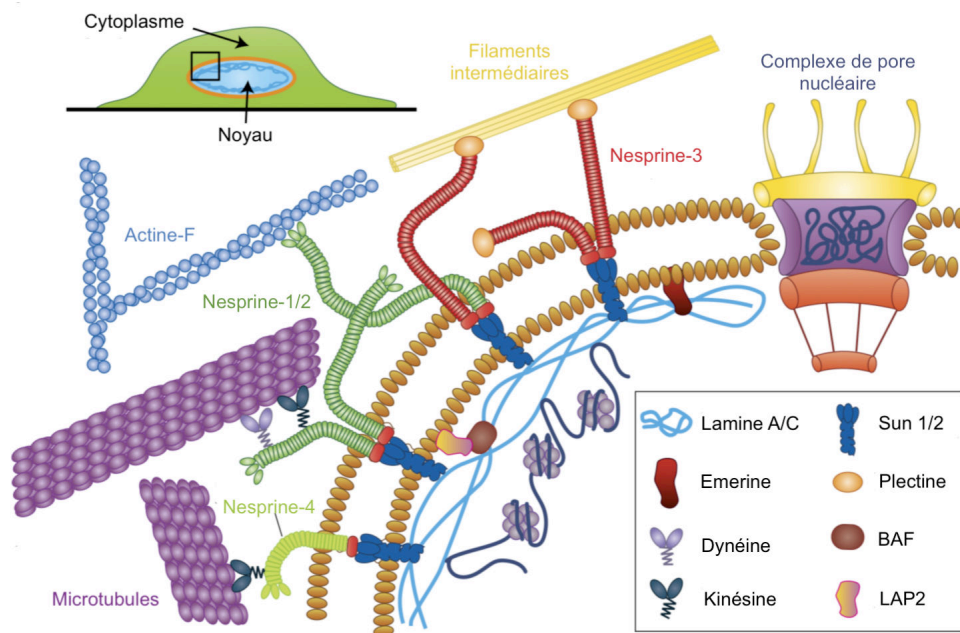
- L'environnement mécanique de la cellule regroupe un large panel de paramètres physiques tels que les forces de tensions, de frictions, de compression et la rigidité de la MEC
- Chaque paramètre biomécanique peut être quantifié et reproduit en culture grâce à l'émergence de nouvelles approches comme, parmi de nombreuses autres, l'AFM, les rhéomètres et les senseurs de la tension moléculaire (FRET).
- La mécanotransduction, qui permet la transformation d'un stimulus mécanique en événement biochimique peut être subdivisée en 3 grandes étapes : la transmission mécanique, le changement de conformation des protéines sensibles à la tension, et la réponse cellulaire.
- Grâce aux processus de mécanotransduction, la cellule peut « sentir » et répondre à l'ensemble des paramètres biophysiques qu'elle perçoit. Parmi ces réponses, on retrouve notamment le contrôle du cycle cellulaire, la motilité ou encore la différenciation.

INTRODUCTION - Partie II

# L'enveloppe nucléaire dans la mécanotransduction

# I. L'enveloppe nucléaire

L'enveloppe nucléaire, au sens strict, est constituée de deux membranes nucléaires interne (MNI) et externe (MNE) et délimite, dans les cellules eucaryotes, le compartiment dans lequel la chromatine est séquestrée et régule le mouvement nucléocytoplasmique des protéines. Continuellement présente au cours de l'interphase, elle va se dissocier uniquement de façon transitoire lors de la mitose. Au sens plus large, on y inclut les complexes protéiques qui y sont associés tels que les complexes LINC, les lamines et protéines associées, et les pores nucléaires (**figure 18**).



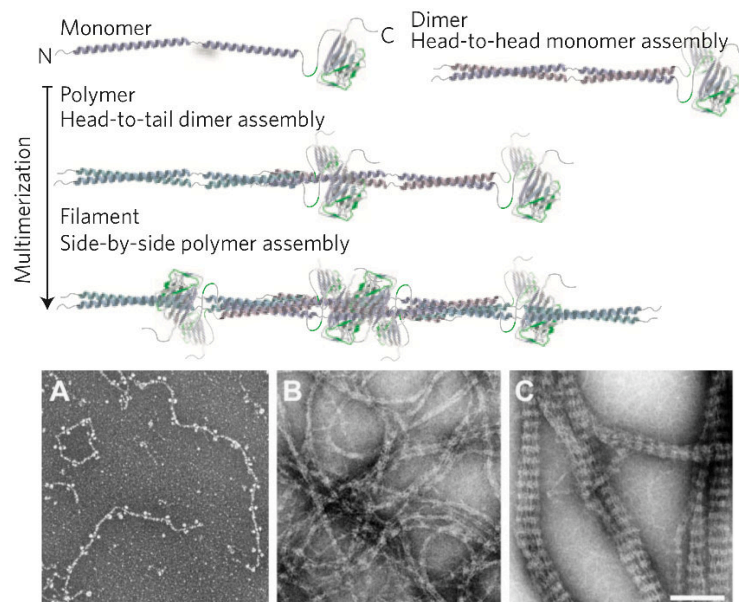
**Figure 18** : La composition de l'enveloppe nucléaire. On retrouve les deux membranes interne et externe qui fusionnent au niveau des complexes de pores nucléaires (NPC), les complexes LINC composés des Nesprines et des protéines SUN qui relient le cytosquelette (microtubules, filaments intermédiaires, et actine-F) au nucléosquelette (lamine A/C). D'après Kirby and Lammerding, 2018.

En plus de son rôle de barrière physique, l'enveloppe nucléaire permet de réguler de nombreuses fonctions cellulaires telles que la réponse aux dommages de l'ADN, l'expression de gènes et la progression du cycle cellulaire comme nous allons le voir dans les prochaines parties.

## 1. La lamina

Initialement caractérisées en 1956 par George Pappas comme des composants fibreux du noyau (Pappas, 1956), Robert Aaronson et Günter Blobel ont décrit en 1975

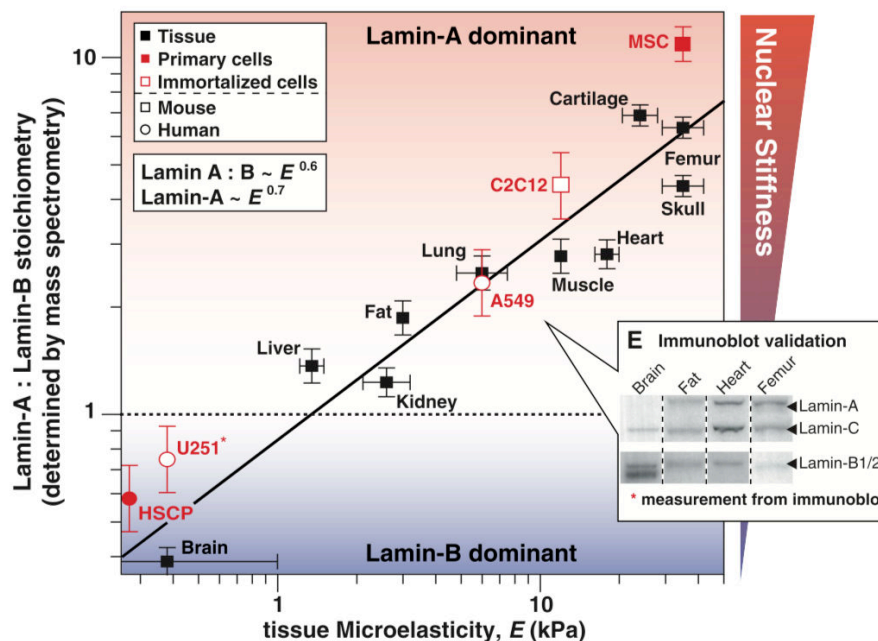
les lamines comme les structures majeures de l'enveloppe nucléaire (Aaronson and Blobel, 1975). La lamina est un réseau maillé de filaments intermédiaires de type 4 composé des lamines de type A et B et sont classifiées sur la base de critères structuraux et biochimiques (Burke and Gerace, 1986; Gerace and Blobel, 1980). Ainsi les lamines de type A sont caractérisées par un point isoélectrique neutre et regroupent les isoformes A, C, A $\Delta$ 10 et C2 codées par le gène LMNA (Lin and Worman, 1993; Wydner et al., 1996). Les lamines de types B sont, quant à elles, des protéines plus acides et regroupent les lamines B1 et les isoformes B2 et B3 codées respectivement par les gènes LMNB1 et LMNB2 (Biamonti et al., 1992; Lin and Worman, 1995; Peter et al., 1989). La lamine A/C est la forme prédominante des types A et devient complètement soluble lors de la mitose (Gerace and Blobel, 1980), à la différence des lamines B1 et B2 qui restent associées aux membranes nucléaires (Meier and Georgatos, 1994).



**Figure 19:** (haut) Illustration schématique de l'assemblage des lamines. La dimérisation se fait par les domaines en superhélices. L'assemblage "tête à queue" est caractéristique des polymères. Enfin les filaments de lamines se font par l'assemblage antiparallèle des protofilaments. (bas) Illustration des différentes étapes, réalisée par microscopie électronique (Échelle : 100 nm). On peut voir en A. l'assemblage en collier de perle formé par les domaines Ig. D'après Ihalainen et al., 2015 et Herrmann and Aebi, 2004.

Les monomères de lamine sont composés d'une région centrale de 50 nm de long avec 4 domaines de superhélices, flanqués en N- et C-terminal d'une tête et d'une queue avec un domaine globulaire. La tête globulaire est courte comparée à la queue qui contient notamment un repliement de type immunoglobuline (domaine Ig) d'un diamètre de 3,5 nm (Dhe-Paganon et al., 2002; Turgay et al., 2017). Au niveau de ce

dernier domaine, en C-terminal, un motif de signal de localisation nucléaire (NLS pour Nuclear Localization Signal) est retrouvé ainsi qu'un motif CAAX (C : cystéine ; A : acide aminé aliphatique ; X : autre acide aminé) uniquement présent dans la lamine A et les lamines de type B. Les lamines sont les seuls filaments intermédiaires à posséder ces motifs CAAX dont la prénylation permet leur fixation au niveau de la membrane et l'initiation de modifications post-traductionnelles indispensables à leur maturation (Krohne et al., 1989; Vorburger et al., 1989). Lors de l'assemblage des lamines, les monomères s'assemblent au niveau de leur région en superhélice pour former des dimères avec deux domaines Ig en C-terminal. Les dimères s'assemblent par la suite en « tête à queue » pour former des polymères dans lesquels les domaines Ig se retrouvent espacés d'environ 40 nm et qui donnent cette apparence caractéristique d'assemblage de perles (Ben-Harush et al., 2009). Enfin, la polymérisation des protofilaments de lamines se fait par l'assemblage antiparallèle des polymères de sorte que chaque tétramère ait un chevauchement des domaines N- et C- terminaux (Steinert, 1991a, 1991b) (figure 19).



**Figure 20** : Rapport stœchiométrique de l'expression de lamine A et lamine B, analysé par spectrométrie de masse, dans différents tissus, des cellules primaires et des lignées cellulaires. Plus le microenvironnement présente une rigidité importante, plus le rapport lamine A sur lamine B est important. E : exemples d'expression de la lamine A/C et de la lamine B1/2 dans le cerveau, le tissu adipeux, le cœur et le fémur. D'après Swift et al., 2013.

Les lamines B sont exprimées de façon ubiquitaire dès l'embryon chez les mammifères, sauf pour la lamine B3 qui est majoritairement exprimée dans les lignées germinales, tout comme la lamine C2 (Furukawa and Hotta, 1993; Furukawa et al., 1994). L'expression de la lamine A/C se fait à différents stades du développement de façon tissu-spécifique (Röber et al., 1989; Stewart and Burke, 1987) et certains types cellulaires, comme la lignée hématopoïétique, n'en expriment pas (Guilly et al., 1990; Röber et al., 1990). De plus, des travaux récents du groupe de Denis Discher, ont montré qu'il existe une étroite corrélation entre l'élasticité du microenvironnement et l'expression de la lamine A/C (Swift et al., 2013). Ainsi, le rapport stœchiométrique de lamine A/C par rapport à la lamine B sera plus grand pour des cellules exposées à un environnement plus rigide, comme le cartilage ou les os (rapport d'environ 7), que dans le muscle ou dans le cœur (rapport d'environ 2,5) (**figure 20**).

La différence d'expression des lamines a un impact direct sur les propriétés mécaniques du noyau. En voulant analyser les conséquences de la perte de fonction de la lamine A/C, le groupe de Ramaekers et de Lammerding ont montré que les noyaux de fibroblastes d'embryon de souris LMNA<sup>-/-</sup> sont moins rigides que les contrôles (Broers et al., 2004; Lammerding et al., 2004). Ces résultats ont été confirmés plus tard avec les travaux du groupe de Lee qui a montré que la lamine A est responsable de la rigidité du noyau alors que la lamine B joue quant à elle un rôle dans son intégrité (Lammerding et al., 2006). L'expression ubiquitaire de la lamine B et son rôle dans l'intégrité nucléaire pourrait notamment expliquer son rôle essentiel dans le développement (Harborth et al., 2001). En revanche, l'expression de la lamine A/C dans les tissus soumis à de fortes contraintes mécaniques pourrait expliquer leur rôle dans la protection du noyau à la déformation (Swift et al., 2013). Cette hypothèse est appuyée notamment par l'existence de maladies regroupée sous le terme de laminopathies (**table 1**), causées par des pertes de fonctions de la lamine A/C ou des protéines associées aux lamines comme l'émerine ou la *Lamina-associated polypeptides 2* (LAP2) qui seront décrits dans le chapitre suivant. (Butin-Israeli et al., 2012; Davidson and Lammerding, 2014a; Worman, 2012). Il existe, à ce jour, plus de 464 mutations sur la lamine A/C associées à ces maladies (<http://www.umd.be/LMNA>). Pourtant, bien que ce type de lamine soit exprimé de manière quasi-ubiquitaire, ces maladies n'affectent qu'une partie des tissus, soumis, pour la plupart à d'importantes contraintes mécaniques (Davidson and Lammerding, 2014). C'est le cas notamment des dystrophies musculaires (Bonne et al., 1999) et des cardiomyopathies (Fatkin et al., 1999). Cependant, il existe des exceptions comme le syndrome de Charcot-Marie-Tooth (De Sandre-Giovannoli et al., 2002), qui affecte uniquement le système nerveux

autonome et pourrait être expliqué également par le fait que ces mêmes mutations peuvent également perturber l'organisation de la chromatine et la programmation épigénétique (Mewborn et al., 2010; Perovanovic et al., 2016).

**Tableau 1:** Laminopathies et gènes associés. Abréviations : AD : dominant autosomique, a-WS : syndrome de Werner atypique, EDMD : dystrophie musculaire de Dreifuss, LGMD : dystrophie musculaire des ceintures, MDLC : dystrophie musculaire congénitale, DCM : cardiomyopathie dilatée, HGPS : syndrome de progeria Hutchinson–Gilford, MAD : dysplasie mandibulo-acrale, AR : autosomique-récessif, CMT : Charcot-Marie-Tooth. D'après Lattanzi et al., 2016

<b>Gene</b>	<b>Protein</b>	<b>Disease</b>
<i>LMNA</i>	Lamin A/C	AD-EDMD, LGMD1B, MDCL, DCM, HGPS, a-WS, MAD, AR-CMT2A
<i>LMNB1</i>	Lamin B receptor	AD leukodystrophy
<i>STA/EMD</i>	Emerin	XL-EDMD
<i>SYNE1</i>	Nesprin 1	EDMD-like, cerebellar ataxia
<i>SYNE2</i>	Nesprin 2	EDMD-like
<i>TMEM43</i>	LUMA	EDMD-like
<i>TMPO</i>	LAP2 $\alpha$	DCM
<i>TOR1A</i>	Torsin A	Dystonia
<i>TOR1AIP1</i>	LAP1B	Myopathy with contractures, cardiomyopathy

## 1. Les protéines associées à la lamina

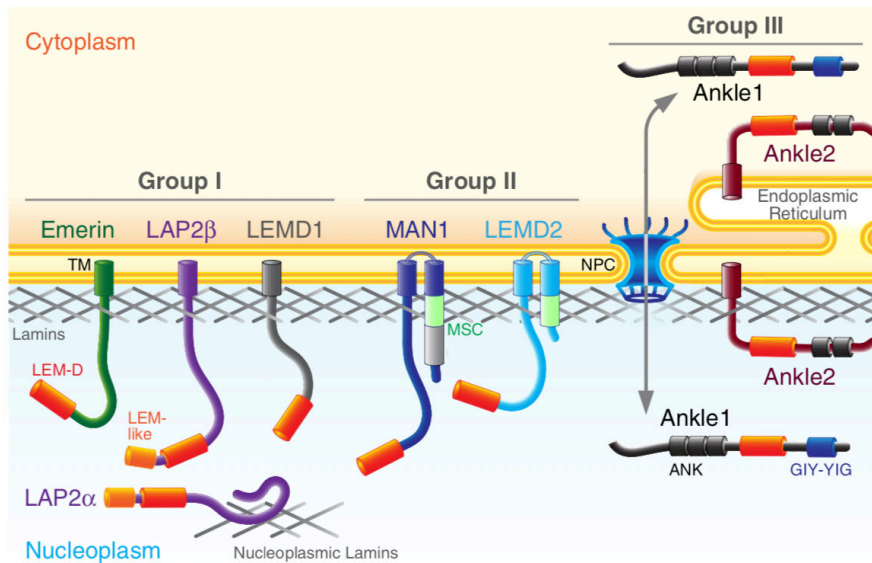
Les protéines de l'enveloppe nucléaire, associées à la lamina, jouent un rôle essentiel dans le contrôle de l'expression de gènes, et la régulation de l'architecture de la chromatine (Reddy et al., 2008; Shin et al., 2013; Solovei et al., 2013). En raison des nombreuses contraintes appliquées au noyau, qui sont décrites dans un chapitre dédié (**Chapitre II. Contraintes mécaniques et déformation du noyau**), il n'est pas étonnant que certaines de ces protéines aient été décrites comme des acteurs clés de la mécanotransduction nucléaire (Guilluy and Burrridge, 2015; Ho et al., 2013c; Le et al., 2016).



Les polypeptides associés à la lamina (LAP) définissent un groupe de protéines retrouvées dans la MNI et qui interagissent avec les lamines (Foisner and Gerace, 1993; Senior and Gerace, 1988). Ce groupe comprend une famille de protéines, identifiables par la présence d'un domaine *LAP2-emerin-MAN1* (LEM), qui joue un rôle essentiel dans l'architecture nucléaire et l'organisation de la chromatine (Laguri et al., 2001). Ce domaine d'environ 45 acides aminés replié en deux hélices  $\alpha$ , a la particularité de se lier à une protéine de liaison aux histones et à l'ADN appelé *Barrier-to-Autointegration Factor* (BAF) (Cai et al., 2001; Shumaker et al., 2001). Cette famille de protéines peut être divisée en 3 groupes (**figure 21**) :

- Les protéines à domaine LEM en N-terminal, qui possèdent de larges portions intranucléaires et pour la plupart, un domaine transmembranaire en C-terminal. On y retrouve par exemple l'émerine, LAP2 $\alpha$  et LAP2 $\beta$ . Ces deux dernières ont également des domaines LEM-like qui lient directement l'ADN plutôt que BAF (Cai et al., 2001).
- Les protéines à domaine LEM qui possèdent deux domaines transmembranaires. On y retrouve les protéines LEM2 et MAN1. Elles sont caractérisées par la présence en C-terminal de domaines winged-helix appelés motifs *Man1/Src1p/C-terminal* (MSC) qui permettent de lier directement l'ADN (Caputo et al., 2006).
- Les protéines à domaine LEM qui possèdent des domaines à multiples répétitions ankyrine. Ces protéines, comme LEM3 et LEM4 (ou respectivement *Ankyrin repeat and LEM domain-containing protein 1 et 2*, Ankle 1 et 2), se démarquent des deux premiers groupes par leurs localisations : Ankle 1 fait la navette entre le cytoplasme et le nucléoplasme et a une fonction d'endonucléase (Brachner et al., 2012) et Ankle 2, qui possède un domaine transmembranaire se situe plutôt au niveau du réticulum endoplasmique.

Hormis LAP2 $\alpha$ , qui reste soluble, les autres protéines des groupes 1 et 2 possèdent une structure interdépendante. En effet, la déplétion de l'un des 3 acteurs conduit dès lors à des problèmes d'interactions entre ces protéines et à l'apparition de défauts de ségrégation des chromosomes pendant et après la mitose (Liu et al., 2000, 2003; Margalit et al., 2005).



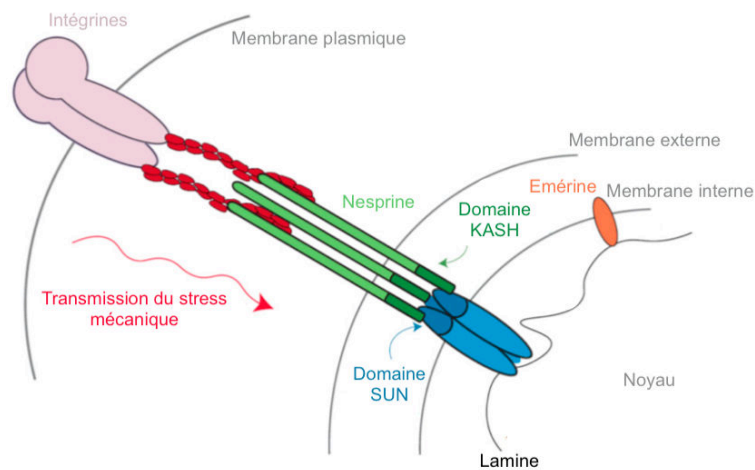
**Figure 21:** La famille des protéines à domaines LEM. La plupart de ces protéines sont ancrées au niveau de la MNI sauf LAP2 $\alpha$ , qui reste soluble, Ankle1 qui fait la navette entre le cytosol et nucléoplasme et Ankle2 qui est située au niveau du réticulum endoplasmique ou de l’enveloppe nucléaire. Cette famille est divisée en trois groupes selon la présence de domaines transmembranaires (TM) supplémentaires et de domaines MSC. D’après Barton et al., 2015.

Les protéines à domaines LEM sont décrites également pour réguler certains facteurs de transcription, comme la  $\beta$ -caténine (Markiewicz et al., 2006) et LIM Domain Only 7 (Lmo7) (Dedeic et al., 2011) ou des protéines de régulation de la transcription comme le récepteur associé aux protéines *Mothers against decapentaplegic homolog* (Smads) (Osada et al., 2003; Raju et al., 2003) et la protéine Rb (Parise et al., 2006).

Parmi les LAP, on retrouve également le récepteur B laminaire (LBR). Cette protéine se distingue des protéines à domaine LEM par son plus grand nombre de domaines transmembranaires. Avec ses 7 domaines transmembranaires, le LBR possède une activité stéroïde réductase, et a été décrit pour être nécessaire lors de changements de forme nucléaire et dans l’organisation de la chromatine dans les granulocytes (Hoffmann et al., 2002). De plus un rôle essentiel du LBR au cours du cycle cellulaire a également été montré où il contrôle la formation du fuseau mitotique (Ma et al., 2009; Tsai et al., 2006). A la différence des protéines à domaines LEM qui peuvent lier la chromatine *via* leur domaine *LEM-Like* ou *via* la protéine BAF, c’est la protéine *Heterochromatin protein 1* (HP1) qui permet l’association du LBR avec l’hétérochromatine (Polioudaki et al., 2001; Ye and Worman, 1996).

## 2. Le complexe LINC

Le complexe LINC est formé par l'association des protéines à *domaine Klarsicht*, *ANC-1*, and *Syne homology* (KASH) et des protéines *Sad1 Unc-84* (SUN) et constitue le lien physique entre le cytosquelette et le nucléosquelette. Ancrées dans la MNE, les protéines à domaine KASH se lient dans l'espace périnucléaire aux protéines SUN et interagissent directement ou indirectement avec les trois types de filaments du cytosquelette. Les protéines SUN, ancrites dans la MNI, interagissent quant à elles, avec les lamines et les composants nucléoplasmiques (**figure 22**) (Crisp et al., 2006; Haque et al., 2006; Padmakumar et al., 2005; Wilhelmsen et al., 2005; Zhen et al., 2002).



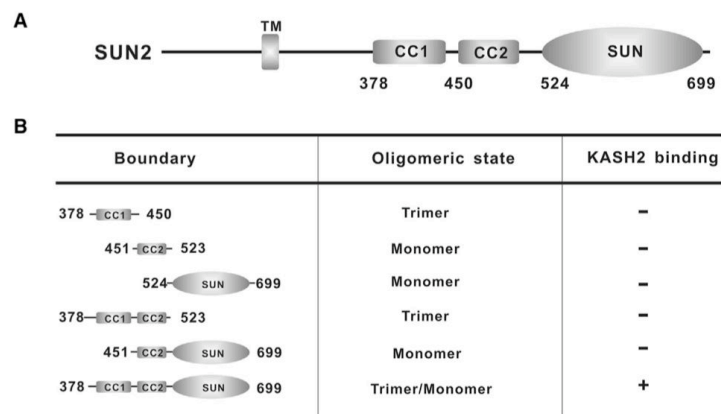
**Figure 22 :** Représentation schématique du complexe LINC. Ce complexe est composé des protéines SUN ancrites dans la MNI (représentées en bleu) et des Nesprines ancrites dans la MNE (représentée en vert). Les domaines SUN sont organisés de façon trimérique pour se lier au domaine KASH. D'après Bélaadi et al., 2016.

### a. Les protéines SUN

Il existe 5 isoformes de protéines SUN chez l'humain (SUN1 à SUN5). SUN1 et SUN2 sont ubiquitaires alors que SUN3, SUN4 également appelée *Sperm Associated Antigen 4* (SPAG4) et SUN5 appelée *SPAG4-Like* (SPAG4L) ont des expressions plus restreintes et sont retrouvées presque exclusivement dans la lignée germinale mâle (Göb et al., 2010; Jiang et al., 2011; Pasch et al., 2015; Yeh et al., 2015). Ce sont des protéines transmembranaires de types II ancrites à la MNI par leur domaine transmembranaire.

L'extrémité C-terminale s'étend dans l'espace périnucléaire et l'extrémité N-terminale s'étend dans le nucléoplasme où elles lient les lamines (Haque et al., 2006) et la chromatine (Schmitt et al., 2007; Turgay et al., 2014).

Les premières études par cristallographie des protéines SUN ont permis de révéler en 2012 la structure trimérique de SUN2 (Sosa et al., 2012; Zhou et al., 2012) avec la présence de domaines en superhélice (CC1 et CC2), prédits par bioinformatique (Lupas et al., 1991), juste avant la partie C-terminale qui contient le domaine SUN (**figure 23**). Ces domaines en superhélice joueraient le rôle d'espaceur moléculaire entre la MNI et MNE, permettant de maintenir la lumière de l'enveloppe nucléaire avec une largeur de 40 à 50 nm (Sosa et al., 2013). Ils ont également été décrits comme étant des domaines essentiels à la régulation de la conformation de la protéine ; CC1 et CC2 possèdent des rôles différents dans la régulation du pouvoir de liaison de la protéine SUN2 avec les protéines KASH (Nie et al., 2016; Stewart-Hutchinson et al., 2008; Wang et al., 2012) (**figure 23**). Bien que ces résultats aient tous été montrés *in vitro*, les travaux de Hennen et ses collaborateurs ont montré tout récemment, par une approche par spectroscopie à fluctuation de fluorescence, que SUN2 s'oligotrimérise *in vivo* dans des cellules U2OS appuyant ainsi ce qui avait été démontré jusqu'à ce jour (Hennen et al., 2018).



**Figure 23** : Caractérisation moléculaire de la protéine SUN2. **A**. SUN2 possède un domaine transmembranaire (TM) après sa région flexible en N-terminal, suivi de deux régions en superhélice : CC1 et CC2. En C-terminal se trouve le domaine SUN. **B**. Un résumé des données biochimiques relatives à l'état oligomérique associé à la capacité de liaison au domaine KASH. D'après Nie et al., 2016.

L'interaction des protéines SUN avec les protéines à domaine KASH se fait par l'intermédiaire du domaine SUN, composé d'un sandwich de feuilletts  $\beta$  antiparallèles dans lequel le KASH Lid, une unité bêta – bêta permet le maintien du peptide KASH. De plus, les protéines SUN1 et SUN2 sont liées de façon covalente avec les nesprines *via* un pont disulfure entre le résidu cystéine du peptide KASH situé en N-terminal et une cystéine du domaine SUN. Bien que cette interaction ne soit pas nécessaire à la formation du complexe LINC (Sosa et al., 2012), elle semble importante pour stabiliser le complexe SUN2 avec la nesprine-2 en réponse à des forces de tension (Jahed et al., 2015).

### **b. Les protéines à domaine KASH**

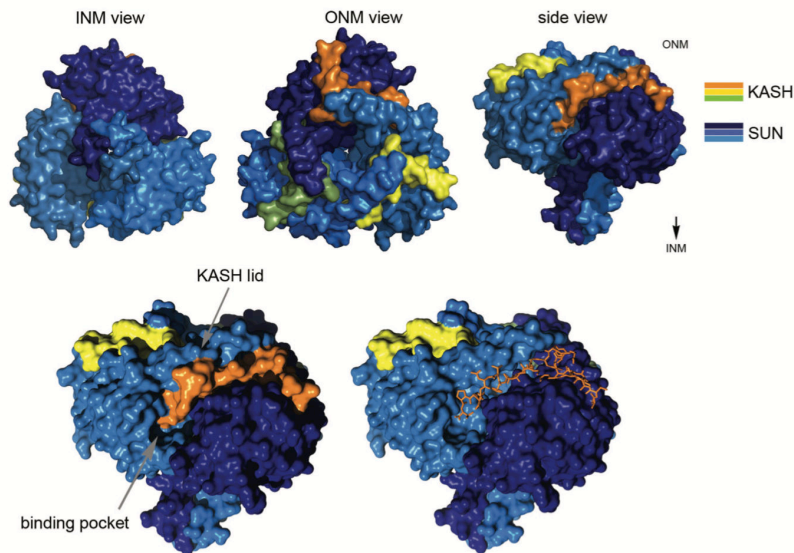
Chez les vertébrés, six protéines à domaine KASH ont été identifiées :

- Les *Nuclear Envelope Spectrin Repeat Proteins* (nesprines) 1 à 4 qui sont les premières à avoir été décrites comme étant des composants du complexe LINC (Crisp et al., 2006).
- La protéine KASH5 qui est seulement exprimée lors de la méiose (Morimoto et al., 2012).
- La *Lymphoid Restricted Membrane Protein* (LRMP) qui est spécifiquement exprimée dans la lignée lymphoïde (Behrens et al., 1994).

Dans le cytoplasme, les nesprines 1 et 2 se lient à l'actine (Padmakumar et al., 2004; Zhen et al., 2002) et aux moteurs moléculaires des microtubules comme la kinésine, la dynéine (Dawe et al., 2009; Yu et al., 2011) dans le cytoplasme. La nesprine 3 interagit avec la plectine qui lie les filaments intermédiaires et les intégrines  $\alpha 6 \beta 4$  dans les kératinocytes (Ketema et al., 2007, 2013; Postel et al., 2011; Wilhelmsen et al., 2005). La nesprine 4 quant à elle peut se lier aux microtubules *via* la kinésine (Roux et al., 2009). Bien que ces quatre nesprines soit retrouvées ancrées au niveau de la MNE, certaines isoformes issues d'épissages alternatifs comme la nesprine  $1\alpha$  et la nesprine  $2\alpha$  sont localisées au niveau de la MNI où elles interagissent directement avec les lamines et l'émerine (Haque et al., 2010; Libotte et al., 2005; Mislow et al., 2002; Wheeler et al., 2007; Zhang et al., 2005).

L'ancrage des protéines à domaine KASH dans la MNE se fait par une courte portion luminale de 20-30 résidus qui définit le peptide KASH (Nie et al., 2016; Sosa et al., 2012; Wang et al., 2012). Lors de l'association trimérique des nesprines et des protéines SUN, les peptides KASH s'insèrent au niveau du KASH-lid avec leur

extrémité C-terminale qui s'emboîte dans la poche de liaison des protéines SUN (**figure 24**). Cette interaction est indispensable à la formation du complexe trimérique, et la présence de mutations dans la poche de liaison ou dans le KASH-lid diminue la formation du complexe KASH-SUN (Sosa et al., 2012).



**Figure 24:** Le complexe SUN-KASH. Les trois peptides KASH (en jaune, orange et vert) se lient aux domaines SUN (en bleu) où ils sont fortement ancrés dans la poche de liaison et le KASH-lid de ces domaines. (*INM view*: vue depuis la membrane nucléaire interne ; *ONM view*: vue depuis la membrane nucléaire externe ; *side view* : vue de côté). D'après Rothballer et al., 2013

Le complexe LINC joue d'importants rôles dans diverses fonctions. Comme nous le verrons par la suite, le complexe LINC est indispensable dans la transmission des forces mécaniques de l'extérieur vers l'intérieur du noyau (Arsenovic et al., 2016) et dans l'ancrage et au positionnement du noyau dans la cellule au cours de la migration (Chang et al., 2015a; Kutscheidt et al., 2014). Il joue également un rôle dans la dynamique du cytosquelette en modulant l'activité de RhoA (Thakar et al., 2017). De plus, des travaux ont montré que la co-déplétion de SUN1 et SUN2 ralentit les mouvements de la chromatine durant la rupture de l'enveloppe nucléaire, suggérant ainsi le rôle important de ces protéines dans la progression mitotique (Turgay et al., 2014). Egalement, un rôle du complexe LINC dans le maintien de l'espace intermembranaire de l'enveloppe nucléaire dans les cellules soumises aux contraintes mécaniques a été démontré (Sosa et al., 2013). Enfin, parmi ces fonctions connues, le complexe LINC, et plus particulièrement les protéines SUN1 et 2, possèdent des fonctions liées à la réponse des dommages à l'ADN. Il a notamment été montré que ces

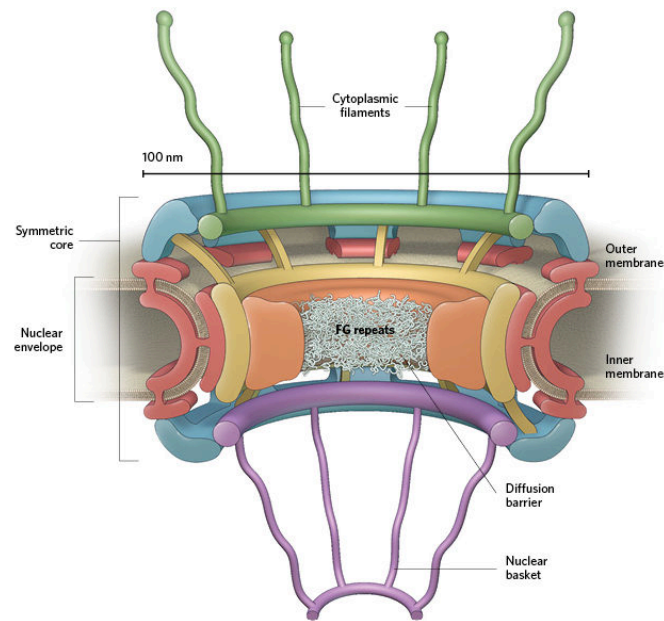
protéines interagissaient avec des acteurs de la réparation de l'ADN, comme la *DNA-dependent protein kinase* (Lei et al., 2012) et qu'elles jouent un rôle, en coopération avec les microtubules, dans le rapprochement des cassures d'ADN double-brin (Aymard et al., 2017; Lottersberger et al., 2015).

### 3. Les complexes du pore nucléaire

Les membranes nucléaires fusionnent autour des pores nucléaires pour former de larges complexes protéiques transmembranaires qui sont considérés comme une des plus grosses structures macromoléculaires dans une cellule interphasique avec une masse de 125 MDa chez les vertébrés (Stoffler et al., 1999). Formant un canal aqueux, ils assurent la circulation bidirectionnelle des molécules par une diffusion active ou passive. Le cœur du complexe a un diamètre d'environ 100 nm et une hauteur de 70 nm. Sa structure apparaît au microscope électronique comme 3 anneaux denses nommés selon leurs localisations : l'anneau cytoplasmique, l'anneau interne, et l'anneau nucléoplasmique (**figure 25**) (Bui et al., 2013; Eibauer et al., 2015). Au niveau de ce dernier anneau, 8 extensions en forme de tige se connectent sur la partie distale pour former le panier nucléaire qui jouerait le rôle de barrière répulsive entropique (Allen et al., 2000; Eibauer et al., 2015). Côté cytosol, 8 autres extensions émanent de l'anneau cytoplasmique et sont appelées filaments cytoplasmiques.

Les protéines qui constituent les complexes de pore nucléaire sont appelées nucléoporines (Nups) et peuvent être catégorisées selon leur fonction au sein du complexe :

- Les Nups transmembranaires composées d'hélices  $\alpha$  qui assurent l'ancrage du complexe aux membranes nucléaires (Madrid et al., 2006; Stavru et al., 2006).
- Les Nups composées de polypeptides flexibles capables d'adapter différentes conformations grâce aux répétitions de motifs Phénylalanine-Glycine (FG) qui assurent la barrière de diffusion dans la partie centrale du cœur du complexe (Hülsmann et al., 2012; Mohr et al., 2009).
- Les Nups avec des motifs de superhélices, solénoïde  $\alpha$  ou  $\beta$ -propeller qui constitue le panier du pore nucléaire et favorisent, dans la région centrale, les interactions entre nucléoporines (Devos et al., 2006; Hase et al., 2001).



**Figure 25 :** Représentation schématique d'un complexe de pore nucléaire. En violet : anneau nucléoplasmique. En vert : anneau cytoplasmique, et en bleu, rouge, orange et jaune : l'anneau intérieur avec la barrière de sélection composé des motifs répétés FG. D'après <https://www.the-scientist.com/infographics/infographic-the-nuclear-pore-complex-32456>.

Les ions et les métabolites peuvent diffuser librement ainsi que les macromolécules de taille inférieure à 5 nm ou 40 kDa. Cependant certaines petites protéines comme les histones qui sont fortement sollicitées lors de la phase S pour la compaction de l'ADN répliqué, et celles avec une masse supérieure à 40 kDa bénéficient quant à elles d'un transport facilité (Lyman et al., 2002). Celui-ci fait intervenir la reconnaissance spécifique, par un récepteur comme les karyophérines, d'un motif NLS présent sur la protéine à importer et de la GTPase *Ras-related nuclear* (Ran) sous forme liée au GDP (Lyman et al., 2002). Grâce à ce type de transport, jusqu'à 1000 translocations par seconde et par pore peuvent avoir lieu (Yang et al., 2004).

Dans les années 70, en isolant la fraction insoluble au détergent et par fractionnement de l'enveloppe nucléaire de cellules de foie de rat, Günter Blobel et Robert Aaronson montraient que les pores nucléaires étaient connectés à la lamina (Aaronson and Blobel, 1974, 1975). Étant donné l'existence de cette connexion associée au fait que les membranes nucléaires et la lamina peuvent être soumises à d'importantes contraintes mécaniques, il n'est pas surprenant que la structure et la taille des pores nucléaires puissent être régulées par la tension (Elosegui-Artola et al., 2017), comme



suggéré dans les années 90 par le groupe d'Ingber (Maniotis et al., 1997b). De plus, il a été montré que ces complexes de pore nucléaire sont associés à SUN1 mais pas SUN2, ainsi qu'à un réseau de protéines filamenteuses appelé « *pore-linked-filament* », comme l'actine, qui pourrait les connecter à d'autres composants cytoplasmiques ou nucléoplasmiques (Cordes et al., 1993; Kiseleva et al., 2004).

## II. Contraintes mécaniques et déformation du noyau

### 1. Déformation de l'enveloppe nucléaire en réponse aux contraintes mécaniques

Au cours du développement ou lors de processus tels que l'adhérence ou la migration, les contraintes mécaniques peuvent être dépendantes ou indépendantes du complexe LINC (**tableau 2**).

Les travaux pionnier du groupe de Donald Ingber ont montré dans les années 90 que les forces appliquées au niveau de la surface cellulaire sont transmises jusqu'au noyau (Sims et al., 1992). En utilisant des billes recouvertes avec un ligand des intégrines et avec une micropipette en verre, le groupe a appliqué des forces de tension sur les cellules endothéliales et a observé des distorsions de la membrane nucléaire. Un peu plus tard, en 1995, en utilisant une approche au microscope confocal pour l'analyse morphométrique 3D de chondrocytes présents in situ dans des explants cartilagineux, Farshid Guilak a montré que les cellules soumises à d'importantes forces de pression, présentaient une diminution de la hauteur du noyau d'environ 9% (Guilak, 1995). De plus l'utilisation de cytochalasine D, un inhibiteur du cytosquelette d'actine, empêche cette diminution (Guilak, 1995). En 1972, le groupe de Donald Fry a observé que les noyaux des cellules endothéliales d'aorte thoracique de chien, s'allonge lorsque celles-ci sont exposées à des contraintes de cisaillement stables contrairement à celles exposées à un flux sanguin turbulent (Flaherty et al., 1972). Une trentaine d'années plus tard, des études ont montré que ces contraintes de cisaillement sont responsables de cet aplatissement et de l'augmentation de la rigidité du noyau (Deguchi et al., 2005; Mathur et al., 2007; Philip and Dahl, 2008). L'exposition à l'étirement cyclique, comme c'est le cas au niveau de la peau (Takei et al., 1997), le système vasculaire (Letsou et al., 1990), ou le rein (Harris et al., 1992), a également été montré pour influencer la forme du noyau des fibroblastes (Langevin et al., 2005, 2010). Les études morphologiques de ces cellules en réponse à ces contraintes mécaniques montrent que l'aire de la section longitudinale du noyau est augmentée, et cette réponse est annulée avec l'ajout de Y27632 qui inhibe la tension contrôlée par la voie RhoA-ROCK (Langevin et al., 2010).

**Tableau 2 :** Les différentes contraintes mécaniques exercées sur le noyau cellulaire au cours de l'adhésion et durant la migration avec les réponses de l'enveloppe nucléaire associée. D'après Aureille et al., 2017

	Contrainte mécanique	Réponse Env. Nucléaire	Représentation schématique
Adhésion	Les changements de formes cellulaires sont transmis aux structures du cytosquelette Indépendant du complexe LINC	Pas de remodelage de la lamina	
Adhésion	Les forces de compression qui proviennent de l'actine cap (partiellement contrecarré par les filaments intermédiaires)	Remodelage de la lamina	
Adhésion	Les forces de tensions générées par la contractilité acto-myosine	Renforcement du complexe LINC Activation des canaux nucléaires mécanosensibles	
Adhésion	La compression nucléaire latérale par la contractilité acto-myosine	Remodelage de la lamina ?	
Migration	Les forces de tension qui proviennent des TAN lines	Renforcement du complexe LINC	
Migration	Les forces de tension qui proviennent de l'actine cap	Renforcement du complexe LINC	
Migration 3D	Les forces de tension générées par les structures d'acto-myosine associées aux vimentines	Renforcement du complexe LINC	
Migration 3D	Les forces de compression sur la partie antérieure du noyau	Remodelage de la lamina ?	
Migration 3D	L'environnement confiné	Perturbation de la lamina	

Cette déformation du noyau, retrouvée dans ces nombreux contextes physiologiques, dépend de plusieurs paramètres :

(1) Elle dépend de la réserve de membrane nucléaire disponible. En effet, l'enveloppe nucléaire est formée d'une double membrane lipidique : la MNE qui est en continuité avec le réticulum endoplasmique (RE), et la MNI. La synthèse lipidique est principalement assurée au niveau du RE où les lipides et phospholipides vont diffuser latéralement par continuité jusqu'à la MNE et MNI. De plus, il a été montré que le RE et la MNE synthétisent des lipides de stockage comme les triacylglycéroles, qui peuvent être ainsi réquisitionnés pour la biogénèse membranaire. Bien qu'on pensait que la MNI recevait passivement les lipides du RE et de la MNE, de récents travaux ont montré que le MNI possédait également des territoires actifs dans le métabolisme lipidique (Romanauska and Köhler, 2018).

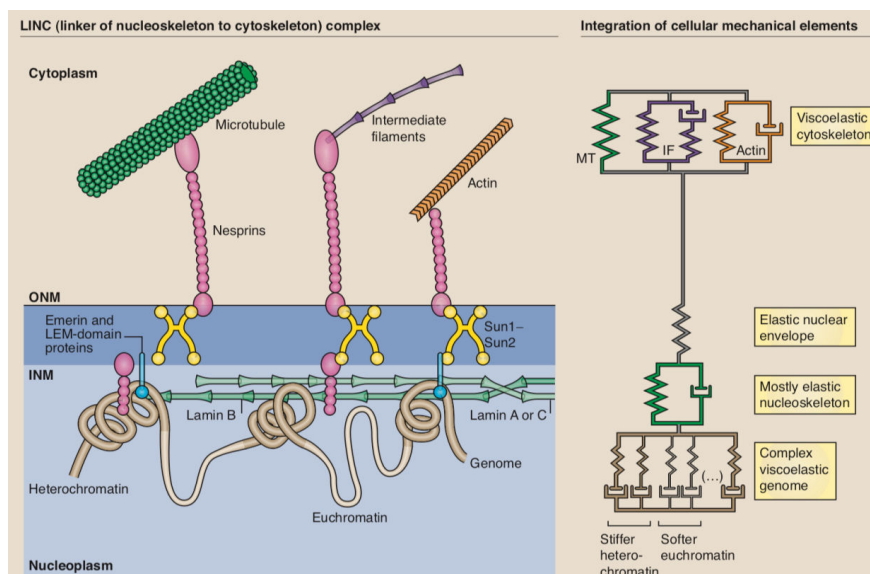
(2) Elle dépend également des propriétés mécaniques du noyau où l'expression des lamines et des protéines associées jouent un rôle essentiel (Dahl et al., 2004, 2005), mais également l'organisation de la chromatine, qui interagit directement avec la lamina (Dahl et al., 2004, 2005).

(3) Elle dépend enfin du cytosquelette entourant le noyau et notamment de l'actine périnucléaire (Khatau et al., 2009; Luxton et al., 2010) qui sera décrite, comme pour les propriétés mécaniques du noyau, dans les parties suivantes.

## **2. Les propriétés mécaniques du noyau**

L'expression différentielle des lamines influence les propriétés visco-élastiques du noyau. En exerçant des contraintes de tension à différentes échelles de temps, par l'utilisation de la technique d'aspiration à la micropipette sur noyaux isolés, les travaux de Kris Dahl et ses collaborateurs ont montré que la rhéologie du noyau suivait un modèle d'Ostwald-de Waele (ou modèle de loi de puissance) (Dahl et al., 2004, 2005). Cette loi décrit le cas des fluides à comportement indépendant du temps, là où des recherches antérieures ont étudié la viscosité du noyau dans un modèle de ressort-amortisseur (modèle de solide linéaire standard) (Guilak et al., 2000). Dans ce cas, le système est composé d'un ressort hookéen mis en série avec un amortisseur purement visqueux qui suppose une constante de temps unique. L'approche en loi de puissance permet ainsi de prendre en considération la contribution de l'enveloppe nucléaire, la chromatine et les compartiments sub-nucléaires aux propriétés visco-élastiques du

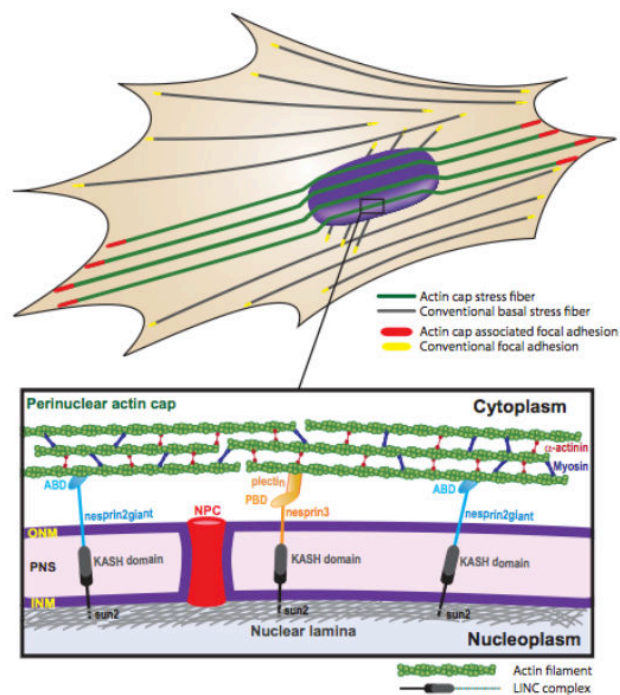
noyau en travaillant à différentes échelles de temps et de contraintes (**figure 26**). Par ces approches, il a été ainsi montré que la lamine A/C confère des propriétés visqueuses au noyau alors que la lamine B joue un rôle plutôt dans la résistance élastique à sa déformation (Harada et al., 2014; Rowat et al., 2013; Swift et al., 2013b). Ceci peut s'expliquer par le fait que la viscosité du noyau est en grande partie attribuée au nucléoplasme et à la chromatine (Pajeroski et al., 2007) et suggère un lien plus important entre la lamine A/C et la chromatine plutôt qu'avec la lamine B. Notamment, lorsque le noyau se gonfle et que la chromatine est perturbée, la viscoélasticité du noyau tend vers un comportement élastique (Dahl et al., 2005). De plus, une fraction soluble de la lamine A/C mature est détectable dans les cellules en interphase à la différence de la lamine B (Bronshtein et al., 2015, 2016; Buxboim et al., 2014) et la lamine A/C contient en C-terminale des sites de liaison à l'ADN (Stierlé et al., 2003) qui permet son interaction avec des portions génomiques *via* leurs domaines de liaisons aux lamines (LAD pour *lamins-associated domain*) (Guelen et al., 2008).



**Figure 26** : Les différentes propriétés visco-élastiques des composants de l'enveloppe nucléaire. Le cytosquelette possède des éléments viscoélastiques (filament intermédiaire pour IF, et actine) et des composant strictement élastique comme les microtubules (MT) ou l'enveloppe nucléaire. Bien que le nucléosquelette se comporte principalement comme un composant élastique, son interaction avec la chromatine à caractère visqueux fait de lui un composant également viscoélastique. D'après Dahl and Kalinowski, 2011.

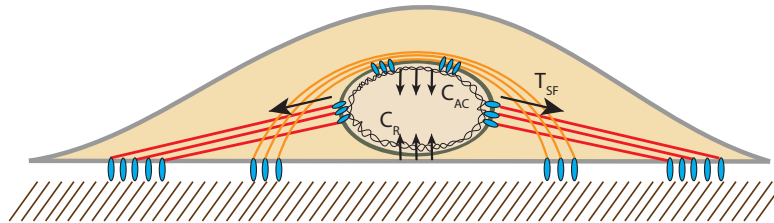
### 3. Le cytosquelette associé au noyau

Le remodelage du cytosquelette, en réponse à ces stimuli mécaniques est en partie responsable de l'aplatissement du noyau (Khatau et al., 2009; Luxton et al., 2010). Le terme d'actine périnucléaire, un sous-groupe de fibres de stress ancrées à la MEC par des adhérences focales à chaque extrémité (**figure 27**), est introduit par le groupe de Denis Wirtz en 2009 pour décrire le réseau d'actine venant spécifiquement au contact du noyau par l'intermédiaire de leur liaison au complexe LINC (Khatau et al., 2009). De façon similaire aux fibres de stress ventrales, elles sont sensibles à l'environnement mécanique, et leur formation est induite en réponse à une rigidification de la MEC (Kim et al., 2012a) ou de l'augmentation des contraintes de cisaillement (Chambliss et al., 2013a). Bien que ces forces de compression soient isotropiques au début de l'étalement, la distribution polaire des adhérences focales favorise également la forme allongée et aplatie du noyau en modulant l'alignement de l'actine cap (Versaevel et al., 2012).



**Figure 27** : Schéma descriptif de l'actine cap périnucléaire. Cette sous-famille de fibre de stress, composée de filaments d'actine F, de myosine et d'actine  $\alpha$ , est ancrée à la MEC au niveau des adhérences focales à chaque extrémité. L'actine cap est en contact avec le noyau par l'intermédiaire du complexe LINC. D'après Kim et al., 2012.

Hormis les forces de compression, le noyau peut également être soumis à des forces de tension. Par une approche de FRET avec l'utilisation d'un biosenseur basé sur une forme plus courte de la nesprine-2G, les travaux d'Arsenovic et ses collaborateurs ont montré que l'application de contraintes mécaniques sur le noyau, par la présence de l'actine périnucléaire, est transmise au complexe LINC par l'intermédiaire de ces nesprines (Arsenovic et al., 2016). La transmission de ces forces de tension a pour conséquence un renforcement des sites de liaisons entre l'actine et la nesprine-2G grâce à la formine *FH1/FH2 domain-containing protein 1* (FHOD1). Celle-ci fait office de « pont moléculaire » en rajoutant des sites de liaison à l'actine et en rapprochant les nesprines entre-elles par la formation de dimère de FHOD1 (Kutscheidt et al., 2014). Ce mécanisme reflète d'une certaine manière le processus de maturation des adhérences, dans lequel la tension génère des sites d'adhérence plus importants pour transmettre et résister à des forces intra et/ou extracellulaires plus intenses. Finalement, grâce à cette « maturation » des complexes LINC, le noyau peut ainsi subir de plus importantes contraintes de tension et favoriser de ce fait, la transmission des forces de l'extérieur vers l'intérieur du noyau.



**Figure 28** : Représentation schématique des contraintes mécaniques exercées sur le noyau. Le noyau peut subir des forces de tension provenant des fibres de stress ( $T_{SF}$ ) ainsi que des forces de compression de l'actine cap ( $C_{AC}$ ) et de la résistance à la déformation du substrat ( $C_R$ ). La lamina et les protéines associées vont jouer un rôle principalement dans la résistance à la déformation du noyau. L'ensemble va conduire à un état d'équilibre reflété à l'instant  $t$ , par la forme du noyau. D'après Bélaadi et al., 2016.

De plus, dans certains cas, les contraintes mécaniques de tension et de compression sont affaiblies par des composants du cytosquelette comme les filaments intermédiaires dans les kératinocytes (Almeida et al., 2015a), ou des composants du nucléosquelette, comme la lamina (Dahl et al., 2004). La forme finale du noyau va finalement refléter un état d'équilibre avec d'un côté les forces de résistance, qui proviennent principalement de la lamine A/C (Bertrand et al., 2014; Lammerding et al., 2004; Thiam et al., 2016) et de ses partenaires (Guilluy et al., 2014; Thiam et al.,

2016a), et de l'autre, des forces de compression et de tension appliquées au niveau de l'enveloppe nucléaire (**figure 28**). Dans les processus tels que la migration ou l'adhérence, l'enveloppe nucléaire est fortement sollicitée et les deux sous-parties de ce chapitre sont consacrées à la description de la déformation du noyau dans ces deux situations.

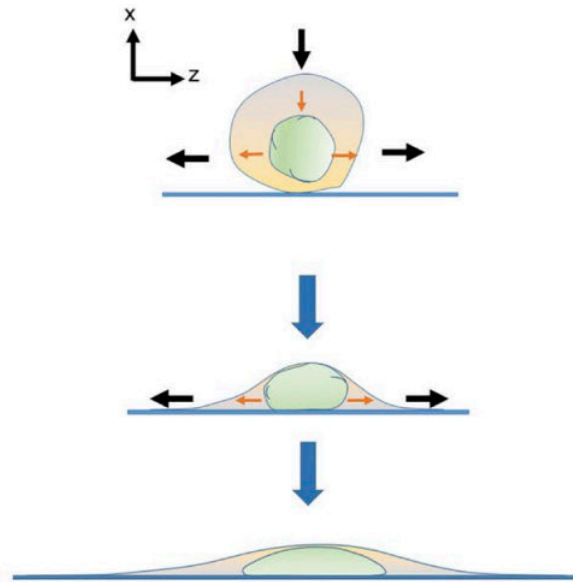
#### 4. Déformation nucléaire au cours de l'adhérence

Dans les premières phases de l'adhérence, l'étalement de la cellule et l'aplatissement du noyau sont opérés par des mécanismes indépendants de la contractilité du cytosquelette comme le suggèrent les travaux de Dickinson et ses collègues (**figure 29**). Dans cette étude, les auteurs ont montré que les noyaux de fibroblastes s'aplatissent en l'absence de contractilité. Ceci pourrait être dû au changement de la forme de la cellule qui possède au cours de cette première période de temps, un cytosquelette résistant à la tension et la compression (Li et al., 2015). De plus, le volume du noyau n'a pas varié au cours de leurs expériences, et le même groupe a plus récemment observé une diminution des « plis » de la lamine A/C au cours de l'adhérence (Neelam et al., 2016). Cela suggère que la déformation du noyau, qui mime celle de la cellule durant l'étalement, se fait à volume et aire constants. Celle-ci est par la suite limitée par une lamina qui sera complètement tendue et qui pourrait empêcher toute déformation supplémentaire (Lele et al., 2018).

Afin d'obtenir une déformation supplémentaire du noyau au cours de l'adhérence, une diminution du volume et/ou une augmentation de l'aire du noyau doit se produire. Les forces de compression nécessaires à la réalisation de tels mécanismes, sont dépendantes de la contractilité du cytosquelette d'actine, et notamment de l'actine périnucléaire (Khatau et al., 2009). Une étude récente a montré que les contraintes mécaniques du cytosquelette qui confinent le noyau sont une source de rupture de l'enveloppe nucléaire dans les cellules qui présentent un défaut d'organisation de la lamine A/C (Hatch and Hetzer, 2016). Cette tension générée de la cellule va induire ainsi la polarisation et la stabilisation de la lamine A/C (Buxboim et al., 2014; Ihalainen et al., 2015b; Swift et al., 2013b) et le renforcement du complexe LINC (Guilluy et al., 2014). Récemment, les travaux de Eloegui-Artola ont montré également qu'il existe des mécanismes d'activation des pores nucléaires en réponse à l'augmentation de la tension de membrane nucléaire notamment au niveau des courbures du noyau (Eloegui-Artola et al., 2017). Ces travaux postulent ainsi en faveur d'une augmentation de l'aire du noyau alors que d'autres travaux ont corrélé la condensation



de la chromatine avec une diminution du volume nucléaire lors de l'aplatissement du noyau (Damodaran et al., 2018). Dans tous les cas, le noyau est mécaniquement sollicité au cours de l'adhérence, et comme nous le verrons dans les chapitres suivants, la déformation de l'enveloppe nucléaire qui en résulte peut influencer la réponse cellulaire.



**Figure 29** : Déformation du noyau au cours de l'étalement. Représentation schématique d'une cellule au cours de la migration où l'on peut voir que la déformation du noyau (montrée par les flèches orange) suit la déformation de la cellule (flèches noires). Durant les premières phases de l'adhérence, l'étalement de la cellule et l'aplatissement du noyau sont opérés par des mécanismes indépendants de la contractilité du cytosquelette. D'après Lele et al., 2018.

## 5. Déformation nucléaire au cours de la migration

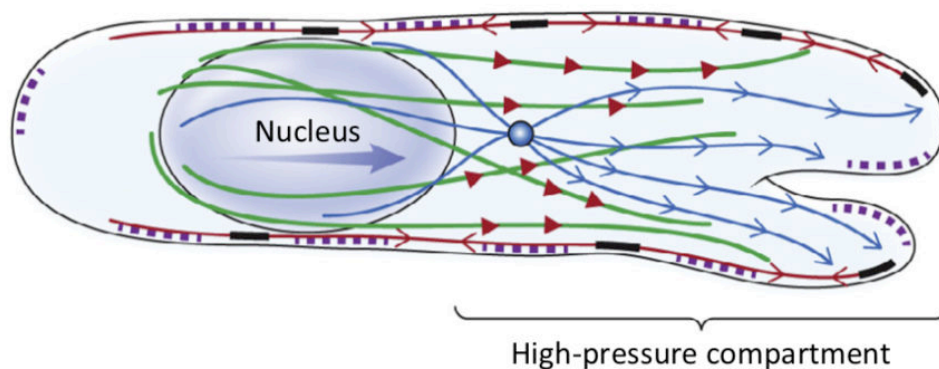
Le noyau peut également être contraint mécaniquement lors de la migration. La déformation nucléaire résultante est la conséquence du remodelage constant du cytosquelette au cours de ce phénomène (Lauffenburger and Horwitz, 1996) ou peut être initiée de façon passive par l'environnement externe comme dans des processus tels que la migration au travers d'espaces confinés (**tableau 2**).

Le groupe de Gundersen a décrit en 2010 les *transmembrane actin-associated nuclear lines* (TAN lines) comme des structures d'actine impliquées dans le contrôle des mouvements nucléaires au cours de la migration. Le complexe LINC qui interagit

spécifiquement avec les TAN lines par la nesprine-2G (Luxton et al., 2011) va permettre le mouvement du noyau vers l'arrière de la cellule en cours de migration en positionnant le centrosome entre noyau et le front de migration (Alam et al., 2015; Chang et al., 2015b; Kutscheidt et al., 2014; Luxton et al., 2010). Cette interaction est stabilisée dans le noyau par la protéine *Spindle Associated Membrane Protein 1* (Samp1) qui assure une connexion supplémentaire entre les protéines SUN2 et la lamine A/C (Borrego-Pinto et al., 2012) et dans le cytosol grâce à la formine FHOD1, présent à la fois au niveau des complexes LINC mais également au niveau des adhérences (Iskratsch et al., 2013; Kutscheidt et al., 2014). Le mouvement du noyau assuré par les TAN lines exerce ainsi des forces de tension et de pression au cours de la migration (Alam et al., 2015; Wu et al., 2014). De plus, il a été observé que les microtubules et les moteurs moléculaires associés peuvent également appliquer une contrainte de cisaillement sur le noyau conduisant ainsi à sa translocation et sa rotation (Malone et al., 2003; Patterson et al., 2004; Reinsch and Karsenti, 1997). En 2014, le groupe de Wirtz montre alors que le passage d'un épisode de mouvement persistant et rapide à un épisode de mouvement plutôt discret et lent, qui sont alternés au cours de la migration (Köppen et al., 2006), est lié à la présence de l'actine cap et des microtubules (Kim et al., 2014). La rotation du noyau est assurée par les microtubules et son moteur moléculaire, la dynéine, et permet la repolarisation de la cellule pendant l'épisode de migration à mouvements discrets. La formation de l'actine cap, associée au complexe LINC, permet alors la translocation du noyau pour le mouvement persistant de la migration (Kim et al., 2014).

La lamina joue également un rôle central dans la migration en 3D et plus particulièrement dans les espaces confinés où l'environnement externe va établir des forces de compression sur le noyau. La rigidité de la lamina détermine en effet l'agilité des cellules à migrer dans cet environnement particulier (Harada et al., 2014). Les travaux de Harada et ses collaborateurs montrent que la migration au travers d'espaces confinés est limitée par la présence de lamine A/C qui diminue la déformabilité du noyau, nécessaire pour le passage de la cellule. Au cours de la migration tridimensionnelle, le noyau peut également être sujet à des forces de compression et de tension émanant du cytosquelette. Dans certain cas, ce type de migration requiert la contractilité du cytosquelette qui permet de fournir les forces de pression suffisantes pour pousser le noyau vers le front de migration (Beadle et al., 2008). Afin de favoriser la migration des cellules dendritiques dans ces espaces restreints, la formation d'un réseau d'actine dépendant de ARP2/3 est nécessaire pour établir des forces de pression, perturber la lamine A/C et favoriser la déformation du noyau (Thiam et al., 2016a). Étant donné que les auteurs montrent qu'il s'agit ici d'un mécanisme indépendant de

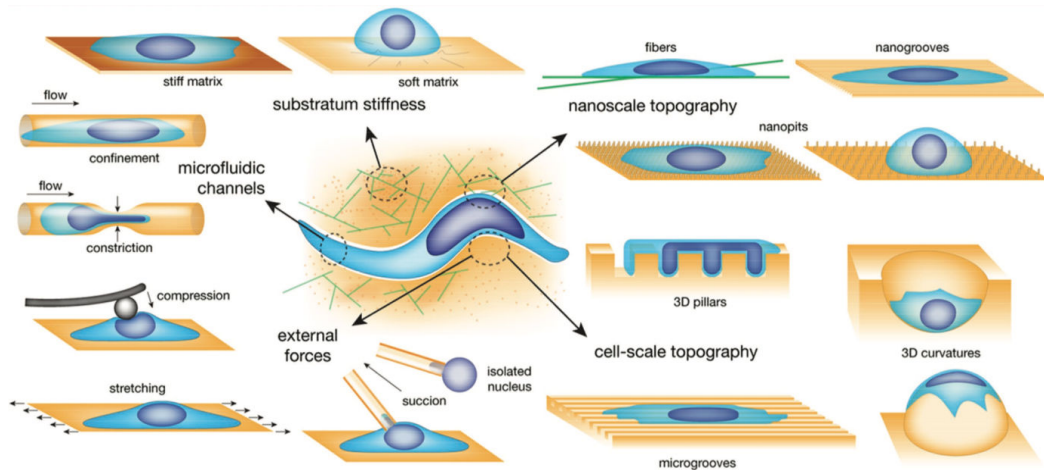
la contractilité, le réseau d'actine pourrait également agir comme une interface diminuant les forces de friction dans l'espace confiné. Enfin, les travaux du groupe de Yamada ont montré que le noyau séparait la cellule en deux compartiments: un compartiment antérieur dont la pression est supérieure à celle d'un autre compartiment situé à l'arrière du noyau (Petrie et al., 2014). Dans ce cas, la myosine et la vimentine interagissent avec la nesprine 3 indiquant que la tension générée pourrait être transmise aux filaments intermédiaires et au complexe LINC dans le but de tirer le noyau vers le front de migration. Cette translocation nucléaire favoriserait ainsi l'augmentation de la pression du compartiment antérieur qui pourrait directement impacter le noyau en venant le comprimer (**figure 30**). Ces résultats sont cohérents avec de précédentes observations montrant que les cellules déficientes pour SUN1 et SUN2 présentent des défauts de migration in vitro dans des matrices 3D de collagène (Khatau et al., 2012), ou in vivo durant la neurogénèse (Zhang et al., 2009) ou dans la rétine de souris (Yu et al., 2011).



**Figure 30** : Représentation schématique de la migration lobopodiale d'un fibroblaste dans un environnement tridimensionnel. La contractilité acto-myosine (en vert avec flèche rouge) favorise le déplacement du noyau vers l'avant de la cellule. L'augmentation de la pression dans ce compartiment est nécessaire à la translocation du noyau au cours de la migration. (En bleu : centrosome et microtubules, violet : des voies de signalisation dépendant de Rac1 et CDC42 présentes aux abords de la membrane plasmique, en rouge : les fibres de stress, en noir : les adhésions). D'après Petrie and Yamada, 2015.

### III. Conséquence de la déformation du noyau

Des travaux récents ont montré que des mécanismes mécanosensibles étaient présents dans le noyau (Guilluy et al., 2014; Ihalainen et al., 2015b; Swift et al., 2013b). L'enveloppe est un élément clef de cette mécanotransduction nucléaire et cette inhérence est appuyée par le fait que l'ensemble des maladies qui altèrent le lien entre le noyau et cytosquelette, telles que les laminopathies ou les myopathies, engendrent des réponses inadéquates des gènes impliqués dans la réponse mécanique (Bertrand et al., 2014; Bonne et al., 1999; Raharjo et al., 2001; Wheeler et al., 2007). Les différentes approches développées ces dernières années (**figure 31**) permettent maintenant de mieux étudier le rôle de la forme du noyau en recréant *in vitro* les conditions où la forme du noyau est fortement impactée.



**Figure 31 :** Représentation schématique des différentes approches développées pour caractériser les stimuli mécaniques et topographiques ressentis par la cellule dans leur environnement naturel. La réponse cellulaire à la rigidité de l'environnement peut être étudiée en modulant le module élastique de matrices artificielles. La rhéologie cellulaire peut être étudiée par l'application de forces mécaniques. La sensibilité de la cellule à la topographie peut être analysée à différentes échelles en utilisant des surfaces avec différents reliefs, et les approches de microfluidique permettent d'étudier la migration tridimensionnelle avec ou sans confinement. D'après Anselme et al., 2018.

Cependant, à part en travaillant sur noyaux isolés, dissocier véritablement le rôle de la forme du noyau sur les fonctions cellulaires, indépendamment des remodelages du cytosquelette, reste encore un challenge. Ce domaine de la mécanotransduction nucléaire est l'objet d'intenses recherches actuelles, et il a été montré jusqu'à présent que la déformation du noyau au cours de la migration et lors de l'adhérence pourrait

avoir des conséquences sur les fonctions cellulaires telles que la prolifération (Elosegui-Artola et al., 2017; Shiu et al., 2018; Vianay et al., 2018), la différenciation (Ihalainen et al., 2015b; Pajeroski et al., 2007; Swift et al., 2013b) ou encore la mise en place de systèmes de réparation de l'ADN (Denais et al., 2016; Raab et al., 2016a).

## 1. Déformation du noyau et mécanotransduction nucléaire

Si on reprend la description de la mécanotransduction vue dans le chapitre I, le noyau cellulaire pourrait agir comme une entité mécanosensible où l'enveloppe nucléaire jouerait un rôle dans la perception des contraintes mécaniques par le changement de conformation des lamines, la régulation de l'activité et le recrutement des protéines associées ainsi que de la mise sous tension de la membrane. En effet, parmi les remodelages de l'enveloppe nucléaire en réponse aux forces, on observe notamment la phosphorylation de l'émerine par la protéine *proto-oncogene tyrosine-protein kinase Sarcoma* (Src) (Guilluy et al., 2014), l'augmentation de l'enrichissement de la lamine A/C au niveau des complexes LINC (Chambliss et al., 2013b; Guilluy et al., 2014; Versaevel et al., 2014), leur changement de conformation (Ihalainen et al., 2015b) et l'augmentation de leur stabilité (Buxboim et al., 2014; Swift et al., 2013b), une modification de la taille des pore (Elosegui-Artola et al., 2017), ainsi que l'activation de phospholipases (Enyedi et al., 2016a) et le recrutement de la kinase Ataxia telangiectasia and Rad3-related protein (ATR) (Kumar et al., 2014).

L'expression de la lamine A/C, sa conformation, ainsi que ses modifications post-traductionnelles sont fortement modifiées lors de la déformation du noyau (Buxboim et al., 2014; Ihalainen et al., 2015a; Kim and Wirtz, 2015a; Swift et al., 2013b). En appliquant des forces de tension de 35 pN sur la Nesprine 1 de noyaux isolés de fibroblastes, les travaux du groupe de Keith Burridge ont montré que la lamine A/C est recrutée au niveau du complexe LINC, et que ce mécanisme est dépendant de la phosphorylation de l'émerine sur la tyrosine 74 et 95 (Guilluy et al., 2014). En appliquant cette fois-ci une contrainte de cisaillement sur noyau isolé, les travaux de Swift et ses collaborateurs ont montré qu'un résidu cystéine enfoui dans le domaine Ig de la lamine A/C, la cystéine 552, devient accessible (Swift et al., 2013b). De plus, l'augmentation de la tension générée de la cellule, qui engendre un aplatissement du noyau par l'actine périnucléaire, conduit également à une diminution de la phosphorylation de la lamine A/C sur la sérine 22, promouvant ainsi sa stabilisation (Buxboim et al., 2014; Swift et al., 2013). Le changement de conformation est également accompagné d'une diminution de la phosphorylation au niveau de la sérine

390. Celui-ci est très proche de la sérine 392, un résidu hautement conservé dont la phosphorylation est étroitement liée, avec la sérine 22, au désassemblage des lamines durant la mitose et à leur solubilisation dans le noyau (Gerace and Blobel, 1980; Heald and McKeon, 1990). Enfin, l'application d'une force de compression sur des cellules cultivées sur des hydrogels de forte compliance, engendre également un changement conformationnel de la lamine A/C. Ces changements de structure s'opèrent dans le domaine Ig de la lamine, de façon polarisée, et requière le complexe LINC (Ihalainen et al., 2015b; Kim and Wirtz, 2015b).

La forme du noyau apparaît donc comme un élément important dans la régulation des protéines de l'enveloppe. Le domaine Ig de la lamine A/C, qui possède des sites d'interactions avec d'autres protéines de l'enveloppe comme les protéines SUN ou l'émerine, semble être régulé directement par des changements de forme du noyau. En plus d'apporter une résistance à l'étirement en diminuant la tension de surface de la membrane nucléaire (Enyedi et al., 2016), l'intégrité de la lamine A/C influence directement l'expression de gènes, la réponse aux dommages de l'ADN et la réponse inflammatoire des cellules circulantes.

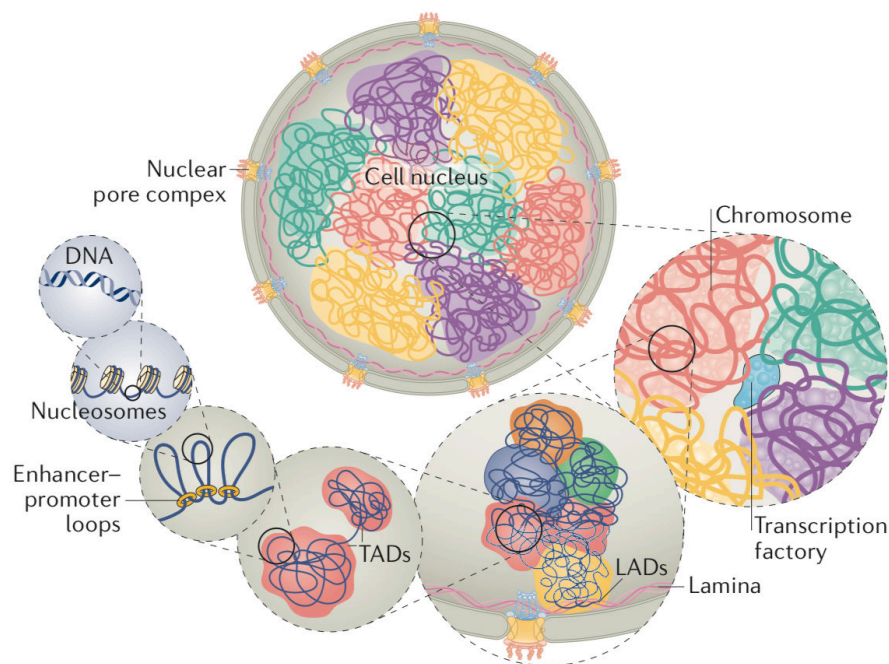
## **2. La déformation du noyau régule les fonctions cellulaires**

### **a. L'expression de gène**

La lamine A/C et les protéines partenaires interagissent avec des facteurs de transcription, les histones et la chromatine *via* les LAD (Belmont et al., 1993; Dreuillet et al., 2002; Guelen et al., 2008). Le remodelage important des lamines en réponse à la forme du noyau suggère fortement que l'expression de gènes pourrait être contrôlée par la déformation nucléaire. En effet, une étude récente a montré que l'application de forces sur le noyau permet l'étirement de la chromatine et l'expression d'un transgène rapporteur (Tajik et al., 2016). En utilisant un cytomètre magnétique, Tajik et ses collaborateurs ont appliqué des contraintes mécaniques sur la membrane plasmique par l'intermédiaire d'une bille magnétique recouverte d'un ligand RGD. Les auteurs de l'étude ont ainsi observé une déformation de la chromatine associée à l'augmentation de la transcription d'un transgène et cette réponse est abrogée en l'absence de lamine A/C ou des complexes LINC (Maniotis et al., 1997b; Tajik et al., 2016).

Antérieurement, il avait déjà été montré que la dynamique de la chromatine était sensible aux forces de tension exercées au niveau de la membrane plasmique. Ces

remodelages chromatinien étant très labiles, cela suggérerait un modèle de mécanotransduction nucléaire, plus rapide car le noyau jouerait directement un rôle mécanosenseur, court-circuitant ainsi les voies de signalisation initiées à partir des adhérences et du cytosquelette (Iyer et al., 2012). Par ailleurs, les protéines des corps de Cajal ont été montrées comme étant également sensibles aux forces de tension (Poh et al., 2012). Ces corps de Cajal sont des sites nucléaires extrêmement conservés au cours de l'évolution qui jouent un rôle essentiel dans la biogénèse et le recyclage des petites ribonucléoprotéines nucléaires impliquées, entre autres, dans l'épissage alternatif des pré-ARN messagers et ribosomiques (Dundr et al., 2004; Kaiser et al., 2008; Platani et al., 2002; Shevtsov and Dundr, 2011; Sleeman and Lamond, 1999). Les auteurs de l'étude ont notamment montré que ces protéines étaient sensibles aux forces de tensions appliquées au niveau des intégrines, et que ces remodelages étaient altérées lors de la déplétion de la lamina A/C ou de l'intégrité du cytosquelette (Poh et al., 2012).



**Figure 32 :** L'organisation fonctionnelle du génome. Chaque chromosome occupe des territoires distincts. Les chromosomes larges et transcriptionnellement pauvres sont plutôt situés en périphérie nucléaire, près de la lamina à la différence des chromosomes transcriptionnellement actifs et plus courts qui sont situés plutôt à l'intérieur du noyau. L'ADN se lie avec des histones pour former des nucléosomes. Ceux-ci forment la chromatine qui s'organise ensuite en boucle. La condensation de la chromatine s'organise en domaines topologiquement associés (TADs) qui eux-mêmes s'organisent en hétérochromatine ou euchromatine. Certains compartiments d'hétérochromatine sont liés au lamina *via* les LADs. D'après Uhler and Shivashankar, 2017.

Les chromosomes sont spatialement organisés au sein du noyau : l'hétérochromatine est plutôt localisée près de la lamina en périphérie nucléaire alors que l'euchromatine est décrite comme localisée dans l'espace intranucléaire (**figure 32**) (Bickmore and van Steensel, 2013; Gonzalez-Sandoval and Gasser, 2016; Lanctôt et al., 2007; Li and Reinberg, 2011). La chromatine occupe ainsi des territoires nucléaires bien distincts et les changements de conformations de la lamine A/C et leur polarisation, observés au cours de changements de forme du noyau, pourraient ainsi contrôler l'architecture chromatinienne en contrôlant spécifiquement certains territoires comme lors de la différenciation cellulaire par exemple. Les travaux du groupe de Denis Wirtz et Viola Vogel vont dans ce sens (Ihalainen et al., 2015; Kim and Wirtz, 2015). Lorsque le noyau des cellules somatiques est comprimé, par l'intermédiaire de l'actine périnucléaire, la lamine A/C ainsi que la fibrillarine et l'histone H4 hyperacétylée sur la lysine 5 (H4K5ac) sont apicalement polarisées au sein du noyau (Kim and Wirtz, 2015). La fibrillarine est un marqueur du centre fibrillaire des nucléoles, lieu de production de l'ARN ribosomal (Biggiogera et al., 2001; Tollervey et al., 1993), alors que H4K5ac a été montrée comme étant corrélée avec des gènes transcriptionnellement actifs (Kim et al., 2003; Kruhlak et al., 2001). Dans les expériences du groupe de Vogel, la compression des noyaux de fibroblastes engendre une polarisation de la lamine A/C qui est également observée dans les cellules souches mésenchymateuses en cours de différenciation ostéogénique (Ihalainen et al., 2015). Ces résultats viennent corroborer la précédente étude du groupe de Discher qui montrait que la rigidité de la matrice contrôlait la différenciation notamment par l'intermédiaire de l'expression et du changement de conformation de la lamine A/C (Buxboim et al., 2014). Le complexe LINC, étroitement lié à l'intégrité de la lamine A/C, semble également indispensable dans ces processus. L'application de contraintes mécaniques sur le noyau de cellules progénitrices d'oligodendrocytes engendre la formation d'hétérochromatine, reflété par la tri-méthylation de la lysine 9 sur l'histone 3 (H3K9me3). Cette réponse est alors abolie lors que les cellules sont déplétées pour la nesprine 1 (Hernandez et al., 2016).

D'autres protéines de l'enveloppe nucléaire semblent tout aussi importantes dans le contrôle de l'expression de gènes en réponse aux contraintes mécaniques appliquées sur le noyau. L'émerine a été montrée pour être enrichie au niveau de la MNE de cellules progénitrices endothéliales exposées de façon prolongée à des forces de tension cyclique (Le et al., 2016). L'enrichissement de cette protéine de la MNI, est sensible à la tension appliquée au niveau du complexe LINC (Guilluy et al., 2014), et est accompagnée de la polymérisation locale d'actine autour du noyau (Le et al., 2016). De ce fait, la concentration d'actine G nucléaire diminue, favorisant l'atténuation de la transcription, reflétée par des modifications épigénétiques comme la tri-méthylation sur



la lysine 27 de l'histone 3 (H3K27me3). Ces réarrangements de la chromatine, en réponse à la translocation de l'émerine sont notamment proposés pour protéger la chromatine des contraintes mécaniques en découplant le lien physique lamine A/C et chromatine (Le et al., 2016), contrairement à l'hypothèse qui supporte un contrôle local de la transcription pendant la différenciation (Ihalainen et al., 2015a; Kim and Wirtz, 2015a). L'actine nucléaire, contrôlée par les éléments du nucléosquelette, pourrait être un moyen indirect de moduler l'architecture de la chromatine en réponse à la forme du noyau, et permettrait également de contrôler directement la transcription en modulant l'activité de facteurs de transcription. Le groupe de Lammerding a montré que la polymérisation de l'actine péri-nucléaire, qui contrôle l'activité de MRTF-A (Vartiainen et al., 2007), est dépendante de la lamine A/C et de l'émerine (Ho et al., 2013b). Bien que les auteurs aient prouvé que le complexe LINC n'est pas impliqué dans cette réponse, les travaux de Plessner et ses collaborateurs ont montré plus récemment le rôle indispensable du LINC dans l'organisation de l'actine intranucléaire et du contrôle de MRTF-A au cours de l'adhérence (Plessner et al., 2015). YAP/TAZ, l'autre régulateur de transcription associé à la mécanotransduction, a aussi été décrit pour être contrôlé par le complexe LINC et le stress mécanique transmis au noyau. Le groupe de Robert Mauck a montré en 2015 que l'aplatissement du noyau associé aux contraintes émanant du cytosquelette était essentiel à l'activation de YAP/TAZ dans les cellules souches mésenchymateuses (Driscoll et al., 2015). Plus récemment, le groupe de Roca-Cusachs a montré que la forme du noyau, contrainte mécaniquement dans des cellules cultivées sur matrice rigide, contrôle l'ouverture des pores nucléaires (Elosegui-Artola et al., 2017). La taille des pores seraient ainsi augmentée au niveau de la courbure du noyau, par l'étirement plus important de la MNE, favorisant de ce fait, la diminution des résistances mécaniques liées au transport des molécules (Elosegui-Artola et al., 2017). Cette réponse est annulée lorsque les cellules sont déplétées pour la lamine A/C et le complexe LINC (Elosegui-Artola et al., 2017; Shiu et al., 2018).

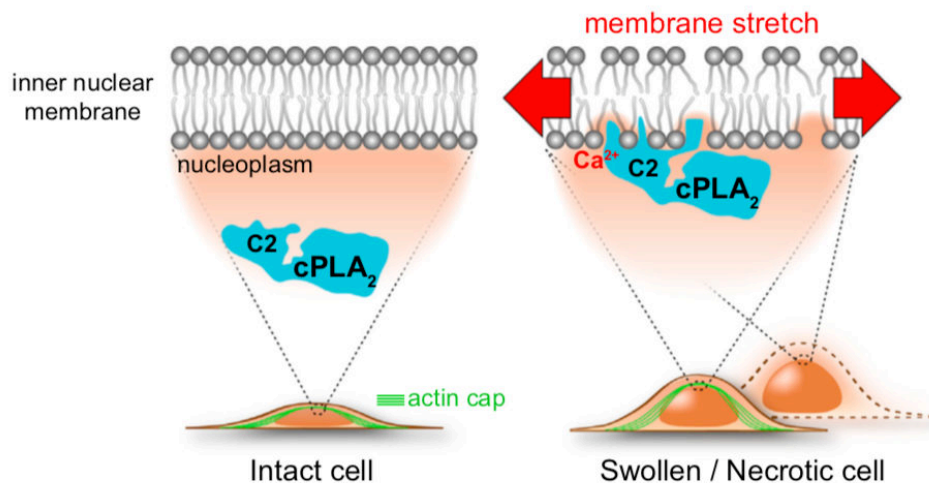
L'ensemble de ces études montre ainsi le rôle essentiel des changements de forme du noyau sur l'expression de gènes. De plus, d'autres études ont également mis en avant le rôle important de la structure de l'enveloppe nucléaire dans d'autres contextes comme la réponse aux dommages à l'ADN et pendant l'inflammation qui sont décrits dans cette dernière partie.

## b. La réponse aux dommages de l'ADN et l'inflammation

L'intégrité des membranes nucléaires, et donc la survie cellulaire, peuvent être compromises lorsque le noyau de la cellule est soumis à de fortes contraintes mécaniques, par exemple lors de la migration dans des espaces très confinés (Denais et al., 2016; Raab et al., 2016a). Lors de la rupture de ces membranes, l'enveloppe nucléaire est réparée par le recrutement de certaines protéines spécialisées de type ESCRT (*endosomal sorting complex required for transport*) impliquées dans le tri endosomal et les réparations membranaires. Bien que ces mécanismes touchent directement la structure de la lamine A/C et de l'enveloppe nucléaire, elles sont plutôt décrites comme une conséquence n'impliquant pas des processus de mécanotransduction.

Ainsi en 2016, les travaux du groupe de Matthieu Piel et de Jan Lammerding montraient pour la première fois que l'enveloppe nucléaire se rompt et se répare au cours de la migration en 3D (Denais et al., 2016; Raab et al., 2016a). Les espaces confinés du microenvironnement sont responsables des contraintes mécaniques appliquées sur le noyau mais une sur-activation des filaments d'acto-myosine, durant l'adhérence, peut également mener à cette conséquence (Takaki et al., 2017). Ces ruptures conduisent à une hernie de la chromatine au travers de l'enveloppe nucléaire accompagnée de dommages de l'ADN. Lors de la rupture, la machinerie de réparation endosomal sorting complexes required for transport III (ESCRT III), qui assure normalement la fermeture de l'enveloppe après la mitose (Olmos et al., 2015; Vietri et al., 2015) ou le contrôle qualité de la formation des pores nucléaires (Webster et al., 2016), est recrutée au niveau des cassures doubles-brin afin d'augmenter l'efficacité de réparation de l'ADN (Denais et al., 2016; Raab et al., 2016a). L'expression de la lamine A/C apparaît ainsi comme une protection essentielle à ces dommages en empêchant la déformation du noyau par sa rigidification (Harada et al., 2014). Étant donné que les protéines de l'enveloppe nucléaire peuvent être sous-régulées dans certains cancers (Matsumoto et al., 2015), la récurrence des dommages de l'ADN et l'expression de certaines voies spécifiques rencontrées lors de la rupture de la lamine A/C (Le Berre et al., 2012) peuvent notamment conduire à l'instabilité du génome et exacerber le risque d'apparition de mutations génétiques. Les travaux du groupe de Kris Dahl ont également montré que la surexpression d'un mutant de la lamine A/C, retrouvé chez les patients atteints de progeria et chez les individus âgés, contribue à la diminution du pouvoir de migration de cellules de mélanome (Ribeiro et al., 2014). Cette lamine A<sup>Δ50</sup> confère justement une rigidification du noyau et une diminution de sa déformabilité.

Bien que la plupart des mécanismes décrits à présent fassent écho principalement à des contraintes mécaniques liées au cytosquelette, le noyau peut également ‘gonfler’, terme décrit comme le « nuclear swelling », favorisant ainsi l’augmentation du volume et de la tension de membrane. Ce gonflement du noyau est retrouvé par exemple dans les cellules évoluant vers la nécrose (Berghe et al., 2014; Majno and Joris, 1995). La lamina joue également un rôle important dans la régulation de cette tension de membrane qui diminue avec la déplétion de la lamine A/C sans altérer le volume du noyau. Ce dernier étant plutôt maintenu par l’intégrité du cytosquelette d’actine (Enyedi et al., 2016). En voulant reproduire les processus du « nuclear swelling », le groupe de Niethammer a montré que la forme du noyau initie directement les processus d’inflammation (**figure 33**). En contrôlant la forme du noyau par l’utilisation d’une solution hypotonique, le groupe a montré que la PLA<sub>2</sub> est transloquée du nucléoplasme vers la MNI lorsque le noyau gonfle, activant ainsi son activité catalytique. Ce processus, également montré *in vivo*, est amplifié lors de la déplétion de la lamine A/C et la déstabilisation du cytosquelette d’actine (Enyedi et al., 2016). La PLA<sub>2</sub> permet ainsi la libération d’acide arachidonique, précurseur des chémoattractants éicosanoïdes, nécessaires au recrutement des leucocytes dans la réponse inflammatoire (Enyedi et al., 2013).



**Figure 33** : Déformation de l’enveloppe nucléaire et inflammation. Dans des cellules intactes (à gauche), la PLA<sub>2</sub> est soluble dans le nucléoplasme. En réponse à la tension de membrane nucléaire (à droite) lorsque le noyau des cellules gonfle lors de l’évolution de la cellule vers la nécrose, la PLA<sub>2</sub> est recrutée au niveau de la membrane nucléaire interne et active les voies de signalisation de l’inflammation. D’après Enyedi et al., 2016.

## Résumé chapitre II

### L'enveloppe nucléaire dans la mécanotransduction

- L'enveloppe nucléaire, qui délimite le compartiment chromatinien, est constituée des membranes nucléaires interne et externe, et des complexes protéiques qui y sont associés tels que les complexes LINC, les lamines et protéines associées, et les pores nucléaires.
- La forme du noyau est fortement affectée par les remodelages du cytosquelette et par l'environnement externe au cours de l'adhérence ou lors de la migration.
- Certaines protéines de l'enveloppe nucléaire sont décrites comme étant sensibles aux contraintes mécaniques transmises au noyau. Par exemple, l'expression, la conformation et les modifications post-traductionnelles de la lamine A/C sont régulées en réponse à des modifications des propriétés physiques de l'environnement cellulaire. De même, l'activation de la phospholipase A2 et l'ouverture des pores nucléaires seraient sensibles à la tension de membrane nucléaire.
- Les différentes formes du noyau, qui résultent de la balance entre les forces de résistances liées au noyau ou au cytosquelette, et les contraintes mécaniques, influencent directement l'expression de gènes et certaines fonctions cellulaires comme l'inflammation et la réponse aux dommages de l'ADN

# Objectif de la thèse

## Analyse des changements de formes du noyau dans le contrôle de l'activité des facteurs de transcription

Ces dernières années ont véritablement été une succession de découvertes remarquables sur l'implication du noyau dans la mécanotransduction. Ces études indiquent que le noyau n'est plus une organelle passive, limitée à la compartimentation de la chromatine, mais au contraire, qu'il joue un rôle clef dans la réponse cellulaire aux stimuli mécaniques. Un véritable équilibre physique de résistances et de déformations, liée aux propriétés intrinsèques du noyau et aux contraintes appliquées, permet une réponse mécanique rapide impliquant l'expression de gènes ou la régulation de fonctions cellulaires. Néanmoins, les études rhéologiques du noyau dans ces processus de mécanotransduction impliquent de découpler complètement la forme du noyau du cytosquelette et de son environnement externe. En effet, les réponses cellulaires observées en réponse aux contraintes mécaniques sont rarement imputées exclusivement à la forme ou la déformation du noyau vu le lien étroit qui existe entre forme du noyau, cytosquelette et complexes d'adhérence cellulaire.

En utilisant une méthode visant à découpler la forme du noyau, des réarrangements du cytosquelette, nous avons souhaité savoir si les changements de formes nucléaires permettraient de contrôler l'activité de facteurs de transcription. Ainsi, par l'utilisation d'approches biophysiques, biochimiques et d'immunofluorescence, nous avons trouvé que le changement de forme du noyau était suffisant à l'activation d'un réseau de régulateurs de transcription.

Par ailleurs, par des études de transcriptomique sur les gènes régulés par les facteurs de transcription mis en évidence, nous avons pu montrer que l'enveloppe nucléaire pouvait agir comme un senseur mécanique régulant la progression du cycle cellulaire en réponse aux forces appliquées sur le noyau.

# Matériel et Méthodes

## 1) Culture cellulaire et réactifs

Les lignées de fibroblastes (MRC-5 et CCD-18Co), et de cellules cancéreuses (HeLa) ont été achetées chez ATCC. Les cellules HeLa-FUCCI ont été généreusement offertes par le Dr Yves USSON (TIMC-IMAG Lab, Grenoble, France). Les cellules ont été cultivées dans du Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal et 1% d'antibiotique (pénicilline et streptomycine). Les fibroblastes et les HeLa ont été cultivés dans un milieu de culture avec respectivement du glucose à 1 g/L et 4,5 g/L.

Les hydrogels de polyacrylamide de différentes rigidités fonctionnalisées avec du collagène de type 1 ont été achetés chez Matrigen (Petrisoft 35).

Pour les expériences de biochimie, les cellules sont directement lysées dans du tampon de Laemmli pour Western Blot (Tris- HCl pH 5.8 0,12 M, Glycérol 10%, Sodium Dodecyl Sulfate 5%,  $\beta$ -mercaptoethanol 2,5%, bleu de bromophénol 0,005%). Le lysat est ensuite chauffé à 95°C pendant 6 minutes avant chargement.

Les cellules ont été traitées avec les composés suivants : Blebbistatin (Tocris - inhibiteur de la myosine II), à 100  $\mu$ M, Importazole (Sigma - inhibiteur de la  $\beta$ -importine) à 40  $\mu$ M, acide Okadaic (Santa Cruz - inhibiteur des phosphatases 1A et 2A), à 100 nM, le SB203580 (Cell Signaling – inhibiteur des MAPK kinase-2) à 25  $\mu$ M, le Y27632 (Tocris – inhibiteur de P160Rock) à 50  $\mu$ M, le SP600125 (Sigma – inhibiteur de JNK) à 50  $\mu$ M et le Bapta/AM (Sigma – chélateur du calcium) à 50  $\mu$ M.

La viabilité cellulaire a été mesurée à partir de l'intégrité membranaire et de l'activité des estérases par l'utilisation de la Calcéine/AM et de l'homodimer d'éthidium (LIVE/DEAD Viability Kit – Thermofisher L3224).

## 2) Anticorps et marquage de l'actine

La phalloïdine Alexa Fluor 488 a été utilisée pour le marquage de l'actine-F ainsi que les anticorps suivants :



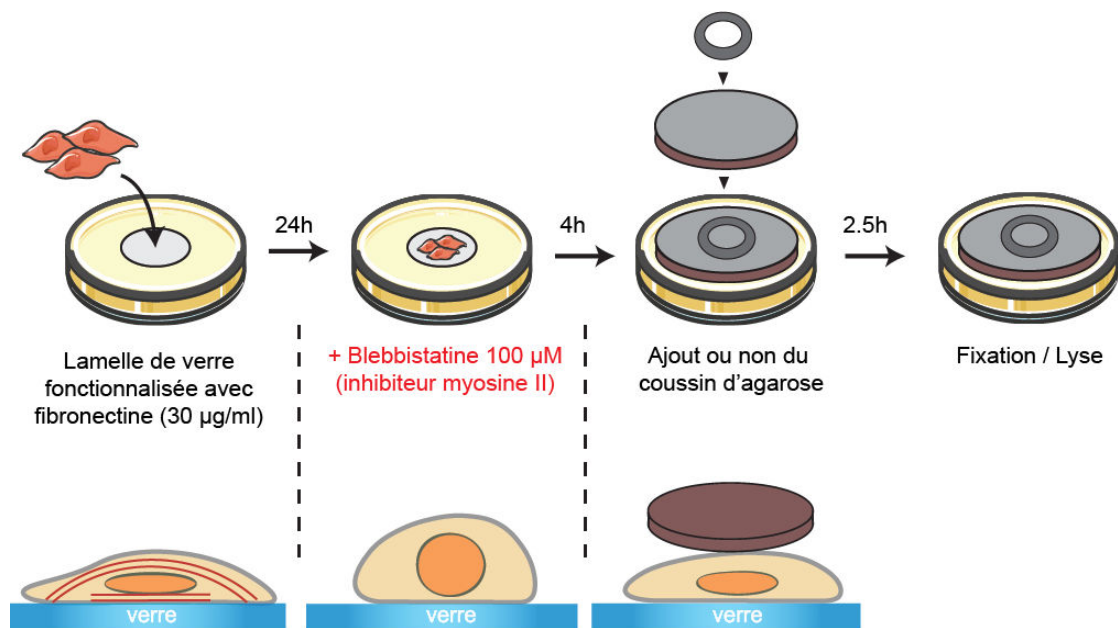
**Tableau 3 :** Liste des anticorps avec la référence et concentration pour la méthode indiquée (WB : Western Blot ; IF : Immunofluorescence)

Name	Fournisseur	Référence	Concentration	Méthode
GADPH	Thermofisher	MA5-15738	1/2000	WB
JNK	Cell signaling	9252	1/750	WB
p-JNK (Thr183/Tyr185)	Cell signaling	9251	1/750	WB
p-c-Jun (ser73)	Abcam	ab30620	1/250	IF
p-c-Jun (ser63)	Cell signaling	2361	1/250	IF
KIBRA	Cell signaling	8774	1/1000	WB
Lamin A	Abcam	Ab26300	1/2000	IF
LATS1	Cell signaling	3477	1/1000	WB
p-LATS1 (Thr1079)	Cell signaling	8654	1/1000	WB
MST1	Cell signaling	3682	1/1000	WB
p-MST1 (Thr183)/MST2 (Thr180)	Cell signaling	3681	1/1000	WB
PTPN14	Cell signaling	13808	1/1000	WB
Sun1	Abcam	Ab124770	1/750	WB
Sun2	Abcam	Ab124916	1/750	WB
paxillin	Abcam	32084	1/250	IF
Vinculin	Sigma	V9131	1/2000	WB
Yap	Santa Cruz	Sc101199	1/200	IF
Yap	Cell signaling	8418	1/1000	WB
p-Yap (ser127)	Cell signaling	13008	1/1000	WB
GFP	Santa Cruz	Sc9996	1/250	WB
Alexa 568 goat anti Mouse	Invitrogen	A11004	1/500	IF
Alexa 488 goat anti Rabbit	Invitrogen	A11008	1/500	IF
Alexa Fluor 647 Phalloidin	Invitrogen	A22287	1/50	IF

### 3) Compression nucléaire et coussin d'agarose

Pour compresser les noyaux, nous avons adapté une méthode précédemment décrite par Dumont et Mitchison (Dumont and Mitchison, 2009) : une solution d'agarose ultrapure (FMC bio products) à 2% dans du DMEM est chauffée jusqu'à ébullition et

5 ml sont déposés dans des boîtes de Petri de 60 mm. Après solidification, une pièce d'agarose circulaire de 33 mm de diamètre est découpée et placée dans du Phosphate Buffered Saline (PBS). Ce coussin d'agarose est ensuite déposé délicatement sur les cellules préalablement traitées ou non avec de la blebbistatine (**figure 34**) pendant 4h et une lamelle de verre de 32 mm de diamètre surmontée d'une rondelle de 125 mg sont soigneusement placées dessus pour maintenir la compression du coussin pour 2,5h. Par la suite, les cellules sont lysées pour les études biochimiques ou fixées pour les analyses par immunofluorescence.



**Figure 34** : Schéma représentatif de la méthode utilisée pour appliquer une contrainte sur le noyau, indépendamment du cytosquelette.

#### 4) Plasmides

Le plasmide pEGFP C3-Lats1 a été offert par Marius Sudol (Addgene plasmide #19053). Les mutations T1079D et T1079E ont été introduites dans ce plasmide en utilisant le kit de mutagenèse Q5 (NEB) et les primers sens :

CTATGAATTTgacTTCCGAAGGTTTTTTTG et  
 CTATGAATTTgagTTCCGAAGGTTTTTTTGATGAC

avec le primer antisens : AATGCATGTTTCAGGATGC.

Toutes les constructions ont été vérifiées par séquençage ADN. La fonction phosphomimétique de Lats1 a été vérifiée par l'analyse par Western Blot (WB) de la phosphorylation de YAP. Les plasmides ont été transfectés à l'aide de Lipofectamine 2000 (Invitrogen) selon les instructions du fabricant.

Le plasmide pRL-SV40P a été offert par Ron Prywes (addgene plasmide #27163) et le plasmide 8xGTIIIC-Luciferase a été offert par Stefano Piccolo (addgene plasmide #34615). Pour les mesures d'activité de YAP, les cellules HeLa ont été co-transfectées avec le plasmide 8xGTIIIC-Luciferase et pRL-SV40P et l'activité a été mesurée à l'aide du Dual-luciferase reporter assay (Promega) avec la Renilla comme contrôle interne. Les activités sont affichées en unité arbitraire. Le plasmide rapporteur GFP de AP1 (Cignal AP1 Reporter Assay Kit GFP) a été acheté chez QIAGEN (CCS-011G). Le plasmide pLL3.7 K122-ires-GFP-TEAD-reponsive-H2B mCherry a été offert par Yutaka Hata (addgene plasmide #68714).

## **5) Analyse de l'activité des facteurs de transcription**

Afin de mesurer l'activité des facteurs de transcription nous avons mesuré leur capacité à se lier à leur séquence consensus cible grâce au kit Protein DNA combo array (Affymetrix) qui permet d'analyser simultanément l'activité d'interaction de 345 facteurs de transcriptions. Chaque point correspond à une séquence d'ADN spécifique. L'utilisation du kit a été réalisée selon les recommandations du fabricant : les échantillons d'extraits nucléaires de cellules MRC-5 traitées avec du DMSO ou de la blebbistatin (avec et sans coussin d'agarose) sont mélangés avec les sondes d'ADN pré-marquées, la pureté de chaque fraction nucléaire ayant été préalablement vérifiée par WB. Dix microlitres du mélange contenant les sondes sont combinés avec 15 µg d'extraits nucléaires. Après des étapes de lavages, la membrane est exposée à l'aide d'un appareil Chemidoc (Biorad). L'intensité de chaque tâche est mesurée avec le logiciel ImageJ et est présentée en unité arbitraire. Les signaux surexposés sont écartés et un seuil minimum d'augmentation est appliqué. Les facteurs de transcription sélectionnés sont ceux dont les niveaux d'activité en condition où le noyau est comprimé, sont similaires aux cellules contrôles. L'activité d'AP1 a également été mesurée spécifiquement à l'aide du kit AP1 Reporter (BPS Bioscience).

## 6) Microscopie

Les cellules sont fixées dans une solution à 3,7% de paraformaldehyde en PBS (Sigma) pendant 20 minutes puis perméabilisées avec du PBS 0,1 % Triton (Sigma). Les cellules sont ensuite saturées avec une solution de blocage (PBS Tween 0,2% contenant 2,5% d'albumine de sérum bovin) pendant une heure. Les cellules sont incubées toute la nuit à 4°C avec l'anticorps primaire dans la solution de blocage, puis rincées trois fois avec du PBS Tween 0,2%. Les cellules sont ensuite incubées avec l'anticorps secondaire à température ambiante pendant une heure puis rincées trois fois avec du PBS Tween 0,2%. Après deux rinçages au PBS, les échantillons sont montés sur lamelle avec du milieu de montage contenant du DAPI (Prolong – Invitrogen). Les cellules sont par la suite observées au microscope confocal en mode spinning disk (Spinning Disk Andromeda RILL-FEI, EMCCD iXon 897 camera avec alpha-plan Apo 63X/146 objectif à huile). Les champs sont pris de façon aléatoire et les régions d'intérêt sont analysées après une projection en Z du maximum d'intensité de chaque image. Pour l'analyse d'intensité de fluorescence de p-Jun (Ser63 et Ser73), la fluorescence nucléaire totale corrigée (FNTC) est calculée selon la formule suivante :

$$FNTC = (Densité\ intégrée)_{Noyau} - (Aire_{Noyau} \times (Moyenne\ de\ fluorescence)_{Bruit\ de\ fond})$$

Les adhérences, la viabilité cellulaire et le cycle cellulaire des HeLa-FUCCI ont été imagés par microscopie à épifluorescence, avec les objectifs suivants : Plan-Apochromat 40x/1.4 immersion à huile (pour les adhérences), Plan-Neofluar 20x/0.5 (pour les HeLa-FUCCI) et un Plan-Neofluar 10x/0.3 (pour la viabilité cellulaire). La taille et le nombre des adhérences ont été analysés à l'aide du Focal Adhesion Analysis Server (<http://faas.bme.unc.edu>). Le volume a été calculée à l'aide du plugin « 3D Object Counter V2.0 » du logiciel FIJI dans lequel un seuil de détection a été appliqué sur les noyaux marqués au Hoeschst.

## 7) Micromotifs

Les lamelles de verre avec les micromotifs circulaires ont été fabriquées en utilisant les premières étapes de la technique sur verre décrite par Vignaud et al. (2014). Les lamelles de verre (VWR) sont traitées à la lampe plasma pendant 30 secondes et incubées pendant 30 minutes à température ambiante avec du poly-L-lysine-polyéthylène glycol (pLL-PEG, SuSoS) à 0,1 mg/ml dilué dans l'acide 4-(2-

hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique (HEPES) à 10 mM ; pH 7,4 (SIGMA). Après lavage au PBS déionisé (dPBS, Life Technologies), la lamelle est placée avec la face revêtue de pLL-PEG vers le bas sur la partie chromée du photomasque en quartz (Toppan) pour le traitement photolithographique (5 minutes d'exposition aux ultraviolets, UVO Cleaner Jelight). Par la suite, la lamelle est retirée du masque et revêtue de fibronectine à 20 µg/ml (Sigma) diluée dans du dPBS pendant 30 minutes à température ambiante.

## 8) shRNAs

Les lentivirus avec shRNAs dirigés contre les protéines humaines SUN1, SUN2, lamine A/C et le lentivirus contrôle ont été achetés chez Open Biosystems.

Séquence Lamine A/C (Oligo ID TRCN0000061837) :

5'CCGGGCCGTGCTTCCTCTCACTCATCTCGAGATGAGTGAGAGGAAGCAC  
GGCTTTTTTG3'

Séquence SUN1 (Oligo ID TRCN0000133901) :

5'CCGGCAGATACTGCATCATCTTTCTCGAGAAAGATGATGCAGTGTAT  
CTGTTTTTTTG3'

Séquence SUN2 (Oligo ID TRCN0000143335) :

5'CCGGGCCTATTCAGACGTTTCACTTCTCGAGAAGTGAAACGTCTGAATA  
GGCTTTTTTTTG3'

24h après infection, les cellules infectées sont sélectionnées grâce à l'ajout de puromycine (10 µg/ml) pendant 24h. L'efficacité de déplétion de SUN1, SUN2 et de la lamine A/C est évaluée au bout de 5 jours par Western Blot.

## 9) siRNAs

Les cellules ont été transfectées avec la Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen) conformément aux instructions du fabricant. Le siRNA contrôle (Silencer™ Negative Control No. 1 Ambion™ AM4611) et les siRNAs dirigés contre Jun (humain - Silencer Select s7660) et YAP (humain - Silencer select s534572) ont été achetés chez Life Technologies.

La Lipofectamine RNAiMAX est diluée dans le milieu de culture correspondant à chaque type cellulaire sans SVF. Les siRNAs sont dilués dans le milieu de culture sans SVF correspondant au type cellulaire à 10  $\mu\text{M}$  final puis la Lipofectamine RNAiMAX diluée est ajoutée au siRNA dans des proportions 1:1. Après une incubation de 5 minutes à température ambiante, les complexes Lipofectamine RNAiMAX/siRNA sont ajoutés aux cellules. Celles-ci sont incubées minimum 36 heures dans une atmosphère à 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> avant toute expérience.

## 10) Microscopie à force atomique

Un microscope à force atomique (module CellHesion, JPK Instruments) monté sur microscope optique (Olympus) a été utilisé pour mesurer la hauteur de cellules isolées et pour la compression nucléaire. Les expériences ont été conduites à 37°C en utilisant le system PetriDishHeater avec un milieu de culture DMEM tamponné avec 20 mM de HEPES (Ph 7.6) et complété à 1% de sérum de veau foetal. Des leviers sans pointe (Tipless arrow-TL1-50 - Nanoworld) avec une raideur de 0,03 N.m<sup>-1</sup> ont été utilisés et calibrés selon la méthode du bruit thermique.

Pour mesurer la hauteur des cellules, les cellules MRC-5 ont été cultivées pendant 24 heures sur des substrats de 1 kPa et 50 kPa fonctionnalisés au collagène de type I. Après une première approche sur la surface adjacente à la cellule, le levier est positionné sur la cellule puis une approche est réalisée afin de mesurer le delta de hauteur.

Pour la compression nucléaire, les cellules sont placées dans une boîte de culture de 35 mm de diamètre avec une grille de coordonnées (IBIDI). Après positionnement du levier sur le noyau, le mode « hauteur constante » (3  $\mu\text{m}$  en dessus de la surface adjacente) a été utilisé pendant 120 minutes.

## 11) PCR en temps réel avec rétrotranscription

L'ARN total a été purifié à partir des cellules à l'aide du kit RNAqueous Micro (Ambion-Life Technologies) selon les recommandations du fabricant. Pour la purification, 150  $\mu\text{l}$  de tampon de lyse par condition (150 000 cellules) ont été utilisés.

L'élimination des traces d'ADN a été réalisée grâce au kit DNA Free (Ambion). 2  $\mu\text{l}$  de tampon de DNase et 1  $\mu\text{l}$  de DNase 10X ont été ajoutés par condition puis laissés à

37°C pendant 30 minutes. 3 µl de la solution stop DNase 10X a été ajoutée, les ARNm ont été récupérés après 2 minutes de centrifugation. La qualité de la purification ainsi que le dosage des ARNm ont été évalués à l'aide de l'appareil NANODROP.

La rétrotranscription en ADN complémentaire (ADNc) a été réalisée à l'aide du kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems). Brièvement, pour chaque réaction, 4 µg d'ARN, 1 µl d'oligo(dT)<sub>12-18</sub> et 1 µl de 10 mM dNTPs dans un volume final de 12 µl d'eau purifié, sont chauffés à 65°C pendant 5 minutes puis déposés sur glace. Après une brève centrifugation, 4 µl de tampon 5X, 2 µl de DTT 0,1M et 1 µl de RNase OUT ont été ajoutés et incubés pendant 2 minutes à 37°C. L'incubation est poursuivie pendant 50 minutes à 37°C après ajout de 1 µl de la transcriptase M-MLV, la réaction est stoppée par une incubation de 15 minutes à 70°C.

La PCR quantitative en temps réel (qPCR) en haut débit a été réalisée au *Center for Gastrointestinal Biology and Disease Advanced Analytics* (AA) Core à l'Université de Caroline du Nord (Chapel Hill NC 27599). Les références des 48 sondes Taqman sont indiquées dans le tableau ci-dessous. L'expression de chaque gène a été normalisée à partir d'une courbe standard générée à partir d'un ensemble de cellules en condition contrôle. La GAPDH a été utilisée comme gène de référence. Les données ont été basées sur des résultats issus de minimum 4 expériences indépendantes. Seuls les facteurs de transcription dont l'expression des gènes cibles a été augmenté de 1,5 fois en réponse à l'aplatissement du noyau ont été sélectionnés.

**Tableau 4 :** Références des sondes utilisées pour les gènes indiqués.

	Gènes	Référence		Gènes	Référence
1	gapdh	<a href="#">Hs02786624_g1</a>	25	gata6	<a href="#">Hs00232018_m1</a>
2	RPS6	<a href="#">Hs04195024_g1</a>	26	FAM89B	<a href="#">Hs00822402_g1</a>
3	18s	<a href="#">Hs03003631_g1</a>	27	Hbb	<a href="#">Hs00758889_s1</a>
4	SERPINE1	<a href="#">Hs00167155_m1</a>	28	CETP	<a href="#">Hs00163942_m1</a>
5	CCND1	<a href="#">Hs00765553_m1</a>	29	LPL	<a href="#">Hs00173425_m1</a>
6	ITGB2	<a href="#">Hs00164957_m1</a>	30	Coll11A2	<a href="#">Hs00899176_m1</a>
7	EGR1	<a href="#">Hs00152928_m1</a>	31	AHRR	<a href="#">Hs01005075_m1</a>
8	CTGF	<a href="#">Hs00170014_m1</a>	32	SOD2	<a href="#">Hs00167309_m1</a>
9	PTGS2	<a href="#">Hs00153133_m1</a>	33	BAMBI	<a href="#">Hs03044164_m1</a>
10	TGFB1	<a href="#">Hs00998133_m1</a>	34	CXCL12	<a href="#">Hs03676656_mH</a>

11	TGFB2	<a href="#">Hs00234244_m1</a>	35	SPP1	<a href="#">Hs00959010_m1</a>
12	MMP2	<a href="#">Hs01548727_m1</a>	36	RARB	<a href="#">Hs00977140_m1</a>
13	MMP7	<a href="#">Hs01042796_m1</a>	37	Slc4a9	<a href="#">Hs00324675_m1</a>
14	CDKN1A	<a href="#">Hs00355782_m1</a>	38	Col1A1	<a href="#">Hs00164004_m1</a>
15	MYC	<a href="#">Hs00153408_m1</a>	39	Glut1	<a href="#">Hs00892681_m1</a>
16	IL6	<a href="#">Hs00174131_m1</a>	40	Fabp7	<a href="#">Hs00361424_g1</a>
17	CREM	<a href="#">Hs01582003_g1</a>	41	Sod1	<a href="#">Hs00533490_m1</a>
18	CXCR4	<a href="#">Hs00607978_s1</a>	42	PCSK9	<a href="#">Hs00545399_m1</a>
19	Cyclin A1	<a href="#">Hs00171105_m1</a>	43	CXCR4	<a href="#">Hs00607978_s1</a>
20	gls1	<a href="#">Hs01014020_m1</a>	44	sp1	<a href="#">Hs00916521_m1</a>
21	vinculin	<a href="#">Hs00419715_m1</a>	45	c-Jun	<a href="#">Hs01103582_s1</a>
22	SRF	<a href="#">Hs01065256_m1</a>	46	hnf4	<a href="#">Hs00230853_m1</a>
23	sdpr	<a href="#">Hs00190538_m1</a>	47	PPAR	<a href="#">Hs00947536_m1</a>
24	FOS	<a href="#">Hs04194186_s1</a>	48	AHR	<a href="#">Hs00169233_m1</a>

## 12) Cytométrie en flux

Pour caractériser l'activité proliférative, du 5-ethynyl-29-deoxyuridine (EdU) a été rajouté aux cellules juste avant l'application du coussin d'agarose, pendant 2 heures 30. Les cellules ont été marquées, comme décrit dans le kit d'imagerie Click-It EdU Alexa Fluor 647 (Invitrogen). Pour déterminer l'indice de prolifération des cellules, l'analyse par cytométrie en flux (Sony SH800) a été réalisée selon les recommandations du fabricant. Un total d'au minimum 60 000 évènements pour 3 expériences indépendantes a été enregistré pour l'analyse.

## 13) Réseau d'interaction protéine--protéine

Les interactions protéine-protéine basées sur la littérature impliquant AP1, PPAR $\alpha$ , TEAD1 et SP1 ainsi que les protéines en lien avec la mécanotransduction, ont été recueillies à partir de la base de données BIOGRID (<http://thebiogrid.org>, archive 3.4.156 ; Stack et al. 2006) avec une récupération PSIQUIC. Les résultats d'interaction ont été organisés pour représenter seulement les interactions validées dans Homo sapiens avant la génération du réseau dans cytoscape (<http://www.cytoscape.org> ;



Shannon et al., 2003). Pour une meilleure visualisation, les boucles d'auto-interactions ont été retirées.

La liste des protéines en lien avec la mécanotransduction a été construite sur un assemblage des protéines indexées sur le mot-clef « *mechanical* » d'Uniprot, et sur les termes GO « *Detection of mechanical stimulus* » (GO : 0050982), « *Cellular response to mechanical stimulus* » (GO : 0071260), « *Response to mechanical stimulus* » (GO : 0009612) de la base de données QuickGO. A la demande, la carte de ce réseau peut être téléchargée pour un accès public sur CyNetShare (<http://cynetshare.ucsd.edu>).

## 14) Statistique

Tous les résultats sont exprimés en moyennes  $\pm$  écart type à la moyenne et sont accompagnés du nombre de répétitions par groupe ainsi que la taille de l'échantillon (n) utilisée. La significativité des résultats est évaluée par le test statistique correspondant indiqué : seules les probabilités inférieures à 5% ( $p < 0,05$ ) sont considérées comme significatives. Les tests statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel GraphPad Prism.

# Résultats

## ARTICLE n°1

### **Nuclear shape regulates AP1 and TEAD-dependent gene expression**

Julien Aureille, Valentin Buffière-Ribot, Cyril Boyault, Lydia Pernet, Tomas Andersen, Gregory Bacola, Martial Balland, Sandrine Fraboulet, Laurianne Van Landeghem and Christophe Guilluy

Article soumis dans Cell

#### **Résumé**

La forme du noyau peut varier significativement au cours du développement ou lors de processus pathologiques en raison des forces mécaniques émanant du microenvironnement ou générées par le cytosquelette. L'impact de la morphologie nucléaire sur la machinerie transcriptionnelle n'est cependant pas connu. En utilisant plusieurs approches afin de manipuler la morphologie nucléaire, nous avons observé que des changements de forme de l'enveloppe nucléaire régulent l'activité de AP1 et TEAD. Nous avons montré que l'aplatissement du noyau augmente la phosphorylation de c-Jun et la translocation de YAP, conduisant à une augmentation de la transcription des gènes cibles de AP1 et TEAD. Nous avons également observé que l'aplatissement se produit au cours du cycle cellulaire et favorise la prolifération *via* l'activation de TEAD et AP1 qui stimulent la progression de la phase G1 à la phase S.

## Nuclear shape regulates AP1 and TEAD-dependent gene expression

Julien Aureille<sup>1</sup>, Valentin Buffière-Ribot<sup>1</sup>, Cyril Boyault<sup>1</sup>, Lydia Pernet<sup>1</sup>, Tomas Andersen<sup>2</sup>, Gregory Bacola<sup>3</sup>, Martial Balland<sup>2</sup>, Sandrine Fraboulet<sup>1</sup>, Laurianne Van Landeghem<sup>3</sup> and Christophe Guilluy<sup>1#</sup>

<sup>1</sup>*Institute for Advanced Biosciences, Centre de recherche UGA - INSERM U1209 - CNRS UMR 5309, Grenoble, France*

<sup>2</sup>*Laboratoire Interdisciplinaire de Physique, UMR CNRS 5588, Université Grenoble Alpes, Grenoble, France*

<sup>3</sup>*Department of Molecular Biomedical Sciences, North Carolina State University, College of Veterinary Medicine, CVM Main Building, Campus Box #8401, 1060 William Moore Drive, Raleigh, NC 27607, USA.*

#Correspondence to: Christophe Guilluy at [christophe.guilluy@inserm.fr](mailto:christophe.guilluy@inserm.fr)

**The shape of the cell nucleus can vary considerably during developmental and pathological processes<sup>1-3</sup> as a consequence of the mechanical forces emanating from the microenvironment<sup>4</sup> or generated by the cytoskeleton<sup>5,6</sup>. However the impact of nuclear morphology on the transcriptional machinery is not known. Using a combination of tools to manipulate the nuclear morphology, we observed that changes in nuclear shape regulate the activity of AP1 and TEAD. We showed that nuclear flattening increases c-Jun phosphorylation and YAP nuclear translocation, leading to transcriptional induction of AP1 and TEAD-target genes. Surprisingly, we found that nuclear compression is necessary and sufficient to mediate c-Jun and YAP activation in response to cell-generated contractility or cell spreading. We additionally observed that nuclear flattening occurs during the cell cycle and promotes proliferation *via* TEAD and AP1-dependent G1 to S progression.**

Whether it is generated by myosin motors or externally applied, mechanical tension is a potent regulator of gene expression, sufficient to control cell growth<sup>7</sup> or determine cell fate<sup>8-12</sup>. As cells experience tension, the nucleus undergoes significant morphological changes due to its connection with the cytoskeleton which transmits mechanical force to the nuclear envelope<sup>5</sup>. To explore the effect of nuclear shape variation on transcription, we adapted a previously developed method<sup>13,14</sup> to modulate nuclear height independently of myosin activity (figure 1a, supplementary figure 1a). We first treated MRC5 cells with blebbistatin, a myosin II inhibitor which induced an increase in nuclear height due to the disassembly of

perinuclear actin cap filaments (figure 1a, supplementary figure 1a-c). We then applied an agarose pad on top of blebbistatin-treated cells to flatten their nuclei and restore a nuclear morphology similar to those of control cells (figure 1a-b). Using this approach, we did not observe any nuclear herniation (data not shown) or any significant changes in nuclear volume (supplementary figure 1d) and cell survival was unaffected by the mechanical constraint exerted on the nucleus (supplementary figure 1b). Application of myosin-dependent tension on integrin-based adhesion activates mechanotransduction mechanisms, which mediate cytoskeletal rearrangement, adhesion growth<sup>15</sup> and ultimately regulate gene expression<sup>16</sup>. To ensure that manipulating the nuclear morphology did not impact adhesion mechanotransduction mechanisms, we analyzed adhesion size. As expected, blebbistatin treatment decreased adhesion area (figure 1c, supplementary figure 1c) and we did not observe any significant difference in adhesion size when the nuclei of blebbistatin-treated cells were mechanically constrained (figure 1c, supplementary figure 1c). This indicates that adhesion mechanotransduction mechanisms are not activated in response to changes in nuclear shape and thus should not have any impact on transcriptome. We then measured the activity of 345 transcription factors (TFs) by probing their ability to bind to their target DNA sequences (figure 1d, supplementary figure 1f). We found that blebbistatin treatment inhibited 17 TFs (figure 1d), including TEAD and HNF4 as reported by previous studies<sup>17,18</sup>. We reasoned that TFs whose activity was directly impacted by nuclear shape would have distinct activity levels in flat nuclei (Control and Blebb+AP) versus non-flattened nuclei (Blebb). We found 15 TFs that were activated in flat nuclei but not in the nuclei of blebbistatin treated cells (figure 1a, d). In order to identify those responsible for significant transcriptomic consequences in response to nuclear constraint, we selected genes known to be positively regulated by these 15 TFs using the TRRUST database<sup>19</sup> and we analyzed their mRNA expression (figure 1e, supplementary figure 1g). Interestingly, only the genes targeted by AP1, TEAD, PPAR or SP1 showed significant increased expression in response to nuclear flattening (figure 1e). Additional transcriptional regulatory mechanisms, such as epigenetic silencing of the target promoter or coactivator requirement, may explain why we did not detect any change in mRNA expression of the genes regulated by the other TFs. These results reveal that nuclear shape regulates AP1, TEAD, PPAR and SP1 activity. Considering that the nucleus undergoes significant morphological changes in response to mechanical stress<sup>4,5</sup>, we hypothesized that these 4 TFs may interact with proteins related to mechanical stress. To test this hypothesis, we performed a bioinformatics analysis using the Biological General Repository for Interaction Datasets (BIOGRID) database<sup>20</sup>, which annotates protein and genetic interactions. We obtained a minimal network connecting AP1, TEAD, PPAR and SP1 with a group of proteins involved in the cellular response to mechanical stress, such as PRKM3 (figure 1f). This indicates that these TFs interact with the signalling pathways activated by mechanical stress and suggests that changes in nuclear morphology may contribute to regulate these pathways.

AP1 and TEAD have been shown to participate in mechanical signal transduction in pathological and developmental contexts<sup>21,22</sup>. We decided to focus on these two TFs and explore how nuclear shape contributes to regulate their activity. To test the robustness of our results, we manipulated the nuclear height with different approaches and we measured AP1 and TEAD activity using reporter assays. We first cultured cells on matrix with different rigidities, as cells generate more perinuclear actin filaments which flatten their nuclei on stiff surfaces<sup>23</sup> (supplementary figure 1h). As expected, we found that TEAD and AP1 are more active in cells cultured on stiff versus soft matrix (figure 1g-h). We next plated cells on poly-L-Lysine-coated surface to prevent adhesion and perinuclear actin filament formation, as demonstrated by their increased nuclear height (supplementary figure 2b). We then used an atomic force microscope to apply compressive force on the nucleus and maintain a constant height for 120 min (supplementary figure 2a). Consistent with our previous observations, we observed a significant activation of TEAD and AP1 in response to nuclear compression (supplementary figure 2c-d). AP1 is composed of dimers of Fos, Jun, and ATF family members<sup>24</sup>. Interestingly, depletion of c-Jun prevented AP1 activation in blebbistatin-treated cells whose nuclei were mechanically constrained (supplementary figure 3a). Since the transcriptional activity of c-Jun is regulated by phosphorylation at Ser63 and Ser73<sup>24</sup>, we analyzed c-Jun phosphorylation by immunofluorescence. Similarly to AP1, we found that c-Jun nuclear phosphorylation on Ser63/73 was both decreased in blebbistatin-treated cells and increased in response to nuclear flattening (figure 2a-b, supplementary figure 3b-c), indicating that c-Jun phosphorylation mediates AP1 activation in response to nuclear shape. Yes Associated Protein (YAP) is a transcription regulator that coactivates and associates with TEAD upon translocation into the nucleus<sup>17</sup>. To measure YAP activity, we analyzed its nucleocytoplasmic localization. As shown by others<sup>17</sup>, YAP nucleocytoplasmic ratio was decreased in response to myosin II inhibition (figure 2c-d). Remarkably, mechanical nuclear flattening of blebbistatin-treated cells induced an increase in YAP nucleocytoplasmic ratio, which reached similar values to those observed in control cells (figure 2c-d). These results indicate that the nuclear shape regulates c-Jun phosphorylation and YAP nuclear localisation. The perinuclear actin filaments are connected to the nuclear envelope by the Linker of Nucleoskeleton and Cytoskeleton (LINC) complex, which allows force transmission to the nucleus and regulates its shape<sup>5</sup>. In order to disrupt the LINC complex and alter the perinuclear actin cap, we depleted both SUN1 and SUN2 (figure 2e, supplementary figure 3d). As expected, we observed an increase in nuclear height (figure 2i), which was associated with a decrease in c-JUN nuclear phosphorylation on Ser63 and YAP nuclear cytoplasmic ratio (figure 2e). These results show that LINC-dependent nuclear flattening activates c-Jun and YAP, which is consistent with previous reports showing that the LINC complex is necessary for YAP nuclear translocation<sup>25-27</sup>.

Cell shape and ROCK-mediated cytoskeletal tension are known to regulate AP1 and TEAD<sup>17,28,29</sup>, we therefore examined whether nuclear flattening contributes to mediate this effect. To manipulate cell

shape, we plated cells on micropatterned surfaces of 500 or 1500  $\mu\text{m}^2$ . Cells on small surface displayed a significantly higher nucleus and we observed a decreased c-Jun phosphorylation and YAP nuclear-cytoplasmic ratio in these cells compared to cells on 1500  $\mu\text{m}^2$  surfaces (figure 2f-g, i). Strikingly, nuclear flattening of cells plated on 500  $\mu\text{m}^2$  induced by the agarose pad led to a significant increase in YAP and c-Jun activity, which reached levels similar those observed in cells on 1500  $\mu\text{m}^2$  (figure 2f-g). This indicates that nuclear compression is necessary and sufficient to mediate YAP and c-JUN activation in response to cell spreading. ROCK-mediated myosin II activation participates to perinuclear actin cap formation<sup>5,26</sup>. In line with this, ROCK inhibition (Y-27632) induced an increase in nuclear height (figure 2i) and a decrease in both c-Jun phosphorylation and YAP nucleo-cytoplasmic localisation (figure 2h). This effect was reversed by mechanical compression of the nuclei (figure 2h-i), demonstrating that nuclear flattening contributes to ROCK-mediated AP1 and TEAD activation. This suggests that ROCK-induced nuclear compression may regulate transcription downstream RhoA and it would be interesting to test whether specific Rho activators regulate nuclear morphology.

We next wanted to explore the molecular mechanisms mediating YAP and c-Jun activation in response to changes in nuclear shape. Previous studies have shown that mechanical tension activates YAP through mechanisms either dependent or not of the Hippo signalling pathway<sup>17,30–32,32</sup>. More recently, it was reported that force applied on the nucleus increases YAP nuclear translocation by regulating nuclear pore transport, independently of YAP phosphorylation<sup>27</sup>. Pharmacological inhibition of importin- $\beta$ -mediated nuclear import decreased drastically YAP translocation (figure 3a-b), however we were still able to detect a significant increase in YAP nuclear-cytoplasmic localisation in response to nuclear flattening (figure 3b). In parallel we analyzed the phosphorylation of Hippo signalling actors, such as YAP, its upstream kinase Large Tumor Suppressor (LATS), mammalian Ste20-like kinases (MST), Kibra and PTPN14. Whereas we found that YAP and LATS phosphorylation were increased in blebbistatin-treated cells and decreased in response to nuclear flattening (figure 3c-e), we observed no difference in MST phosphorylation (figure 3c). To test the involvement of LATS, we expressed wild type or phosphomimetic mutant (T1079E) of LATS (supplementary figure 4a). As expected, expression of WT or T1079E LATS mutant decreased YAP nucleo-cytoplasmic ratio in control cells (figure 3f; supplementary figure 4b), however it did not affect YAP nucleo-cytoplasmic localisation when the nuclei of blebbistatin-treated cells were mechanically constrained (figure 3f; supplementary figure 4b). This suggests that another kinase or phosphatase specific for YAP may regulate its activity in response to nuclear compression. Another possibility is that nuclear flattening may trigger 2 mechanisms, one involving YAP phosphorylation and another independent of YAP phosphorylation status which could override YAP phosphoregulation and allows its translocation in response to nuclear flattening. Such mechanism has been suggested by others<sup>30</sup> and may involve regulation of nuclear pore complex by mechanical stress as described recently<sup>27</sup>. We next addressed the molecular

mechanism of c-Jun activation by nuclear flattening. c-Jun is phosphorylated by Jun N-terminal kinase (JNK) and p38 mitogen-activated protein kinase family members, however pharmacological inhibition of JNK or p38 did not affect c-Jun phosphorylation on Ser63 in response to nuclear flattening (figure 3g). Interestingly, studies have showed that, in response to serum, lamin A/C interact with AP1<sup>33,34</sup> and release it to allow its rapid activation<sup>33</sup>. Since lamin A/C conformation is known to be regulated by mechanical stress applied on the nuclear envelope<sup>6,35</sup>, we decided to test lamin A/C involvement. Interestingly, we found that depletion of lamin A/C completely prevented c-Jun phosphorylation in response to nuclear flattening (figure 3h-i, supplementary figure 4c), indicating that lamin A/C is necessary for nuclear compression-induced c-Jun phosphorylation. As previously described<sup>33</sup>, the lamina may serve as a scaffold that promotes AP1 interaction with its upstream kinase and/or phosphatase. Interestingly, many serine/threonine kinase have been found within the nuclear envelope<sup>36</sup> and may participate to c-Jun activation independently of JNK.

A recent report has shown that AP1 and TEAD can act synergistically on promoter regions and activate a set of target genes that controls cell cycle progression<sup>37</sup>. This suggests that nuclear flattening may trigger a transcriptional program that promotes cell cycle progression *via* the dual activation of TEAD and AP1. To test this idea, we analyzed the expression of AP1 and TEAD target genes involved in proliferation (figure 4a). We observed that the expression of these target genes mirrored TEAD and AP1 transcriptional activity (figure 1e) and was decreased in response to myosin inhibition and increased in blebbistatin-treated cells subjected to nuclear compression (figure 4a). Since the expression of genes involved in cell cycle progression is induced by nuclear compression, we hypothesized that cells may decrease their nuclear height during G1 phase to promote AP1 and TEAD-dependent gene expression. In order to test this hypothesis, we used HeLa cells expressing the fluorescence ubiquitination-based cell cycle indicator (FUCCI) to follow cell cycle progression. Consistent with our hypothesis, we found that cells transitioning from G1 to S phase displayed a lower nucleus compared to cells in G2 phase (figure 4b-c). This change in nuclear height may result from the increasing contractility developed by cells during G1 phase, as recently reported<sup>38</sup>. We next wanted to determine if nuclear compression can affect the progression of the cell cycle. We observed that myosin II inhibition induced a significant decrease in cells progressing into S phase and nuclear flattening of these cells was sufficient to prevent this effect (Figure 4d-e), indicating that nuclear compression promotes G1 to S progression. We obtained similar results when we quantified incorporation of the modified thymidine analogue EdU to analyze S-phase completion by flow cytometry (figure 4f-g). Interestingly, we found that nuclear flattening had no effect on S-phase completion in cells depleted in YAP and c-Jun, confirming that c-Jun and YAP are required for nuclear compression-induced cell cycle progression (figure 4g, supplementary figure 4d). During solid tumor development, the shape of the cell nucleus displays significant alterations, whose extent is used by cytopathologists to diagnose, stage and



prognose cancer<sup>3</sup>. Whereas altered nuclear morphology is a predictor of cancer aggressiveness and clinical outcome, it is still unclear how these changes in nuclear shape can affect cell behaviour and gene expression. Our demonstration that nuclear shape-dependent regulation of cell cycle *via* AP1 and TEAD may contribute to cancer growth and it will be interesting in the future to determine if AP1 and TEAD activity correlates with nuclear shape and cancer aggressiveness.

The shape of membrane bound organelle, such as mitochondria, can influence a variety of cellular processes<sup>39</sup>. Here we report that nuclear flattening is sufficient to control cell growth *via* AP1 and TEAD. Nuclear flattening can occur in response to mechanical tension<sup>4,5</sup> and contributes to transduce mechanical stress into signalling pathways that control the transcriptional machinery. The molecular mechanisms that determine nuclear shape in proliferative tissue may influence cell growth through AP1 and TEAD regulation and it is tempting to speculate that additional epigenetics mechanisms<sup>10,42</sup> may be regulated in response to nuclear flattening and occur during development and cancer.

#### **ACKNOWLEDGEMENTS:**

The authors thank the cell imaging facility MicroCell and its outstanding staff, including Alexei Grichine, Mylène Pezet and Jacques Mazzega for their technical assistance. We thank Keith Burrige for his continuous support. C.G. is supported by grants from the Agence National de la Recherche (ANR-13-JSV1-0008) and from European Research Council (ERC) under European Union's Horizon 2020 research and innovation programme (ERC Starting Grant n\_639300). The authors thank the Center for Gastrointestinal Biology and Disease (CGIBD) Advanced Analytics (AA) Core (NIH P30 DK34987) at the University of North Carolina (Chapel Hill, NC). L.V.L. is supported by grants from NCSU CVM (Seed Funding), UNC CGIBD (Pilot/Feasibility grant NIH P30 DK034987) and from the University of North Carolina Lineberger Comprehensive Cancer Center (Developmental grant).

#### **AUTHOR INFORMATION:**

Christophe Guilluy (christophe.guilluy@inserm.fr).

## Figure 1 – Nuclear shape regulates transcription factor activity

Schematic representation of the method used to induce changes in nuclear shape independently of the actomyosin cytoskeleton. See supplementary figure1 for more details. Briefly, cells are treated with DMSO (Control-Ctrl), blebbistatin only (Blebb) and blebbistatin whereas an agarose pad (AP) is used to flatten their nuclei and restore a nuclear morphology similar to those of control cells (Blebb + AP). XZ view of representative nuclei (Lamin-A/C) are shown in these three conditions (scale bar  $x = 5 \mu\text{m}$   $z = 5 \mu\text{m}$ ). **(b)** Nucleus height and shape factor were measured by immunofluorescence using Lamin-A/C staining ( $n = 20$  for nucleus height,  $n = 107$  minimum for shape factor; \*\*\*\* $p < 0.001$  one-way ANOVA – Tukey's multiple comparisons post-test). **(c)** Quantifications of adhesion areas using paxillin staining ( $n = 28$  from 3 independent experiments, \*\*\*\* $p < 0.001$  one-way ANOVA – Tukey's multiple comparisons post-test). **(d)** Analysis of transcription factor activity (Affymetrix combo protein-DNA array) for Ctrl, Blebb and Blebb + AP conditions. Each square corresponds to a specific transcription factor (TF) activity and is color coded to show the relative activity. ① To identify TFs regulated by nuclear shape, we selected TFs that were more active in Ctrl and Blebb + AP compared to blebbistatin-treated cells (Blebb). **(e)** TF's target genes and GAPDH mRNA levels were analyzed by real-time qPCR. Results are expressed as relative mRNA expression levels ( $n = 4$  minimum, t-test \* $p < 0.5$  \*\* $p < 0.05$  \*\*\* $p < 0.01$  \*\*\*\* $p < 0.001$ ). **(f)** Protein-Protein Interaction Network reconstruction and analysis of the AP1, TEAD, SP1 and PPAR. **(g)** TEAD activity was analyzed in HeLa cells co-transfected with a renilla plasmid as a Luciferase reporter plasmid controlled by the TEAD-responsive promoter, and with a renilla plasmid as a gene reporter; HeLa cells were cultured on 1 and 50 kPa ( $n = 3$ , t-test \* $p < 0.5$ ) or treated with blebbistatin and blebbistatin + AP ( $n = 6$ ; t-test \*\* $p < 0.05$ ) **(h)** AP1 activity was assessed in the indicated conditions using AP1 reporter assay. ( $n = 5$ , t-test \*\*\*\* $p < 0.001$ ).

## Figure 2 – YAP and c-Jun are activated in response to nuclear flattening

**(a)** Representative cells stained for p-Jun Ser63 (magenta) and for DNA (cyan) in Ctrl, Blebb and Blebb + AP conditions. Scale bar = 10  $\mu\text{m}$ . Nuclear heights were measured using Hoechst staining. **(b)** Corresponding quantifications of p-Jun Ser63 nuclear intensity ( $n = 59$  minimum from 2 independent experiments, \*\*\*\* $p < 0.001$  one-way ANOVA – Tukey's multiple comparisons post-test). **(c)** Representative cells stained for YAP (magenta) and for DNA (cyan) in Ctrl, Blebb and Blebb + AP conditions. Scale bar = 10  $\mu\text{m}$ . Nuclear heights were measured using Hoechst staining. **(d)** Corresponding quantifications of YAP activity (ratio nucleus/cytosol;  $n = 82$  minimum from 4 independent experiments, \*\*\*\* $p < 0.001$  one-way ANOVA – Tukey's multiple comparisons post-test). **(e)** Quantifications of YAP activity (nucleo-cytoplasmic ratio) and p-Jun Ser63 nuclear intensity in cells depleted or not for SUN1 and SUN2 ( $n = 20$  minimum, t-test \* $p < 0.5$ ) **(f)** Representative cells cultured on circular micropatterns with surfaces of 1500 and 500  $\mu\text{m}^2$  and stained for p-Jun Ser63 (magenta), YAP (cyan) and for DNA (green). Additionally, cells were cultured on the micropatterns of 500  $\mu\text{m}^2$  and an agarose pad was used to flatten their nuclei. Scale bar = 10  $\mu\text{m}$ . Nuclear heights were measured using Hoechst staining. **(g)** Corresponding quantifications of YAP activity (nucleo-cytoplasmic ratio) and p-Jun Ser63 nuclear intensity. ( $n =$

15 minimum \*\*\*\*p<0.001 one-way ANOVA – Tukey’s multiple comparisons post-test). **(h)** Quantifications of YAP activity (nucleo-cytoplasmic ratio) and p-Jun Ser63 nuclear intensity in Ctrl, Blebb, Blebb + AP condition and in Ctrl, Y27632 and Y27632 + AP (n = 19 minimum, \*\*\*\*p<0.001 Tukey’s multiple comparisons test). **(i)** Nucleus heights were measured using Hoechst staining in the indicated conditions. (n = 18 minimum, \*\*\*\*p<0.001 one-way ANOVA – Tukey’s multiple comparisons post-test).

### Figure 3 – TEAD and AP1 activation are distinctively controlled by nuclear shape

**(a)** Representative cells stained for YAP (magenta) and for DNA (cyan) in Ctrl, Blebb and Blebb + AP conditions, treated or not with importazol. Scale bar = 10  $\mu$ m. **(b)** Corresponding quantifications of YAP activity (nucleo-cytoplasmic ratio; n = 59 minimum from 3 independent experiments, \*\*p<0.05 \*\*\*\*p<0.001 one-way ANOVA – Tukey’s multiple comparisons post-test). **(c)** Immunoblots of p-YAP (ser127), YAP, p-LATS (Thr1079), LATS, p-MST (Thr1083), MST, Kibra, PTPN14 and GAPDH for Ctrl, Blebb and Blebb + AP conditions. **(d)** Corresponding quantification of p-YAP (Ser125) relative to Ctrl and normalized to GAPDH (n = 8, \*p<0.5 \*\*\*\*p<0.01 one-way ANOVA – Tukey’s multiple comparisons post-test). **(e)** Corresponding quantification of p-LATS (thr1079) relative to Ctrl and normalized to GAPDH (n = 6, \*p<0.5 \*\*\*\*p<0.01 one-way ANOVA – Tukey’s multiple comparisons post-test). **(f)** Quantifications of YAP activity (nucleo-cytoplasmic ratio) in Ctrl, Blebb and Blebb + AP conditions for cells transfected with GFP, LATS1-GFP or LATS1<sup>T1079E</sup>-GFP; n = 18 minimum \*\*\*\*p<0.001 one-way ANOVA – Tukey’s multiple comparisons post-test). **(g)** Quantifications of p-Jun Ser63 nuclear intensity in Ctrl, Blebb, and Blebb + AP conditions for cells treated with DMSO, SB203580, a MAP Kinase inhibitor and SP600125, a JNK inhibitor. (n = 18 minimum, \*\*\*\*p<0.001 one-way ANOVA – Tukey’s multiple comparisons post-test.). **(h)** Representative cells stained for p-Jun Ser63 (magenta) and for DNA (cyan) in Ctrl, Blebb and Blebb + AP conditions for cells depleted or not for lamin-A/C. Scale bar = 10  $\mu$ m. **(i)** Corresponding quantification of p-Jun Ser63 nuclear intensity (n=49 minimum, \*\*p<0.05 \*\*\*p<0.01 \*\*\*\*p<0.001 one-way ANOVA – Tukey’s multiple comparisons post-test).

### Figure 4 - Nuclear flattening promotes cell proliferation *via* TEAD and AP1-dependent G1 to G2 progression

**(a)** Heatmap of mRNA expression profiles of genes regulated by TEAD and AP1. **(b)** Representative images of HeLa-Fucci in G1 to S/G2/M (yellow) and in S/G2/M (green) phases (scale bar = 10  $\mu$ m) with the XZ using Hoechst staining (scale bar = 5  $\mu$ m). **(c)** Corresponding quantifications of nuclear heights. (n = 15 minimum, \*\*\*\*p<0.01 t-test). **(d)** Representative HeLa-Fucci cells in S/G2/M (green) and G1 phase (red) in Ctrl, Blebb and Blebb + AP conditions. Scale bar = 31  $\mu$ m. **(e)** Corresponding percentage of HeLa-Fucci in mitosis (n = 24 fields minimum from 4 independent experiments, \*\*\*p<0.01 one-way ANOVA – Tukey’s multiple comparisons post-

test). **(f)** Representative flow cytometry histograms for EdU positive cells in Ctrl, Blebb and Blebb + AP conditions. **(g)** Corresponding percentage of EdU positive cells (n = 4 independent experiments with at least 1500 events for each condition per experiment. \*\*\*\*p<0.001 one-way ANOVA – Tukey’s multiple comparisons post-test).

## METHODS

**Cell lines, reagents and antibodies.** MRC-5 (ATCC<sup>®</sup> CCL-171<sup>™</sup>), HeLa (ATCC<sup>®</sup> CCL-2<sup>™</sup>), CCD-18Co cells were bought from ATCC and grown in Dulbecco’s modified Eagle’s medium (DMEM; Gibco) supplemented with 10% fetal bovine serum (Sigma) and antibiotic–antimycotic solution (Sigma). HeLa-FUCCI cells were a gift from Y. USSON (TIMC-IMAG Lab, Grenoble, France). Hydrogels with different stiffnesses coated with collagen were purchased from Matrigen. Cells were lysed directly in Laemmli buffer for western blot (Tris- HCl pH 6.8 0.12 M, Glycerol 10%, Sodium Dodecyl Sulfate 5%,  $\beta$ -mercaptoethanol 2.5%, bromophenol blue 0.005%). Cells were treated with different drugs: Blebbistatin (Tocris) at 100  $\mu$ M, Importazol (Sigma) at 40  $\mu$ M, Okadaic Acid (Santa Cruz) at 100 nM, SB203580 (Cell Signaling) at 25  $\mu$ M, Y27632 (Tocris) at 50  $\mu$ M, SP600125 (Sigma) at 50  $\mu$ M, BAPTA/AM (Sigma) at 50  $\mu$ M. Cell viability was assed based on membrane integrity and esterase activity using staining with calcein/AM and ethidium homodimer (LIVE/DEAD<sup>™</sup> Viability Kit - ThermoFisher L3224).

**Agarose pad and nuclear compression.** To compress the nuclei, we adapted a method previously described by Dumont and Mitchison (Dumont and Mitchison, 2009) as follows: a solution of 2% ultrapure agarose (FMC bio products) in serum-free DMEM medium was prepared and brought to boil, and 5 ml was poured in a 60 mm Petri dish to solidify. A circular pad area (33 mm diameter) was cut out and placed in PBS buffer. Then, the agarose pad (AP) was deposited gently on cells and a 32 mm glass coverslip surmounted of a 125 mg washer was carefully placed above to maintain the cushion for compression.

**Plasmid.** pEGFP C3-Lats1 was a gift from Marius Sudol (Addgene plasmid #19053). The point mutations T1079D, and T1079E were introduced into wild type pEGFP C3-Lats1 using Q5 site directed mutagenesis kit (NEB). All constructs were verified by DNA sequencing. Phosphomimetic function of Lats1 was analyzed by western blot analysis of p-YAP. Plasmids were transfected using Lipofectamine<sup>®</sup> 2000 (Invitrogen) according to the manufacturer’s instructions. pRL-SV40P was a gift from Ron Prywes (Addgene plasmid # 27163) and 8xGTIIC-luciferase was a gift from Stefano Piccolo (Addgene plasmid # 34615). For YAP activity measurement, HeLa cells were co-transfected with 8xGTIIC-luciferase and pRL-SV40P and YAP activity was assessed using Dual-luciferase reporter assay (Promega Ref E910) with Renilla luciferase as internal control. Activities were displayed as arbitrary units. GFP reporter for AP1

(Signal AP1 Reporter Assay Kit GFP) was purchased from QIAGEN (CCS-011G). pLL3.7 K122 -ires-GFP-TEAD-responsive-H2B mCherry reporter was a gift from Yutaka Hata (Addgene plasmid # 68714).

**Transcription factor activity array.** The Affymetrix protein DNA combo array kit was used according to the manufacturer's instructions. Briefly, this assay is designed to simultaneously analyze the binding activities of 345 transcription factors to their corresponding consensus DNA sequences. Each spot corresponds to a specific consensus DNA sequences. The nuclear extract samples from MRC-5 cells treated with DMSO, Blebb and Blebb + AP were mixed with pre-labeled transcription factor probes. Each nuclear fraction was previously checked for their purity by western-blot. Probe mix (10  $\mu$ l) was combined with 15  $\mu$ g of nuclear extract for each condition. The array membrane was exposed using Chemidoc apparatus (Biorad). The intensity of each spot (supplementary figure 1f), representing the binding activity of transcription factors to consensus DNA sequences, was measured with ImageJ software and presented as an arbitrary value. Overexposed signals were discarded and minimum fold change threshold was applied (Ctrl versus Blebb and Blebb+AP versus Blebb). Selected TFs (shown in figure 1d and supplementary figure 1e) are those whose activity level in compressed nuclei (Blebb+AP) was similar to control cells (between 0.5 to 1.5 fold). AP1 activity in figure 1 and supplementary 3a was analyzed using the AP1 reporter kit from BPS Bioscience.

**Microscopy.** Cells were fixed with 3,7% PFA (Sigma) for 20 min, permeabilized with 0.1% Triton in PBS (Pigma), then washed with PBS and blocked with a blocking solution (2,5% bovine serum albumin in PBS Tween 0.2%) for 1h. Samples were incubated overnight at 4°C with primary antibody in blocking solution, followed by three washes with PBS tween 0.2%. The cells were then incubated with secondary antibody at room temperature for 1h followed by three washes with PBS Tween 0.2%. After 2 washes with PBS, samples were finally mounted using mounting medium with DAPI (Prolong - Invitrogen). Samples were observed using a Spinning Disk Andromeda RILL-FEI (EMCCD iXon 897 camera with alpha-Plan Apo 63X/1,46 oil objective). Fields were randomly imaged and areas of interest were analyzed after Z stack projection (Z project-maximum intensity). For p-Jun (Ser63 and Ser73) fluorescent intensity analysis, corrected total nuclear fluorescence (CTNF) was calculated following this formula:  $CTNF = \text{Integrated Density} - (\text{Area of nucleus} \times \text{mean florescence of background readings})$ . Adhesions, cells viability, and Fucci cell cycle were imaging using epifluorescence microscopy with a Plan-Apochromat 40x/1.4 Oil objective (for adhesions), Plan-Neofluar 20x/0.5 (for Hela-Fucci) and with a Plan-Neofluar 10x/0.3 (for cell viability). Adhesion size and number were analyzed using the Focal Adhesion Analysis Server (<http://faas.bme.unc.edu>). All pictures were analyzed using FIJI®.

**Micropattern.** Fibronectin patterned glass coverslips were micro fabricated using the first steps of the glass technique described by Vignaud *et al.* (2014). Briefly, glass coverslips (VWR) were plasma treated for 30 sec and incubated for 30 min at room temperature (RT) with 0.1 mg/ml poly-L-lysine-grafted-polyethylene glycol (pLL-PEG, SuSoS) diluted in HEPES (10mM, pH 7.4, Sigma). After washing in deionized phosphate-buffered saline (dPBS, Life technologies), the pLL-PEG covered coverslip was placed with the polymer brush facing downwards onto the chrome side of a quartz photomask (Toppan) for photolithography treatment (5 min UV-light exposure, UVO Cleaner Jelight). Subsequently, the coverslip was removed from the mask and coated with 20  $\mu$ l/ml fibronectin (Sigma) diluted in dPBS for 30 min at RT.

**shRNA.** Lentiviral shRNA targeting human SUN1, SUN2, lamin A/C and lentiviral non-targeting control vector were purchased from Open Biosystems.

Lamin A/C (Oligo ID TRCN0000061837) hairpin sequence: 5'-

CCGGGCCGTGCTTCTCTCACTCATCTCGAGATGAGTGAGAGGAAGCACGGCTTTTTTG-3';

SUN1 (Oligo ID TRCN0000133901) hairpin sequence: 5'-

CCGGCAGATACACTGCATCATCTTTCTCGAGAAAGATGATGCAGTGTATCTGTTTTTTTG-3';

SUN2 (Oligo ID TRCN0000143335) hairpin sequence: 5'-

CCGGGCCTATTTCAGACGTTTCACTTCTCGAGAAGTGAAACGTCTGAATAGGCTTTTTTTTG-3';

**siRNA.** Cells were transfected using Lipofectamine® RNAiMAX (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions with the corresponding siRNA: Silencer™ Negative Control No. 1 siRNA (Ambion™ AM4611); siRNA targeting: Jun (human) were from Life technologies (Silencer® Select s7660); YAP (human) were from Life technologies (Silencer® Select s534572).

**Atomic Force Microscopy.** An AFM (CellHesion module; JPK Instruments) mounted on an optical microscope (Olympus) was used to perform single cell height measurement (supplementary figure 1h) and nuclear compression (supplementary figure 2). Experiments were conducted at 37°C using the PetriDishHeater system and DMEM medium buffered with 20 mM Hepes and complemented with 1% FBS. Tipless cantilevers (arrow-TL1-50) with a nominal force constant of 0.03 N m<sup>-1</sup> were used and calibrated using the thermal noise method. To measure cell height, MRC-5 were cultured on soft (1 kPa) and stiff (50 kPa) collagen-coated substrate for 24h. Following an approach on the adjacent surface, the cantilever was positioned over the cell to measure the height delta. For nuclear compression (supplementary figure 2), cell were plated on 35 mm dish from ibidi (gridded surface). After positioning the cantilever above the nucleus, constant height mode was used (target height of 3  $\mu$ m below the surface) and maintained for 120 min.

**Real-time PCR with reverse transcription.** Total RNA was purified from cells using the RNAqueous-Micro kit (Ambion-Life technologies) according to the manufacturer's instructions. RNAs were reverse-transcribed into cDNA using the High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems). High-throughput real-time qPCR was performed by the Center for Gastrointestinal Biology and Disease Advanced Analytics (AA) Core at UNC (Chapel Hill NC 27599). The 48 TaqMan primer references are listed in supplementary table 1. Expression data were normalized to a standard curve generated from a pool of control cells. GAPDH was used as the reference gene. Data are based on results from minimum four independent experiments. Only genes with increase in mRNA expression superior to 1.5 fold change in response to nuclear flattening were selected.

**Flow Cytometry.** To assess the proliferative activity, 5-ethynyl-29-deoxyuridine (EdU) was added to cells just before applying the agarose cushion for 2.5h. Cells were stained, as described in the Click-iT EdU Alexa Fluor 647 Imaging Kit. To determine the proliferative indices of cells, FACS analysis (Sony SH800) was performed according to the manufacturer's instructions. A total of at least 1500 events for 3 independent experiments were recorded for the analysis.

**Protein-Protein Interaction Network reconstruction and analysis.** Literature based protein-protein interaction involving AP1, PPARA, TEAD1, SP1, as well as mechano-related proteins was gathered from BIOGRID database (<http://thebiogrid.org/>, release archive 3.4.156; Starck et al., 2006) with PSIQUIC retrieval. The resulting interaction table (supplementary table 2) was curated to represent only the interactions validated in *Homo sapiens*, and the network was generated in cytoscape (<http://www.cytoscape.org/>; Shannon et al., 2003). For visualisation purpose, the self-loops and multiple edges were removed. A solution of a minimal network that includes the transcription factors was determined by iteration of shortest path analysis and network parameter analysis based pruning. The custom list of mechano-related proteins (supplementary table 3) was built over an assembly of keyword indexed proteins in Uniprot (goa:"mechanical") and GO terms in QuickGO databases (GO:0050982, "Detection of mechanical stimulus"; GO:0071260, "Cellular response to mechanical stimulus"; GO:0009612, "Response to mechanical stimulus"). Upon request, generated network maps can be uploaded for public access on CyNetShare ([cynetshare.ucsd.edu](http://cynetshare.ucsd.edu)).

**Statistics.** Statistical analysis were performed using GraphPad Software. Data are presented as mean  $\pm$  s.e.m. Unpaired T-test has been used unless stated otherwise. No exclusion criteria were used. The numbers of independent experiments performed for all of the quantitative data are indicated in the figure legends.

1. Kirby, T. J. & Lammerding, J. Emerging views of the nucleus as a cellular mechanosensor. *Nat. Cell Biol.* **1** (2018). doi:10.1038/s41556-018-0038-y
2. Chow, K.-H., Factor, R. E. & Ullman, K. S. The nuclear envelope environment and its cancer connections. *Nat. Rev. Cancer* **12**, 196–209 (2012).
3. Zink, D., Fischer, A. H. & Nickerson, J. A. Nuclear structure in cancer cells. *Nat. Rev. Cancer* **4**, 677–687 (2004).
4. Kim, J.-K. *et al.* Nuclear lamin A/C harnesses the perinuclear apical actin cables to protect nuclear morphology. *Nat. Commun.* **8**, 2123 (2017).
5. Khatau, S. B. *et al.* A perinuclear actin cap regulates nuclear shape. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 19017–19022 (2009).
6. Ihalainen, T. O. *et al.* Differential basal-to-apical accessibility of lamin A/C epitopes in the nuclear lamina regulated by changes in cytoskeletal tension. *Nat. Mater.* (2015). doi:10.1038/nmat4389
7. Huang, S. & Ingber, D. E. The structural and mechanical complexity of cell-growth control. *Nat. Cell Biol.* **1**, E131–E138 (1999).
8. Vining, K. H. & Mooney, D. J. Mechanical forces direct stem cell behaviour in development and regeneration. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **18**, 728–742 (2017).
9. Chan, C. J., Heisenberg, C.-P. & Hiiragi, T. Coordination of Morphogenesis and Cell-Fate Specification in Development. *Curr. Biol.* **27**, R1024–R1035 (2017).
10. Le, H. Q. *et al.* Mechanical regulation of transcription controls Polycomb-mediated gene silencing during lineage commitment. *Nat. Cell Biol.* (2016). doi:10.1038/ncb3387
11. Engler, A. J., Sen, S., Sweeney, H. L. & Discher, D. E. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell* **126**, 677–689 (2006).
12. McBeath, R., Pirone, D. M., Nelson, C. M., Bhadriraju, K. & Chen, C. S. Cell Shape, Cytoskeletal Tension, and RhoA Regulate Stem Cell Lineage Commitment. *Dev. Cell* **6**, 483–495 (2004).



13. Enyedi, B., Jelcic, M. & Niethammer, P. The Cell Nucleus Serves as a Mechanotransducer of Tissue Damage-Induced Inflammation. *Cell* **165**, 1160–1170 (2016).
14. Dumont, S. & Mitchison, T. J. Compression regulates mitotic spindle length by a mechanochemical switch at the poles. *Curr. Biol. CB* **19**, 1086–1095 (2009).
15. Burridge, K. & Wittchen, E. S. The tension mounts: stress fibers as force-generating mechanotransducers. *J. Cell Biol.* **200**, 9–19 (2013).
16. Hoffman, B. D., Grashoff, C. & Schwartz, M. A. Dynamic molecular processes mediate cellular mechanotransduction. *Nature* **475**, 316–323 (2011).
17. Dupont, S. *et al.* Role of YAP/TAZ in mechanotransduction. *Nature* **474**, 179–183 (2011).
18. Desai, S. S. *et al.* Physiological ranges of matrix rigidity modulate primary mouse hepatocyte function in part through hepatocyte nuclear factor 4 alpha. *Hepatol. Baltim. Md* **64**, 261–275 (2016).
19. Han, H. *et al.* TRRUST v2: an expanded reference database of human and mouse transcriptional regulatory interactions. *Nucleic Acids Res.* **46**, D380–D386 (2018).
20. Stark, C. *et al.* BioGRID: a general repository for interaction datasets. *Nucleic Acids Res.* **34**, D535–539 (2006).
21. Ip, Y. T. & Davis, R. J. Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase (JNK) — from inflammation to development. *Curr. Opin. Cell Biol.* **10**, 205–219 (1998).
22. Pan, D. The hippo signaling pathway in development and cancer. *Dev. Cell* **19**, 491–505 (2010).
23. Kim, D.-H. *et al.* Actin cap associated focal adhesions and their distinct role in cellular mechanosensing. *Sci. Rep.* **2**, 555 (2012).
24. Davis, R. J. Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell* **103**, 239–252 (2000).
25. Shiu, J.-Y., Aires, L., Lin, Z. & Vogel, V. Nanopillar force measurements reveal actin-cap-mediated YAP mechanotransduction. *Nat. Cell Biol.* **20**, 262–271 (2018).

26. Driscoll, T. P., Cosgrove, B. D., Heo, S.-J., Shurden, Z. E. & Mauck, R. L. Cytoskeletal to Nuclear Strain Transfer Regulates YAP Signaling in Mesenchymal Stem Cells. *Biophys. J.* **108**, 2783–2793 (2015).
27. Elosegui-Artola, A. *et al.* Force Triggers YAP Nuclear Entry by Regulating Transport across Nuclear Pores. *Cell* **171**, 1397–1410.e14 (2017).
28. Zhu, X. & Assoian, R. K. Integrin-dependent activation of MAP kinase: a link to shape-dependent cell proliferation. *Mol. Biol. Cell* **6**, 273–282 (1995).
29. Marinissen, M. J. *et al.* The small GTP-binding protein RhoA regulates c-jun by a ROCK-JNK signaling axis. *Mol. Cell* **14**, 29–41 (2004).
30. Arupratan Das<sup>1,2</sup>, Robert S. Fischer<sup>1</sup>, Duoqia Pan<sup>2</sup> and Clare M. Waterman<sup>1</sup>. YAP nuclear localization in the absence of cell-cell contact is mediated by a filamentous actin- dependent, myosin II- and phospho-YAP independent pathway during ECM mechanosensing. *J. Biol. Chem.* (2016).
31. Codelia, V. A., Sun, G. & Irvine, K. D. Regulation of YAP by mechanical strain through Jnk and Hippo signaling. *Curr. Biol. CB* **24**, 2012–2017 (2014).
32. Sansores-Garcia, L. *et al.* Modulating F-actin organization induces organ growth by affecting the Hippo pathway. *EMBO J.* **30**, 2325–2335 (2011).
33. González, J. M., 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.* **183**, 653–666 (2008).
34. Ivorra, C. *et al.* A mechanism of AP-1 suppression through interaction of c-Fos with lamin A/C. *Genes Dev.* **20**, 307–320 (2006).
35. Swift, J. *et al.* Nuclear lamin-A scales with tissue stiffness and enhances matrix-directed differentiation. *Science* **341**, 1240104 (2013).

36. Schirmer, E. C., Florens, L., Guan, T., Yates, J. R. & Gerace, L. Nuclear membrane proteins with potential disease links found by subtractive proteomics. *Science* **301**, 1380–1382 (2003).
37. Zanconato, F. *et al.* Genome-wide association between YAP/TAZ/TEAD and AP-1 at enhancers drives oncogenic growth. *Nat. Cell Biol.* **17**, 1218–1227 (2015).
38. Vianay, B. *et al.* Variation in traction forces during cell cycle progression. *Biol. Cell* (2018).  
doi:10.1111/boc.201800006
39. Campello, S. & Scorrano, L. Mitochondrial shape changes: orchestrating cell pathophysiology. *EMBO Rep.* **11**, 678–684 (2010).
40. 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).
41. Isermann, P. & Lammerding, J. Nuclear Mechanics and Mechanotransduction in Health and Disease. *Curr. Biol. CB* **23**, (2013).
42. Uhler, C. & Shivashankar, G. V. Regulation of genome organization and gene expression by nuclear mechanotransduction. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **18**, 717–727 (2017).

### Supplementary figure 1

MRC5 Cells were cultured on a 13 mm fibronectin-coated glass coverslip (for IF) or a 35 mm fibronectin-coated dish (for biochemistry) during 24h. The medium is replaced with a fresh medium containing Blebbistatin (100  $\mu$ M) for 4 hours. Then, an agarose pad (AP) is gently applied on cells. A 32 mm coverslip with a 425 mg washer is used to maintain the agarose pad. 2.5 hours later cells are fixed using 3.7% PFA (IF) or directly lysed with a Laemmli lysis buffer. **(b)** Representative images of MRC5 cells assessed for cell viability using calcein/AM (green) and Ethidium homodimer (Red) in Ctrl, Blebb, and Blebb + AP conditions. Ethanol was used to induce cell apoptosis (negative Ctrl). **(c)** Representative cells stained for actin-F (cyan) and focal adhesions (paxillin - magenta) in Ctrl, Blebb and Blebb + AP conditions. Scale bar = 10  $\mu$ m. **(d)** DNA staining was used to quantify nuclear volume in the indicated conditions (n = 37 minimum from 2 independent experiments, ns: not significant, one-way ANOVA). **(e)** Membrane spot localization of the 15 TFs regulated by nuclear shape. **(f)** Raw membranes of Affymetrix protein DNA combo array kit after exposition to the Chemidoc (Abcam) apparatus. **(g)** mRNA expression for corresponding TF's target genes. Using the TRRUST database, we selected genes known to be positively regulated by these 15 TFs and we analysed their mRNA expression: *SPP1* gene for FOXD3; *SLC4A9* gene for FOXI1; *PCSK9* gene for HNF-4; *AHRR* gene for AHR; *SOD2* gene for NFE2L2; *BAMB1* gene for FOXF2; *HBB* gene for NFE2L2; *PPAR* gene for HIF1A; *TGFB1* gene for USF1; *FAM89B* gene for NFIA. Only genes with increase in mRNA expression superior to 1.5 fold change in response to nuclear flattening were selected (n = 4 minimum, t-test \* $p < 0.5$ ; ns: not significant). **(h)** Cell height was measured using AFM in cells cultured on soft or stiff matrix (n = 15 minimum, \*\*\*\* $p < 0.001$  t-test).

### Supplementary figure 2

Hela cells were transfected with AP1 GFP reporter or TEAD GFP reporter and plated on poly-L-lysine surface for 1h. Then, Atomic force microscopy was used to apply compressive force on the nucleus. After positioning the cantilever above the nucleus, constant height mode was used (target height of 3  $\mu$ m below the surface) and maintained for 120 min.

### Supplementary figure 3

**(a)** AP1 activity was measured in cells depleted or not for c-Jun in Ctrl, Blebb and Blebb+AP conditions. (n = 5, \*\*\*\* $p < 0,001$  one-way ANOVA – Tukey's multiple comparisons post-test) **(b)** Representative cells stained for p-Jun Ser73 (magenta) and for nucleus (cyan) in Ctrl, Blebb and Blebb + AP conditions. Scale bar = 10  $\mu$ m. Nuclear heights were measured using Hoechst staining. **(c)** Corresponding quantifications of p-Jun Ser73 nuclear intensity (n = 58 minimum from 2 independent experiments, \*\*\*\* $p < 0.001$  one-way ANOVA – Tukey's multiple comparisons post-test). **(d)** Immunoblots of SUN1, SUN2, and GADPH for MRC5 cells depleted or not for SUN1, SUN2 and SUN1 and SUN2. **(e)** Quantifications of YAP activity (ratio nucleus/cytosol) in Ctrl and Ctrl + AP conditions.

### Supplementary figure 4

Immunoblots of p-YAP (Ser127), YAP and GFP for Hela cells transfected with these following plasmids: Ctrl-GFP, LATS1<sup>WT</sup>-GFP, LATS1<sup>T1079E</sup>-GFP, LATS1<sup>T1079D</sup>-GFP. **(b)** Quantifications of YAP activity (nucleus/cytosol ratio) in Ctrl, Blebb and Blebb + AP conditions for cells transfected with LATS1<sup>T1079D</sup>-GFP; n = 18 minimum \*\*\* $p < 0.01$  one-way ANOVA – Tukey's multiple comparisons post-test). **(c)** Immunoblots of Lamin A/C and Vinculin for MRC5 cells infected with shRNA scramble or shRNA against lamin AC. **(d)** Percentage of EdU positive cells for cells depleted or not for c-Jun and YAP (n = 4 independent experiments with at least 1500 events for each condition per experiment. \*\*\* $p < 0.01$  one-way ANOVA – Tukey's multiple comparisons post-test).

**Supplementary Table 1.** Antibody listing and Taqman gene primers ID

**Supplementary Table 2.** Resulting interaction table - Protein-Protein Interaction Network reconstruction and analysis

**Supplementary Table 3.** Mechano-related protein list used for Protein-Protein Interaction Network reconstruction and analysis

Figure 1

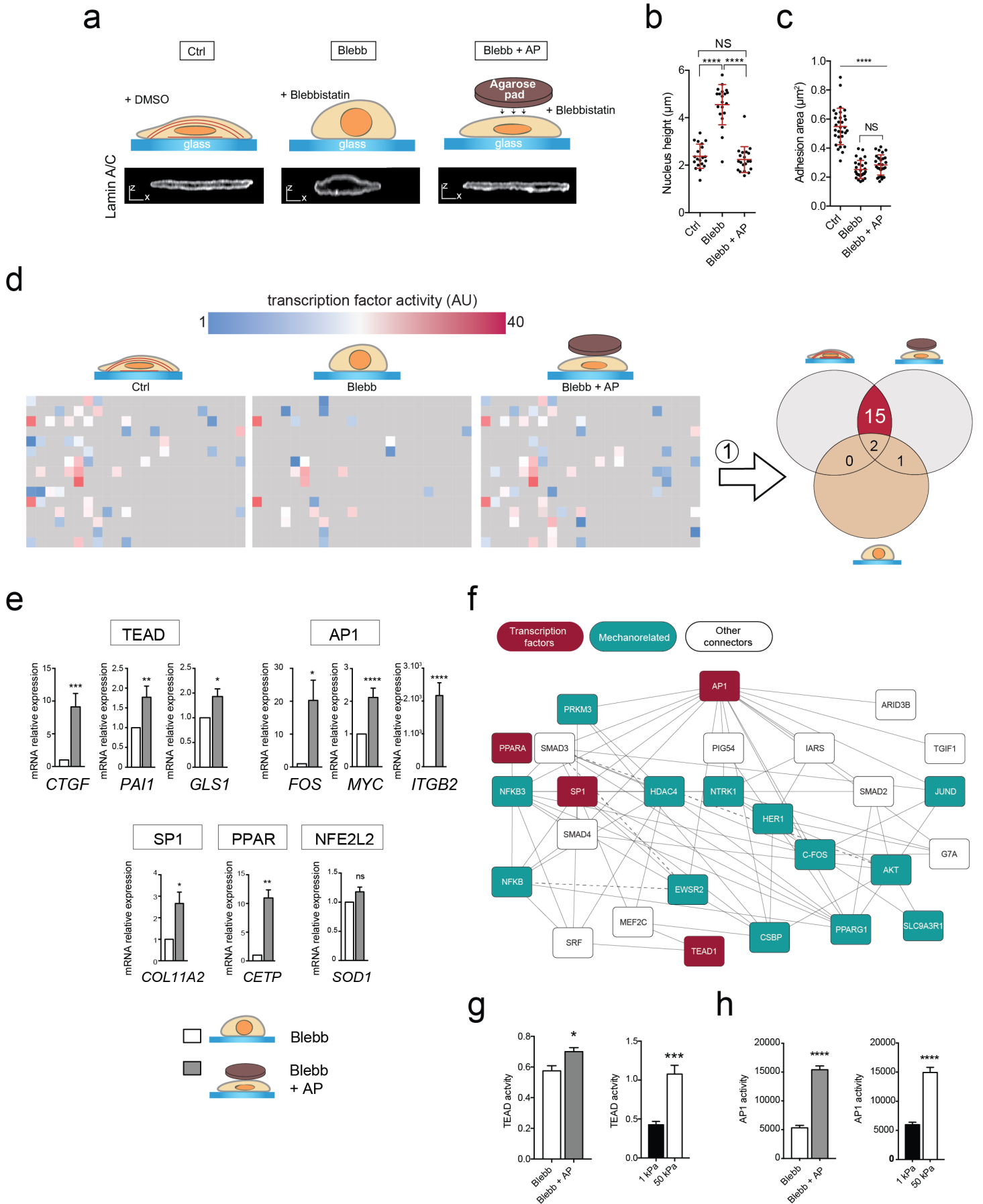


Figure 2

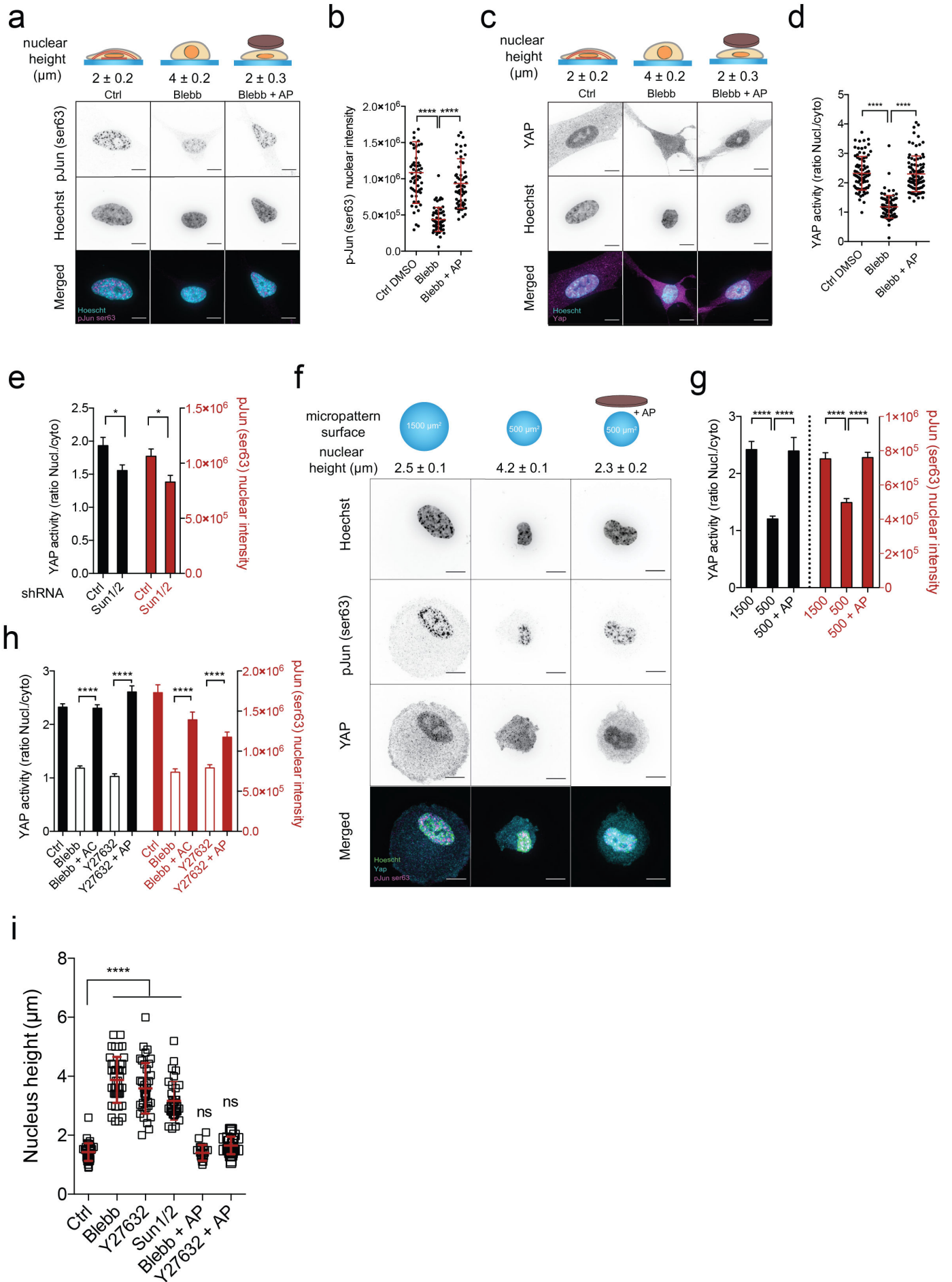


Figure 3

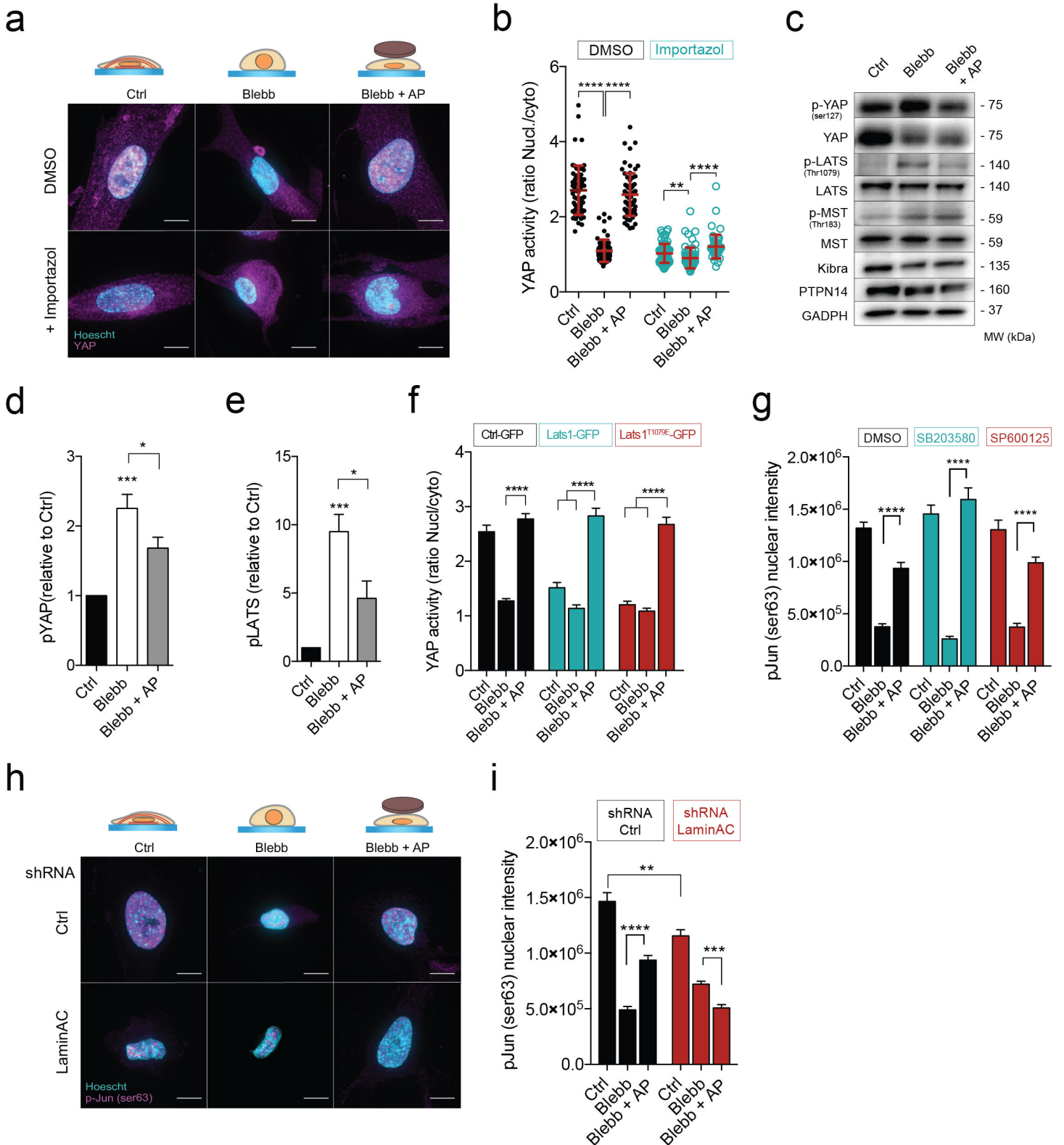
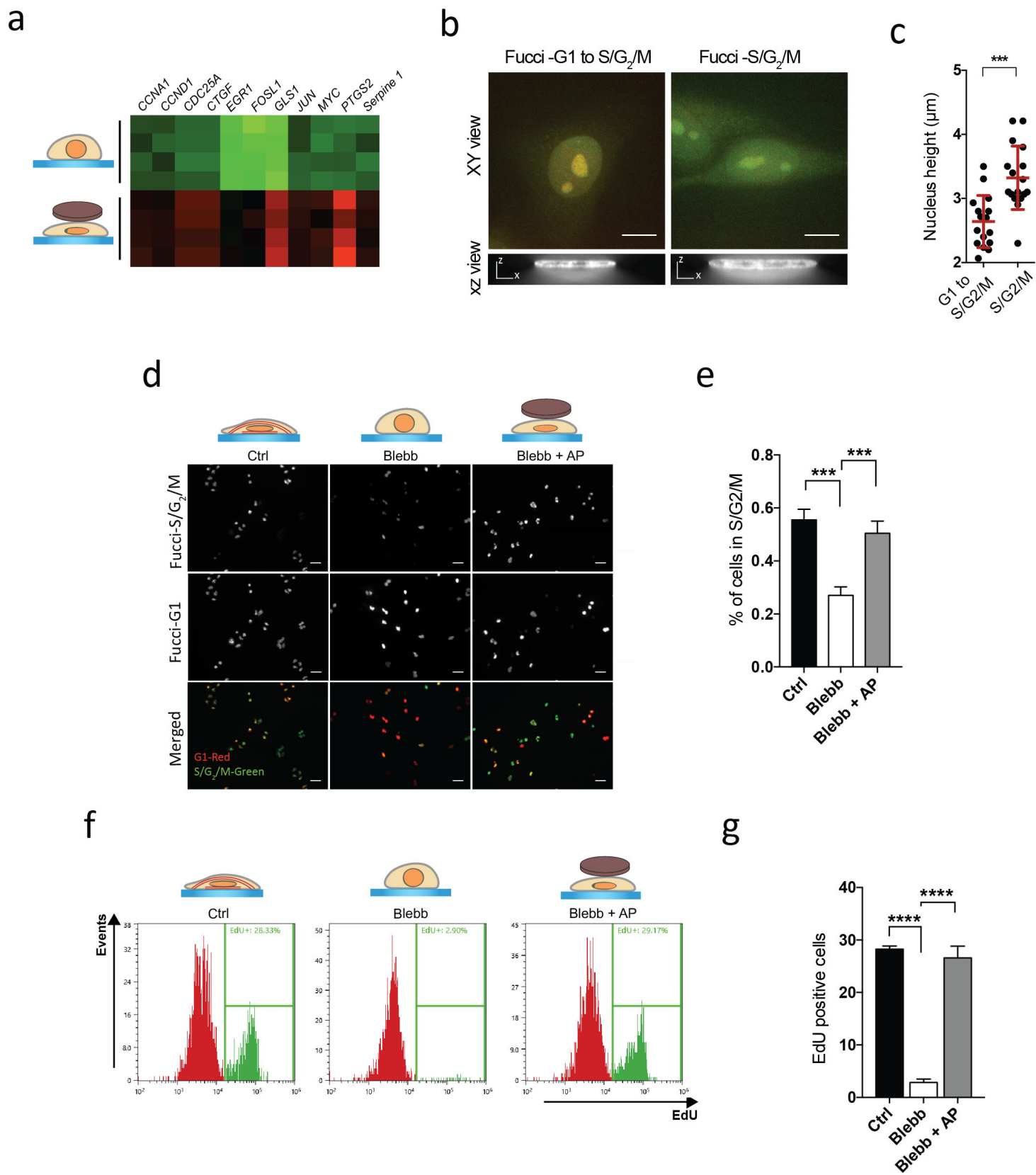
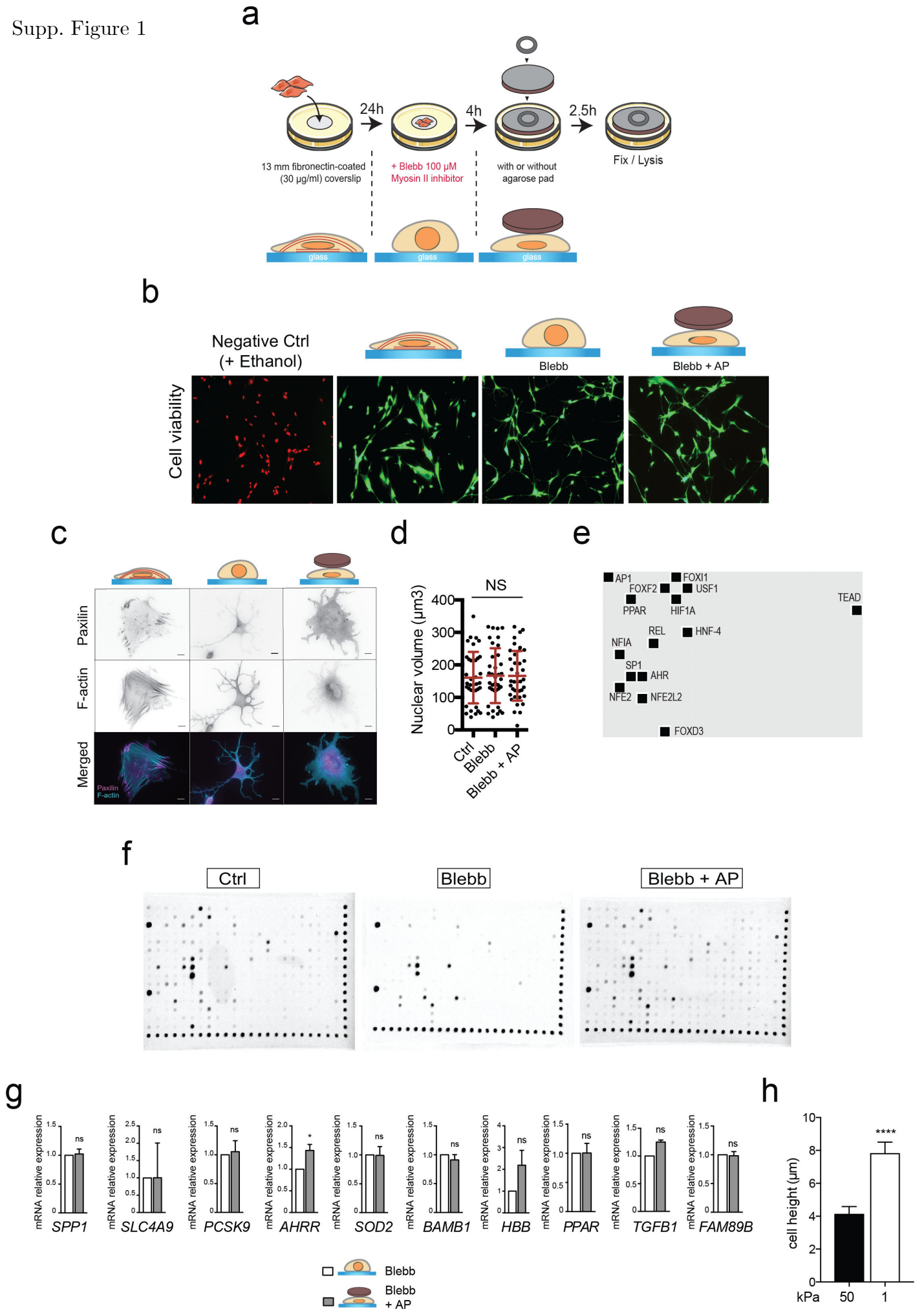




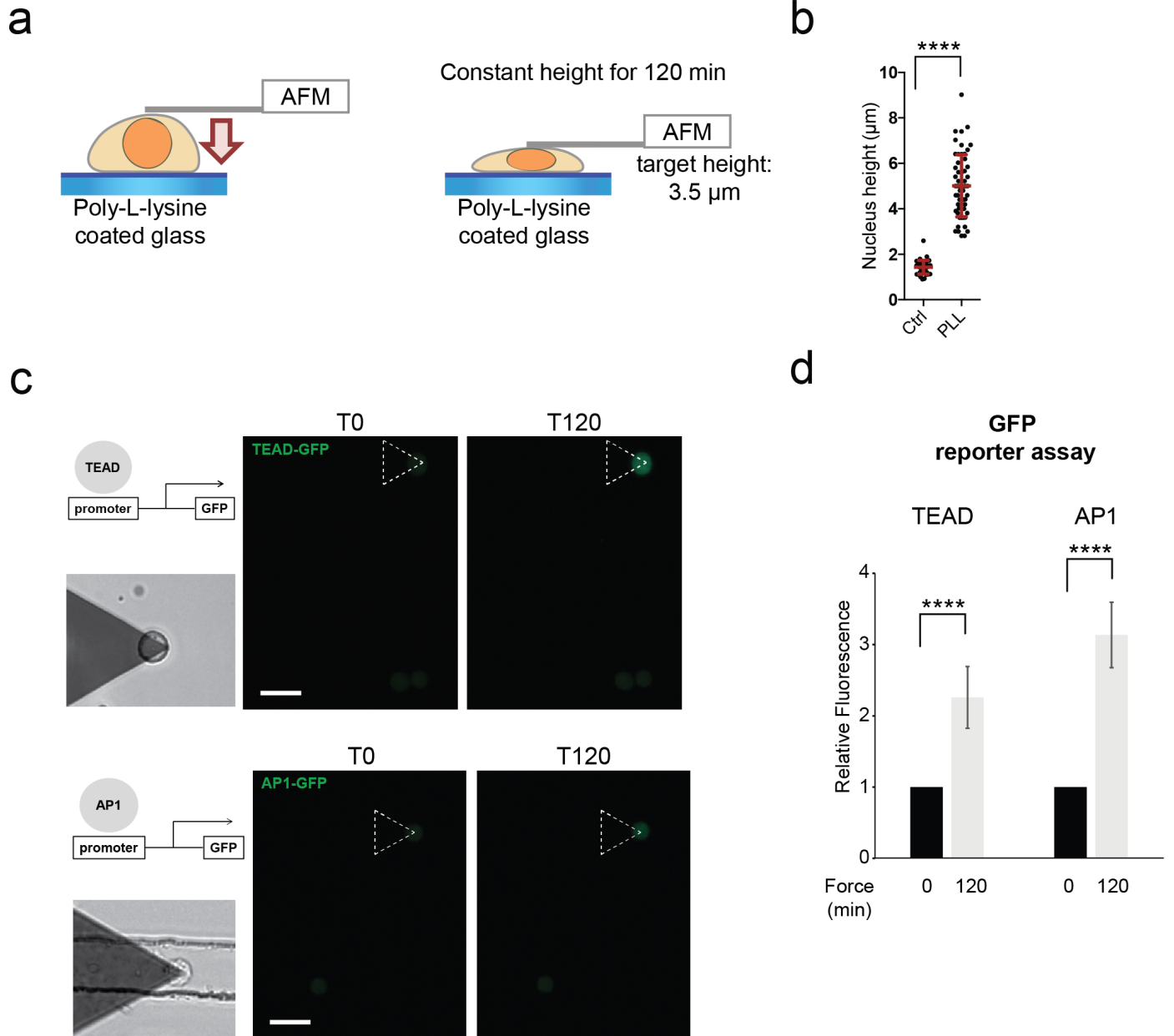
Figure 4



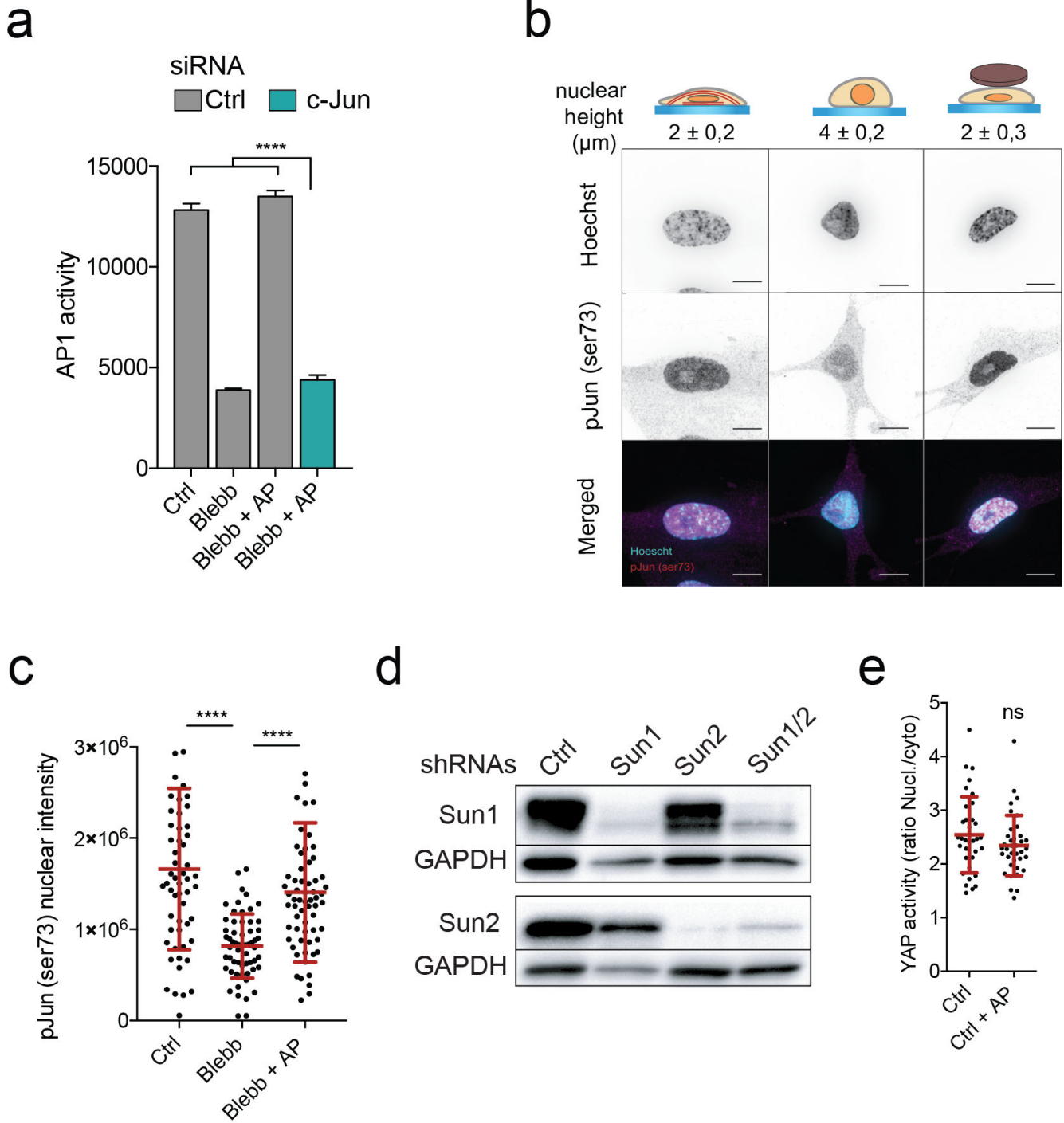
Supp. Figure 1



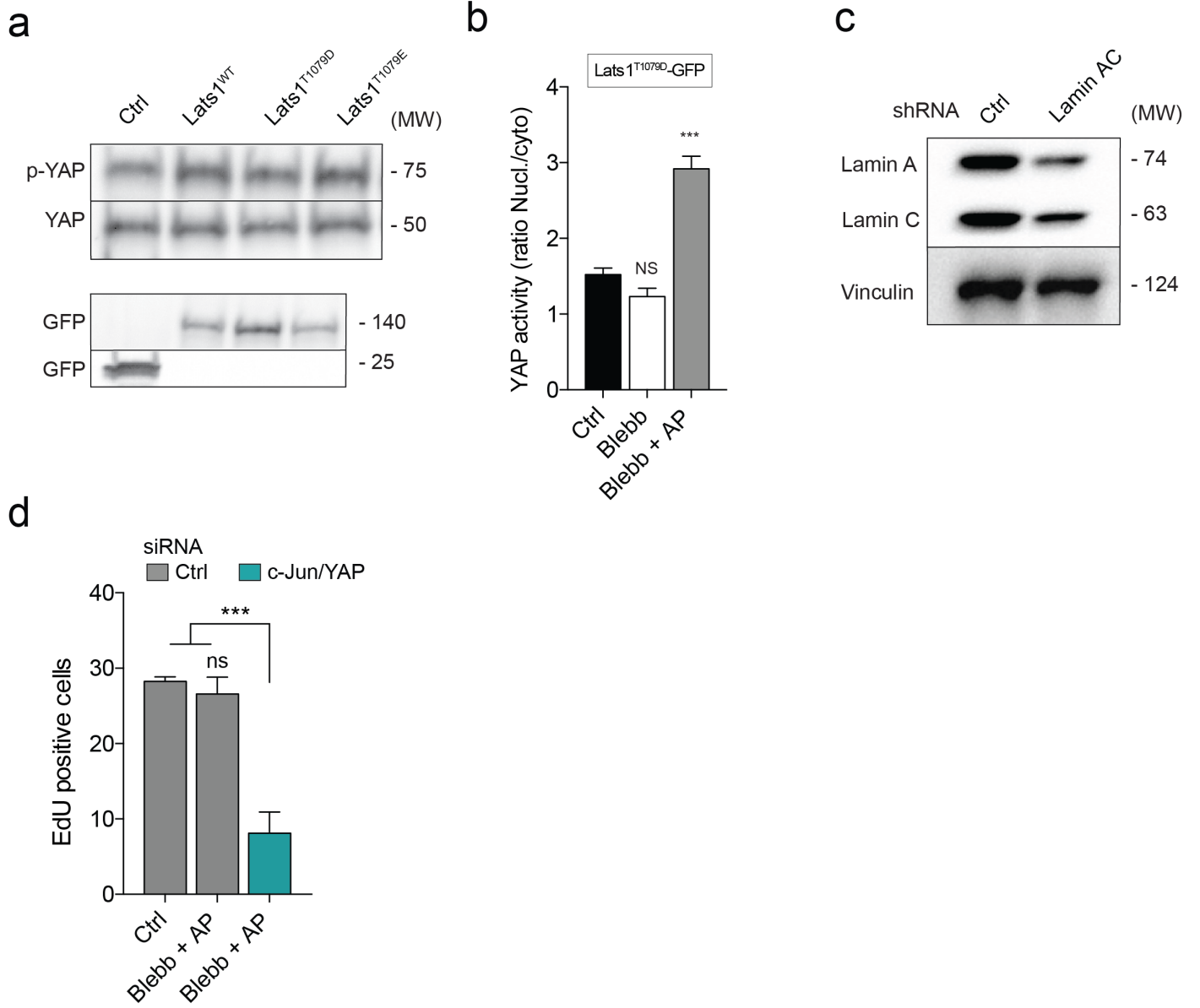
Supp. Figure 2



Supp. Figure 3



Supp. Figure 4



## Discussion et Perspectives

Au cours de l'adhérence ou pendant la migration, la forme du noyau peut grandement être affectée du fait des contraintes mécaniques générées par le cytosquelette ou émanant du microenvironnement. De plus, ces modifications de formes du noyau ont été observées dans de nombreuses pathologies, incluant le cancer et les maladies cardiovasculaires où les noyaux peuvent être retrouvés plus élargis, avec des contours irréguliers comparés à des tissus sains pour lesquels l'enveloppe nucléaire apparaît lisse (Chow et al., 2012; Dickhout and Lee, 2000; Zink et al., 2004). Il est maintenant bien reconnu que la réponse cellulaire à des changements des propriétés mécaniques de l'environnement est en grande partie liée au remodelage du cytosquelette *via* la tension générée de la cellule ou la maturation des adhérences (Hoffman et al., 2011). Cependant, peu d'éléments indiquent que des modifications de la forme du noyau sont impliquées au cours de ces réponses. La forme du noyau étant intrinsèquement liée au cytosquelette (Khatau et al., 2009; Kim et al., 2017), il est possible que ces réponses observées, soient imputables en partie ou totalement à l'enveloppe nucléaire. Des travaux récents ont montré que la forme du noyau peut contrôler la localisation de YAP, un cofacteur de transcription (Elosegui-Artola et al., 2017), ou que l'expression de gènes peut directement être régulée par la tension appliquée sur le complexe LINC (Guilluy et al., 2014; Tajik et al., 2016) qui transduit les stimuli mécaniques de l'extérieur vers l'intérieur du noyau. Cependant, il existe peu d'informations concernant la régulation globale de la machinerie transcriptionnelle de la cellule lors des changements de forme du noyau. Afin d'analyser les modifications de l'activité transcriptionnelle induites par des déformations nucléaires, nous avons adapté une technique préalablement utilisée par Dumont et Mitchison (Dumont and Mitchison, 2009) permettant de moduler la hauteur du noyau indépendamment des réarrangements du cytosquelette, et nous avons analysé l'activité de 345 facteurs de transcription (FTs).

## **La forme du noyau régule l'activité de facteurs de transcription**

Des études antérieures ont exploré la réponse transcriptomique lors de la déformation du noyau durant le confinement cellulaire (Le Berre et al., 2012) ou en réponse à des changements de forme de la cellule (Thomas et al., 2002), cependant dans ces études, l'intégrité du cytosquelette était conservée et les résultats obtenus sont difficilement attribuables à la déformation nucléaire seule. Dans notre étude concernant l'analyse des facteurs de transcription, des fibroblastes humains (MRC-5) ont été traités avec de la blebbistatine, un inhibiteur de la myosine II. L'utilisation de ce composé permet d'inhiber la formation des fibres de stress y compris les filaments périnucléaires qui appliquent des contraintes mécaniques sur le noyau (Khatau et al., 2009; Luxton

et al., 2011). D'autres classes de fibres de stress comme les fibres radiales, qui contiennent peu de myosine II sont également inhibées, car leur formation est dépendante de la tension générée par la cellule (Tee et al., 2015). Les composés qui viennent spécifiquement inhiber la polymérisation d'actine-F, en séquestrant l'actine globulaire comme la latrunculine B ou en empêchant l'élongation de l'actine-F comme la cytochalasine D, se lient à l'actine et sont susceptibles d'affecter l'activité de cofacteurs de transcription, comme MRTF-A (Miralles et al., 2003a; Posern et al., 2004; Vartiainen et al., 2007). Étant donné l'objectif de ce projet, l'utilisation de tels composés ne paraissait pas adaptée car il était primordial de ne pas interagir avec ces régulateurs de la transcription.

Une conséquence de l'utilisation de la blebbistatine est l'augmentation de la hauteur du noyau, qui n'est plus mécaniquement contraint par les filaments d'actine périnucléaires. Ces résultats sont en accord avec des observations antérieures qui montraient que le noyau présente une plus grande hauteur lors de l'utilisation de cet inhibiteur plutôt qu'avec de la latrunculine B (Khatau et al., 2009; Lovett et al., 2013). Par la suite, nous avons appliqué une compression à l'aide d'un coussin d'agarose déposé sur les cellules traitées à la blebbistatine, afin de restaurer une hauteur de noyau similaire à celle des cellules contrôles. Des variations du volume nucléaire ont été décrites en réponse à des changements de pression osmotique extracellulaire ou à des modification de la forme de la cellule (Finan and Guilak, 2010; Guo et al., 2017). L'approche par immunofluorescence nous a permis de quantifier le volume du noyau et celui-ci reste inchangé entre toutes nos conditions notamment en présence du coussin d'agarose. De plus, nous n'avons pas observé de hernie de l'enveloppe nucléaire ou de rupture de la membrane plasmique qui pourraient causer une altération de la pression osmotique intranucléaire ou cytoplasmique. Ces résultats sont cohérents avec des travaux récents qui montrent que le volume du noyau est constant au cours de la migration dans des espaces confinés (Davidson et al., 2015) ou lors de l'étalement (Li et al., 2015).

L'analyse de la maturation des adhérences a également été un point essentiel dans la validation de notre approche. En effet, les travaux de Riveline et ses collaborateurs ont montré que l'application de force de tension au niveau du noyau pouvait entraîner la maturation des adhérences (Riveline et al., 2001a), même en l'absence de la tension générée par la myosine II. Ce renforcement des adhérences de la cellule est bien décrit pour réguler l'expression de gènes *via* les mécanismes de mécanotransduction tels que l'activation de YAP ou de MRTF-A (Dupont et al., 2011; Miralles et al., 2003b) et pourrait être un biais important dans notre approche. Nous



avons ainsi quantifié la taille des sites d'adhérence par immunofluorescence en utilisant un marquage de la paxilline. Comme attendu, nous avons observé une diminution significative de l'aire des complexes d'adhérences quand les cellules sont traitées à la blebbistatine. L'ajout du coussin d'agarose n'a pas influencé la surface des adhérences et donc leur maturation, validant ainsi notre méthode. Pour mesurer l'activité des 345 FTs en réponse à la modification de la forme du noyau, nous avons mesuré leur capacité à se lier sur leur séquence d'ADN cible pour des MRC-5 en condition contrôle ou traitées avec de la blebbistatine avec et sans coussin d'agarose. Nous avons trouvé que le traitement à la blebbistatine inhibe 17 FTs dont TEAD comme déjà décrit par le groupe de Piccolo (Dupont et al., 2011), et que la compression du noyau induit l'activation de 15 FTs. Pour confirmer ces résultats, nous avons analysé l'expression des ARNm des gènes positivement régulés par ces facteurs de transcription. L'analyse de transcriptomique a révélé que sur ces 15 FTs, seuls les gènes ciblés par AP1, TEAD, PPAR et SP1 voyaient leurs expressions significativement augmentées lorsque la hauteur des noyaux est restaurée au même niveau que les cellules contrôles. Ces FTs sont impliqués dans la réponse cellulaire aux stimuli mécaniques, comme l'a démontré notre analyse bio-informatique. L'absence de modification de l'expression des ARNm des gènes contrôlés par les 11 autres FTs pourrait s'expliquer par l'absence de cofacteurs impliqués dans la modulation des gènes cibles, ou par des mécanismes de répression épigénétique empêchant l'accessibilité du FT à sa séquence cible.

Le facteur de transcription PPAR est particulièrement intéressant dans la mesure où il joue un rôle important dans la différenciation des cellules souches mésenchymateuses (Grimaldi, 2001). Il serait intéressant de caractériser son activité dans ces cellules qui sont connues pour répondre à la rigidité et s'engager dans différentes lignées selon le contexte physico-chimique (Discher et al., 2005; Ihalainen et al., 2015a). SP1, un FT ubiquitaire découvert dans les années 80 (Kadonaga et al., 1987), a été décrit récemment pour initier la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) en coopération avec un autre FT, la protéine ZEB2 (Ko and Kim, 2018; Nam et al., 2012, 2014). Le remodelage du cytosquelette est un marqueur de cette transition, avec notamment l'augmentation de la tension générée de la cellule (Scarpa et al., 2015). Ce remodelage pourrait appliquer une contrainte de déformation plus importante sur le noyau et moduler, *via* SP1, une partie de la reprogrammation pour la TEM. On pourrait utiliser une approche par immunofluorescence pour caractériser la forme du noyau et voir si la forme nucléaire change au cours de cette TEM. De plus, étant donné qu'il a été montré que les filaments intermédiaires dans les kératinocytes atténuent les forces de compression du cytosquelette d'actine sur le noyau (Almeida et al., 2015b), il serait intéressant de tester cette hypothèse dans des cellules déplétées pour les filaments

intermédiaires. Par l'utilisation d'inhibiteurs génétiques dirigés contre la kératine, on pourrait analyser par transcriptomique l'expression des gènes connus pour être impliqués dans la TEM comme la E-cadhérine (Lamouille et al., 2014).

AP1 et TEAD sont tous les deux des FTs impliqués dans la transduction des signaux mécaniques dans des contextes physiologiques et pathologiques (Ip and Davis, 1998; Pan, 2010; Zanconato et al., 2016). C'est pourquoi, nous avons choisi d'explorer, pour la suite de cette étude, comment la forme du noyau pouvait réguler l'activité de TEAD et AP1. Pour conforter nos résultats, nous avons mesuré leur activité dans des cellules dont la hauteur du noyau a été contrôlée par différentes approches : en cultivant des cellules sur différentes rigidités, ou sur de la poly-L-lysine qui empêche l'activation des intégrines et les remodelages du cytosquelette associé (Guan et al., 1991). Dans la première approche, nous avons observé que AP1 et TEAD sont plus actifs dans des cellules cultivées sur matrice rigide où elles forment des fibres de stress péri-nucléaires qui compressent mécaniquement le noyau (Kim et al., 2012b). En accord avec ces observations, lorsque les cellules ont été cultivées sur de la poly-L-lysine, l'application d'une contrainte mécanique compressive par le levier de l'AFM a entraîné également l'activation de ces deux FTs. L'ensemble de ces résultats montre ainsi que l'aplatissement du noyau, en l'absence de tension générée par la myosine II, suffit à activer TEAD et AP1.

## **YAP et c-Jun sont activés en réponse à l'aplatissement du noyau**

AP1 est composé de dimères de Fos, Jun et des membres de la famille ATF (Davis, 2000). De façon très intéressante, il a été montré que c-Jun est activé en réponse à des contraintes d'étirements cycliques (MacKenna et al., 1998) et aux forces de friction (Chen et al., 1999; Jalali et al., 2001). La forme du noyau étant fortement affectée dans chacune de ces conditions, nous avons souhaité savoir si c-Jun pouvait être activé lorsque le noyau était compressé, indépendamment du remodelage du cytosquelette. Dans un premier temps, nous avons confirmé que l'activation de AP1 était bien dépendante de c-Jun dans les cellules traitées à la blebbistatine et compressées mécaniquement avec le coussin d'agarose car la déplétion de c-Jun empêche bien l'activation de AP1 dans ces conditions. Étant donné que l'activité transcriptionnelle de c-Jun est régulée par la phosphorylation de deux résidus : Ser63 et Ser73 (Davis, 2000), nous avons quantifié l'intensité de marquage de c-Jun phosphorylé sur ces résidus par immunofluorescence. De façon similaire à AP1, les phosphorylations de c-Jun sur ces résidus diminuent lorsque les cellules sont traitées à

la blebbistatine, et sont restaurées comme en contrôle, quand les noyaux des cellules sont mécaniquement contraints.

YAP est un régulateur de transcription qui se lie à TEAD lorsqu'il est dans le noyau pour aller activer la réponse des gènes cibles (Dupont et al., 2011). Il a été identifié comme un régulateur d'expression génique en réponse à des changements de rigidité de la MEC ou en réponse à des forces de tensions cycliques (Chaudhuri et al., 2014; Dupont et al., 2011; Nakajima et al., 2017). De ce fait, l'inhibition de la tension dépendante de la myosine II affecte directement la localisation de YAP qui est redistribué dans le cytosol (Halder et al., 2012). Des résultats récents indiquaient une corrélation entre la forme du noyau et l'activité de YAP (Driscoll et al., 2015; Elosegui-Artola et al., 2017; Shiu et al., 2018). Dans toutes ces études, la localisation intranucléaire de YAP est perturbée lorsque le complexe LINC est supprimé. Or, ce complexe est nécessaire pour l'attachement des fibres d'actines périnucléaire responsables de la génération des contraintes mécaniques sur le noyau (Khatau et al., 2009). Afin de regarder si la forme seule du noyau pouvait impacter l'activité de YAP, nous avons caractérisé par immunofluorescence sa localisation nucléo-cytoplasmique dans nos conditions. Nos résultats ont permis de montrer que la forme du noyau a un impact directement sur son activité. Lorsque le noyau est aplati, YAP se trouve principalement dans le noyau, et ce, indépendamment des voies de signalisation liées à la maturation des adhérences et à l'intégrité du cytosquelette.

Il a été montré que la forme de la cellule régule l'activité d'AP1 et de TEAD (Dupont et al., 2011; Marinissen et al., 2004; Zhu and Assoian, 1995). Afin de dissocier l'effet de la forme cellulaire sur l'activité de c-Jun et la localisation de YAP, nous avons cultivé des fibroblastes sur des micromotifs de 500 et 1500  $\mu\text{m}^2$ . Cette approche nous a permis de contrôler l'étalement de la cellule, qui est corrélée à la hauteur du noyau. En effet, lors de l'étalement, les changements de forme de la cellule associés aux réarrangements du cytosquelette conduisent à l'aplatissement du noyau (Li et al., 2015). Dans les conditions où les cellules sont peu étalées, la contrainte nucléaire apportée par le coussin d'agarose permet de restaurer, comme en contrôle, la localisation de Yap et la phosphorylation de c-Jun. Nos résultats suggèrent ainsi que l'étalement de la cellule contrôle l'activité de YAP et de c-Jun *via* l'aplatissement du noyau. L'étalement de la cellule se fait en deux étapes successives impliquant d'abord l'aplatissement du noyau indépendamment de la contractilité du cytosquelette (Li et al., 2015), suivi d'un remodelage en partie contrôlé par ROCK et mDia (Amano et al., 1997; Watanabe et al., 1999). Au cours de l'étalement, il est donc probable que les activités de YAP et de c-Jun soient contrôlées par ROCK seulement dans cette

deuxième étape, qui intervient généralement après les 20 premières minutes d'étalement (Li et al., 2015). En effet, le traitement des cellules avec l'inhibiteur Y27632 de ROCK a eu pour conséquence l'augmentation de la hauteur des noyaux comme attendu. En effet, ROCK participe à la génération de la tension indispensable à la formation de l'actine périnucléaire (Driscoll et al., 2015; Khatau et al., 2009). Afin de dissocier plus précisément les mécanismes de l'aplatissement du noyau au cours de l'étalement, il serait intéressant de caractériser les acteurs moléculaires de la voie Rho qui conduisent spécifiquement à une modification de la forme du noyau. On pourrait par exemple analyser l'activité des nucléateurs de la formation de l'actine périnucléaire tels que FHOD1 (Kutscheidt et al., 2014) ou Arp2/3 (Thiam et al., 2016b) durant l'étalement ou mesurer leur contribution à l'aplatissement du noyau par leur inhibition.

L'existence éventuelle d'un seuil de déformation nucléaire qui permettrait d'initier et/ou limiter le transport de YAP du cytoplasme vers le noyau et l'activation de c-Jun reste également une question fascinante à explorer. On pourrait par exemple, manipuler précisément la hauteur individuelle de cellules à l'aide d'un AFM ou de plaques rhéologiques et suivre la localisation de YAP et la phosphorylation de c-Jun par immunofluorescence. Connaître l'impact d'une déformation répétée reste également une question ouverte. Une approche intéressante serait de regarder l'activité de YAP et c-Jun dans des cellules circulantes où l'organisation du cytosquelette d'actine est différente comparée à des cellules adhérentes (Lämmermann et al., 2008). L'enveloppe nucléaire des leucocytes, par exemple, est fortement déformée lors de leur migration dans des espaces confinés (Pflücke and Sixt, 2009; Sixt, 2011; Wolf et al., 2013). Lors de la migration des noyaux en périphérie des cellules musculaires squelettiques, la forme du noyau est également fortement remaniée (Roman et al., 2018). Est-ce que ces déformations sont suffisantes pour initier la translocation de YAP et l'activation de c-Jun ? De plus, il a été montré récemment que dans les cellules en migration confinée, des mécanismes de réparation de l'enveloppe nucléaire sont assurés par la protéine ECSRT-III (Denais et al., 2016; Olmos et al., 2015; Raab et al., 2016b). Il serait intéressant de savoir si les acteurs moléculaires de la réparation et du maintien de l'intégrité de l'enveloppe nucléaire sont sous le contrôle d'un programme génétique dépendant de AP1 et/ou TEAD.

## **L'aplatissement du noyau contrôle distinctivement l'activation de TEAD et AP1**

Afin de mieux comprendre comment c-Jun et YAP peuvent être contrôlés en réponse à la forme du noyau, nous avons exploré les mécanismes moléculaires connus

pour jouer un rôle dans leur activation. Il a été reporté récemment que l'application d'une force de compression sur le noyau a pour conséquence l'augmentation de la translocation nucléaire de Yap dû à la régulation des pores nucléaires (Elosegui-Artola et al., 2017). En accord avec ces résultats, nous avons montré que la translocation de YAP était fortement diminuée lorsque les cellules sont traitées avec de l'importazole, un inhibiteur de l'importine  $\beta$ . Cependant, nous avons tout de même observé une augmentation significative de YAP dans le noyau lors de l'ajout du coussin d'agarose, suggérant que la régulation des pores nucléaires dans l'activité de YAP n'est pas le seul mécanisme qui participe à l'entrée de YAP dans le noyau lors de la déformation nucléaire.

Des études antérieures ont montré que la tension mécanique pouvait activer YAP par l'intermédiaire de mécanismes dépendants ou non de la voie de signalisation Hippo (Das et al., 2016; Dupont et al., 2011; Sansores-Garcia et al., 2011). Nous avons ainsi, en parallèle, exploré l'effet d'un changement de forme du noyau sur cette voie. L'approche par biochimie a révélé que la phosphorylation de MST ainsi que l'expression de KIBRA et PTPN14 ne sont pas modifiées dans nos conditions alors que l'activité de la kinase LATS, qui phosphoryle et inhibe YAP, varie en fonction de la forme du noyau. En accord avec la littérature (Dupont et al., 2011), l'ajout de blebbistatine a pour conséquence la phosphorylation et l'activation de LATS qui conduit à la phosphorylation de YAP. La compression nucléaire au contraire diminue la phosphorylation de LATS suggérant un rôle de la déformation du noyau dans le contrôle de son activité. Pour tester le potentiel rôle de l'activité de LATS dans la translocation de YAP, nous l'avons exprimée dans les cellules sous une forme sauvage ou une forme phosphomimétique (T1079E). L'expression de ces deux constructions a eu pour conséquence une forte diminution de YAP dans le noyau, mais de façon très intéressante, la compression nucléaire dans ces conditions a pu induire la translocation de Yap dans le noyau malgré sa phosphorylation, corroborant ainsi une étude antérieure montrant que Yap pouvait être dans le noyau même phosphorylée (Das et al., 2016). L'ensemble de ces résultats suggèrent ainsi qu'il existe au moins deux mécanismes indépendants dans l'activation de Yap en réponse à l'aplatissement du noyau. Un mécanisme contrôlant sa phosphorylation, et un autre contrôlant sa localisation indépendamment de son état phosphorylé, *via* par exemple, l'augmentation du transport des molécules par les pores nucléaires (Elosegui-Artola et al., 2017).

L'activation de c-Jun est connue pour être sous la dépendance de la voie des MAP kinase (Davis, 2000). Cependant, l'inhibition pharmacologique de la kinase de Jun (JNK) et de p38 n'a pas empêché l'activation de c-Jun en réponse à l'aplatissement

du noyau suggérant ainsi qu'un autre mécanisme d'activation est impliqué. Le fait que le volume du noyau ait été conservé après l'ajout du coussin d'agarose suggère une augmentation de la tension de membrane nucléaire atténuée notamment par la présence de la lamine A/C qui applique des forces de résistance (Broers et al., 2004). La mise en tension de la lamine A/C pourrait dans ce cas, moduler l'activité de c-Jun dans la mesure où la mise en tension des lamines en réponse aux contraintes de compression nucléaire change leur conformation (Ihalainen et al., 2015a; Swift et al., 2013b). De plus, il a été montré que c-Fos interagit avec la lamine A/C, et qu'en réponse au sérum, celui-ci est libéré, permettant ainsi son activation rapide (González et al., 2008; Ivorra et al., 2006). Sur la base de ces travaux, nous avons alors évalué le rôle de ces lamines dans l'activation de c-Jun lors de l'ajout du coussin d'agarose. Nos résultats ont montré pour la première fois que la déplétion de la lamine A/C empêche la phosphorylation de c-Jun sur la sérine 63 lors de l'aplatissement du noyau. La phosphorylation de c-Jun pourrait dépendre d'un ou plusieurs mécanismes. La lamine A/C pourrait jouer un rôle de plateforme d'échafaudage pour moduler l'activité de kinases ou de phosphatases qui viendrait spécifiquement interagir avec c-Jun (González et al., 2008). Pour tester cette hypothèse il serait intéressant d'utiliser une approche d'identification par biotinylation de proximité de c-Jun en construisant une protéine de fusion cJun-ligase de la biotine (Roux et al., 2012) ou de faire une immunoprécipitation d'un mutant phosphorésistant de c-Jun après l'ajout du coussin d'agarose afin d'isoler les interacteurs de la protéine.

Les expression de Jun et de YAP ont également été décrites comme étant modulées par une voie de dégradation des protéines passant par une ubiquitination dépendante du complexe d'ubiquitine ligase E3 (Babaei-Jadidi et al., 2011; Tu et al., 2014). L'hypothèse d'un contrôle commun de la dégradation de ces protéines en réponse à un changement de conformation de la lamine A/C lié à l'aplatissement du noyau reste attrayante. On pourrait tester cette hypothèse en inhibant spécifiquement les acteurs de cette voie de dégradation comme la protéine FBXW7 (pour *F-box/WD repeat-containing protein 7*) à l'aide de siRNAs ou par l'utilisation d'inhibiteurs tel que le NAE (*Nedd8-activating enzyme inhibitor*) qui inhibe l'activité des ubiquitines ligases E3, et caractériser ainsi l'activité de YAP et de c-Jun dans nos conditions.

La troisième hypothèse concerne la tension de surface de la membrane. Une récente étude a montré que des variations de tension de la membrane nucléaire participaient à l'activation de phospholipase (Enyedi et al., 2016b). En réponse à la compression nucléaire, la tension de surface est augmentée au niveau de la courbure du noyau (Elosegui-Artola et al., 2017). L'étirement plus important de l'enveloppe

nucléaire pourrait alors activer des acteurs moléculaires dépendant des voies de signalisation lipidique. De plus, il a été montré récemment que l'activation de la phospholipase C $\gamma$ 1, dépendante des adhérences focales, avait pour conséquence l'activation de YAP en réponse à la rigidité de la matrice *via* l'inhibition de la GTPase RAP2 (Meng et al., 2018). On pourrait ainsi supposer que des mécanismes similaires existent au niveau des membranes nucléaires et pourraient expliquer à la fois la phosphorylation de c-Jun et l'activation de YAP lorsque le noyau est déformé. On pourrait tester cette hypothèse par l'utilisation d'inhibiteurs des phospholipases.

## **L'aplatissement du noyau stimule la prolifération cellulaire en contrôlant la transition G<sub>1</sub>/G<sub>2</sub> par l'intermédiaire de l'activation de TEAD et AP1**

TEAD et AP1 ont été montrés pour coopérer dans la croissance oncogénique par fixation sur les séquences amplificatrices de l'ADN afin de moduler l'activité des gènes nécessaires à l'entrée en phase S (Zanconato et al., 2015). Cela suggère que l'aplatissement du noyau pourrait contrôler la progression du cycle cellulaire *via* un programme transcriptomique dépendant de TEAD et AP1. Afin de tester cette idée, nous avons analysé l'expression des gènes impliqués dans la prolifération sous le contrôle de ces deux FTs. En accord avec nos résultats antérieurs, le traitement à la blebbistatine a diminué l'expression des gènes cibles, et l'ajout d'une contrainte mécanique sur le noyau a permis de les restaurer. Sur la base de ces observations, nous avons émis l'hypothèse que la cellule pourrait diminuer la hauteur du noyau au cours de la phase G<sub>1</sub> pour activer le programme génétique dépendant de TEAD et AP1 nécessaire à la transition G<sub>1</sub>/S. En mesurant la hauteur des noyaux nous avons effectivement constaté une différence significative durant la transition G<sub>1</sub>/S comparé à la phase G<sub>2</sub>. Cette diminution de la hauteur du noyau pourrait alors dépendre de l'augmentation de la contractilité des cellules observée au cours de la phase G<sub>1</sub> (Huang et al., 1998; Vianay et al., 2018). Par la suite nous avons testé si l'aplatissement du noyau influençait la progression du cycle cellulaire. En combinant une approche d'immunofluorescence et de cytométrie en flux, nous avons montré que l'ajout de blebbistatine diminue significativement le nombre de cellules effectuant la transition G<sub>1</sub>/S, ce qui est en accord avec des résultats qui montraient que la tension du cytosquelette joue un rôle sur le contrôle du cycle cellulaire (Böhmer et al., 1996; Huang et al., 1998; Ingber et al., 1995; Iwig et al., 1995). Enfin le rétablissement de la hauteur du noyau par l'ajout du coussin d'agarose a restauré la capacité des cellules à terminer leur phase S suggérant que dans ces travaux antérieurs, la forme du noyau devait probablement contrôler cet effet. Cette transition G<sub>1</sub>/S est notamment assurée par

l'activation de c-Jun et de YAP en réponse à l'aplatissement du noyau puisque leur déplétion dans des cellules traitées à la blebbistatine et contraintes mécaniquement, ne permet plus l'achèvement de cette phase S.

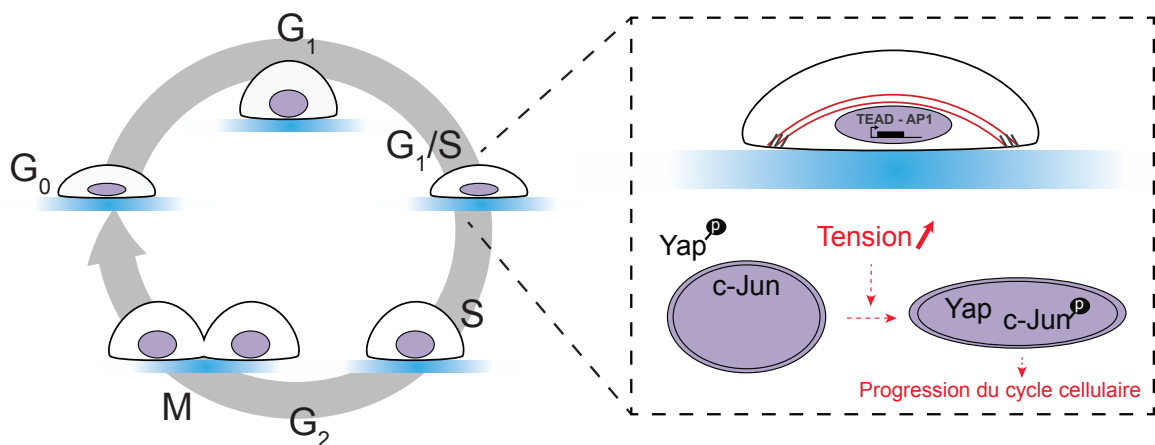
Bien que la modulation des fonctions cellulaires *via* la déformation du noyau ait été anticipée dès le début des années 90 (Sims et al., 1992c), nos résultats ont permis de montrer pour la première fois, que la transition de la phase G<sub>1</sub> à la phase S du cycle cellulaire nécessite l'activation de AP1 et TEAD contrôlée par la forme du noyau. De plus, s'il existe un lien entre l'activation de facteurs de transcription et la forme du noyau, il ne serait pas étonnant que des mécanismes épigénétiques soient également contrôlés par la morphologie nucléaire (Uhler and Shivashankar, 2017). Ces résultats suggèrent également que les mécanismes moléculaires qui déterminent la forme du noyau dans des tissus prolifératifs peuvent jouer un rôle important durant le développement et les processus pathologiques. Par exemple, il est bien reconnu que la tension générée des cellules musculaires lisses est augmentée dans certaines maladies cardiovasculaires comme l'hypertension ou l'athérosclérose (Michel et al., 2012). Or ces pathologies sont caractérisées en partie par une prolifération excessive des cellules qui mène alors au remodelage artériel, exacerbant finalement le phénomène pathogénique (Kovacic et al., 2011). Une étude en 2000 a montré que les noyaux de cellules musculaires lisses issues de média d'aorte de rats hypertendus étaient plus étalés que ceux des rats contrôles (Dickhout and Lee, 2000). Bien que cette approche ne permette pas d'avoir directement une information sur la hauteur, l'augmentation de l'aire des noyaux traduit soit une augmentation de volume et/ou une diminution de la hauteur due à l'aplatissement. Il serait intéressant de déterminer la hauteur des noyaux de cellules à partir de coupes de tissus provenant d'artères de conductance de patients hypertendus par rapport à des patients présentant peu de remodelage artériel. Le développement de cancers est également un autre exemple qui illustre bien l'importance du lien entre morphologie nucléaire et fonction cellulaire. Dès le début des années 80, des marqueurs de prédiction de la progression du cancer de la prostate sont basés sur des paramètres morphologiques du noyau qui décrit le ratio de sa circonférence sur son aire (Diamond et al., 1982; Epstein et al., 1984). Plus ce facteur est élevé, plus le grade du cancer est avancé. Mais dans de nombreux autres cancers, tels que les carcinomes invasifs, le cancer de la thyroïde, ou le cancer du sein, les cellules présentent également des noyaux élargis (Chow et al., 2012). Il serait intéressant de regarder si dans ces cellules, l'activité de TEAD et AP1 est augmentée, et de corrélérer leurs activités avec la hauteur des noyaux. Enfin, le contrôle spatio-temporel de la prolifération est un processus essentiel au cours du développement. Le réarrangement du cytosquelette se fait continuellement en réponse aux variations de la rigidité de la MEC durant le



développement embryonnaire (Janmey and Miller, 2011; Schedin and Keely, 2011), et étant donné que ces réarrangements sont décrits pour influencer le comportement de la cellule (Ingber, 2003), il serait intéressant de travailler sur un modèle *in vivo* comme le poisson zèbre, dans lequel la lamine A/C et une histone seraient marquées par fluorescence. On pourrait ainsi, au cours du développement, mesurer la forme des noyaux et corrélérer ces mesures avec la prolifération afin de tester la relevance de nos résultats *in vivo*.

# Conclusion

Le noyau de la cellule peut être fortement déformé en réponse au réarrangement du cytosquelette ou de l'environnement mécanique externe. Bien qu'il ait été montré récemment que des événements dépendants de l'enveloppe nucléaire pouvaient contrôler la transcription, nos travaux ont mis en avant pour la première fois que la compression du noyau active un réseau spécifique de FTs. De plus, parmi ces acteurs moléculaires, nous avons montré que TEAD et AP1 sont nécessaires pour la transition  $G_1/S$  du cycle cellulaire, et que leur activation est dépendante de c-Jun et YAP, dont l'activité est directement contrôlée par l'enveloppe nucléaire (**figure 35**).



**Figure 35 :** La forme du noyau contrôle la transition  $G_1/S$  du cycle cellulaire. Au cours du cycle cellulaire, la hauteur des noyaux diminue au cours de la phase  $G_1$ . L'augmentation de la contrainte nucléaire a pour conséquence la phosphorylation de c-Jun sur la serine 63 et 73, et la translocation de Yap dans le noyau. L'activation de ces cofacteurs de transcription initie l'expression de gènes dépendant de AP1 et TEAD nécessaires à la transition du cycle cellulaire.

Des questions restent cependant encore en suspens. Quel est le mécanisme d'activation de c-Jun et YAP ? Étant donné que la déplétion du complexe LINC ou de la lamine A/C diminue leur activation, l'enveloppe nucléaire et les protéines associées semblent, tout au moins, être un modulateur crucial de cette voie de signalisation. Est-ce qu'il existe d'autres contextes d'activation de ces FTs associés à des fonctions cellulaires bien spécifiques, comme la réparation de l'ADN ou la différenciation ? Finalement au cours de cette étude, nous nous sommes concentrés sur TEAD et AP1, mais il faudrait également explorer le rôle de PPAR et SP1 dans les fonctions cellulaires en réponse à la déformation du noyau. Enfin, parce que la modulation d'un programme génétique requiert d'un côté l'activation de FTs et de l'autre, l'accessibilité des promoteurs au niveau de l'ADN, la suite du projet découlera naturellement sur l'impact de la morphologie du noyau sur l'architecture chromatinienne.

# ANNEXES

## ARTICLE n°2

### **SUN2 regulates mitotic duration in response to extracellular matrix rigidity**

Belaadi Nejma, Pernet Lydia, Aureille Julien, Chadeuf Gilliane, Rio Marc, Nguyen Luan, Vaillant Nathalie, Louarn Guy, Vitiello Elisa, Loirand Gervaise and Guilluy Christophe

Article soumis dans Nature Communications

#### **Résumé**

Les mécanismes régulant la prolifération cellulaire en réponse aux propriétés de l'environnement mécanique sont encore peu connus et sont pourtant essentiels dans de nombreux aspects de la biologie. En interphase, la rigidité de la MEC influence l'expression de gènes et la progression du cycle cellulaire, pouvant affecter l'homéostasie tissulaire. Dans cet article, nous avons étudié l'effet de la rigidité de la MEC sur la division cellulaire. Nous avons mis en évidence que les cellules se divisent plus rapidement lorsqu'elles sont cultivées sur un substrat rigide. De manière surprenant, nous n'avons observé aucun effet de la rigidité de la MEC sur la durée de l'arrondissement cellulaire lors de l'entrée en mitose ou le ré-étalement post-mitotique, nous avons constaté que les changements de la rigidité de la matrice influent sur la transition entre la métaphase et l'anaphase. Nous avons ensuite comparé le protéome de cellules se divisant sur des substrats mous et rigides et nous avons montré que la rigidité de la MEC régule la stabilité de SUN2, protéine appartenant au complexe LINC, dont le niveau d'expression affecte la progression mitotique. Sur un substrat rigide, le niveau élevé de SUN2 favorise l'activation de FHOD1, permettant le recrutement de l'actine corticale, la génération de forces aux niveaux du cortex et la progression mitotique ; tandis qu'un faible taux de SUN2, retarde l'entrée en anaphase lorsque les cellules sont cultivées sur une matrice de faible rigidité.

**SUN2 regulates mitotic duration in response to extracellular matrix rigidity**

Nejma Belaadi<sup>1</sup>, Lydia Pernet<sup>2</sup>, Julien Aureille<sup>2</sup>, Gilliane Chadeuf<sup>1</sup>, Marc Rio<sup>1</sup>, Luan Nguyen<sup>3</sup>, Nathalie Vaillant<sup>1</sup>, Guy Louarn<sup>3</sup>, Elisa Vitiello<sup>4</sup>, Gervaise Loirand<sup>1</sup> and Christophe Guilluy<sup>2#</sup>

<sup>1</sup> *l'institut du thorax, Inserm, CNRS, université de Nantes, 44000 Nantes, France.*

<sup>2</sup> *Institute for Advanced Biosciences, Centre de recherche UGA - INSERM U1209 - CNRS UMR 5309, Grenoble, France*

<sup>3</sup> *Institut des Matériaux Jean Rouxel (IMN) - UMR CNRS 6502, Université de Nantes, 2 rue de la Houssinière, 44322 Nantes Cedex 3, France.*

<sup>4</sup> *Laboratoire Interdisciplinaire de Physique, UMR CNRS 5588, Université Grenoble Alpes, Grenoble, France*

#Correspondence to: Christophe Guilluy at [christophe.guilluy@inserm.fr](mailto:christophe.guilluy@inserm.fr)

**How cells adjust their growth to the mechanical properties of their surrounding environment is central to many aspects of biology. During interphase, changes in extracellular matrix (ECM) rigidity affect gene expression and cell cycle progression<sup>1</sup>, which can compromise tissue homeostasis<sup>2</sup>. Here we examined the effect of extracellular matrix rigidity on cell division. We found that cells divide more rapidly when cultured on rigid substrate. Surprisingly, we observed no effect of extracellular matrix rigidity on rounding or post-mitotic spreading duration, but instead we found that changes in matrix stiffness impact metaphase to anaphase transition. We next compared the proteomic content of cells dividing on soft and stiff substrates and we found that ECM rigidity regulates the stability of the LINC complex component SUN2, whose level of expression affects mitotic progression. On rigid substrates high level of SUN2 promotes FHOD1 activation, which in turn favors cortical actin recruitment, force generation and mitotic progression, while low level of SUN2 delays the onset of anaphase when cells are grown on soft extracellular matrix.**

In order to evaluate the effect of ECM rigidity on cell division we cultured A7R5 cells (vascular smooth muscle cells) on soft (1 kPa) or stiff (50 kPa) polyacrylamide substrates coated with collagen I and we measured mitosis duration (Fig. 1a). We observed that cells divide more rapidly on stiff surfaces compared to cells plated on soft substrates (Fig. 1b). A similar change in mitosis duration was observed when we cultured fibroblasts (MEFs) or Hela cells on 1 kPa or 50 kPa ECM (Fig. 1b). Interestingly, we observed a gradual decrease in mitosis duration, as we cultured cells on more rigid ECM (Fig. 1c). However no significant change in mitosis duration was observed when substrates more rigid than 12 kPa (Fig. 1c) were used, suggesting that ECM rigidity affects mitotic progression within a range of rigidity before reaching a plateau.

As cells progress in mitosis, they drastically change their shape in order to accommodate the cellular machinery and allow chromosome segregation. These changes are associated with adhesion disassembly as cells enter prophase<sup>3</sup>. Since ECM rigidity affects integrin-based adhesion maturation, we determined if ECM rigidity impacts de-adhesion duration. We measured the elapsed time from initial retraction of the cell margin to complete rounding, and we did not observe any difference whether cells were cultured on soft or stiff ECM (Fig. 1d, e). Similarly we observed no difference in post-mitotic spreading, which started less than 5 min following anaphase regardless of the ECM stiffness (Fig. 1a). Next, we investigated whether changes in ECM rigidity regulate the progression of specific stages of cell division. We fixed actively dividing cells and quantified the percentage of cells undergoing respectively prophase, metaphase, anaphase or telophase. We observed an increased proportion of cells in metaphase when cells were cultured on softer ECM (Fig. 1f), suggesting that low ECM stiffness may cause a metaphase defect or delay.

Force-bearing elements that transmit and/or transduce mechanical stress have been shown to play a key role in mediating the effect of ECM rigidity on cell behavior<sup>4</sup>. To understand the molecular process that regulates mitosis duration in response to changes in ECM rigidity, we compared the detergent-insoluble proteomic content of smooth muscle cells cultured on soft or

stiff ECM using label-free mass spectrometry (Fig 2a). Besides difference in adhesion protein expression and matrix protein expression, we observed a change in SUN2 expression between soft and stiff ECM. SUN2 is an inner nuclear membrane that belongs to the Linker of Nucleoskeleton and Cytoskeleton (LINC) complex and interacts with nesprin to connect the cytoskeleton to the lamina. We found that cells express an increased amount of SUN2 when plated on more rigid ECM (Fig. 2-b, c, d). This is consistent with recent work reporting that the levels of expression of some nucleoskeletal proteins, including SUN2 and lamin A/C, increase with tissue elasticity<sup>5</sup>. We next looked at mitosis duration in cells depleted for SUN2 and found that SUN2 depletion caused a significant increase in mitosis duration (Fig. 2e), whereas SUN1 depletion had no effect on mitosis progression (Supplementary Fig. 1b) Interestingly, cells depleted for SUN2 and plated on 50 kPa ECM completed mitosis in an average duration similar to cells transfected with control siRNA and plated on 1 kPa (Fig. 2f), indicating that SUN2 participates to the effect of ECM rigidity on mitosis duration.

We next explored if this increase in SUN2 expression was the consequence of an increase in *SUN2* transcription or a decrease in SUN2 protein degradation. Using real-time quantitative PCR (qPCR), we examined *SUN2* mRNA expression and we observed no significant changes in response to ECM rigidity (Figure 2g). To investigate SUN2 degradation, we blocked protein synthesis using cycloheximide (CHX) and we analyzed SUN2 expression using immunofluorescence (Fig. 2h) and western blot (Supplementary Fig. 1c). Following CHX treatment, SUN2 expression diminution was reduced when cells were cultured on rigid substrate (Fig. 2h, i), indicating that SUN2 stability increases with ECM rigidity. It has been proposed that SUN2 targeting to the inner nuclear membrane (INM) follows a diffusion-retention model<sup>6</sup>. According to this model, INM proteins distribute by free diffusion within the continuous membranes of the endoplasmic reticulum, outer nuclear membrane (ONM) and INM, where they accumulate depending on their interactions with local protein partners. Interestingly, cells display an increase number of pericuclear actin filaments when they adhere to rigid surfaces<sup>7</sup>. These actin



filaments are connected to nesprin whose interaction with SUN2 may promote its stabilization when cells are cultured on rigid ECM.

We next investigated how SUN2 level of expression regulates mitotic progression and we used cells expressing fluorescent tubulin and histone to follow cell division in live cells using confocal microscopy. We found that SUN2 depletion significantly delayed metaphase completion (Fig. 3a, b), whereas it did not affect the progression of the other phases of mitosis (Fig. 3b).

This is consistent with the increased proportion of cells undergoing metaphase observed when cells are cultured on soft ECM (Fig. 1f) and display low levels of SUN2 expression (Fig. 2h, i). In addition to the anaphase onset delay, we observed an increased length of the mitotic spindle in cells transfected with SUN2 siRNA (Fig. 3c, d). Mitotic spindle length is regulated by many factors including microtubule dynamic and cell shape<sup>8-10</sup>. Interestingly, we found that SUN2 depletion caused a significant increase in cell diameter (Fig. 3c, e). Cell shape in metaphase results from the actin cortex formation and increase in cell volume that occur during prophase and prometaphase<sup>11</sup>. To probe the cell cortex, we used atomic force microscopy (AFM) and we measured force production under confinement (at constant height) of cells arrested in prometaphase using the Eg5 inhibitor STC, as previously described by others<sup>12,13</sup>. Similar to previous reports<sup>13,14</sup>, we observed an initial transient peak force that follows the cantilever approach and a persistent force that remains stable over minutes (Supplementary Fig. 2a, b). We found that SUN2 depletion caused a decrease in both transient peak and persistent force (Fig. 3f), indicating that cortical tension is altered. Others have demonstrated that cortical actin contribute to force production under confinement in prometaphase and defects in actin recruitment or polymerization drastically impact cortical tension<sup>12-14</sup>. To explore how SUN2 can regulate force production, we made confocal imaging of cells arrested in prometaphase. Consistent with the force measurement, we observed that actin recruitment at the cortex was decreased in cells depleted for SUN2 (Fig. 4a, b). Actin and microtubules interact at the cortex during metaphase<sup>10,15</sup> and alteration in cortex mechanical properties or polarity have been shown to

impact spindle formation and positioning<sup>16-19</sup>. Interestingly, previous work has demonstrated that cortical actin defects during metaphase delay the onset of anaphase in yeast<sup>20,21</sup> and in animal cells<sup>16,17</sup>. This indicates that the delay in metaphase to anaphase transition induced by SUN2 depletion may be the consequence of the cortex alteration and mitotic spindle defects. Whereas previous work showed that co-depletion of SUN1 and SUN2 delayed the removal of membranes from chromatin, we did not observe this effect in cells that were only depleted for SUN2<sup>22</sup>. The authors also reported mitotic spindle defects in double knockdown cells<sup>22</sup>, which are consistent with the defects observed in SUN2 depleted cells here. This suggests that SUN1 and SUN2 may have partially redundant roles during mitosis, as it has been observed during other cellular processes<sup>23,24</sup>. However we cannot rule out that SUN2 regulates mitotic progression through additional mechanisms.

Phosphorylation-dependent activation of the RhoA GEF Ect2 was reported to play a key role in triggering the recruitment of cortical actin during prophase by promoting formin-mediated actin polymerization and myosin activation<sup>13,25</sup>. We analyzed Ect2 phosphorylation using phosphate-affinity gel electrophoresis. As expected, we observed an increase in Ect2 phosphorylation during prometaphase (Fig. 4c), however SUN2 depletion did not alter Ect2 phosphorylation in mitosis (Fig. 4c). Additionally, we found that ROCK activity was not affected in SUN2 depleted cells which were synchronized in prometaphase (Supplementary Fig.3a). These results demonstrate that the Ect2/RhoA pathway is not altered in SUN2 depleted cells, indicating that another pathway may be responsible for the defects in actin cortical recruitment.

Interestingly, the LINC complex has been shown to interact with the formin FHOD1<sup>26</sup>, whose activity can be altered in cells displaying nucleoskeletal defects<sup>27</sup>. To investigate FHOD1 activity, we analyzed its phosphorylation on Thre 1141 in cells respectively in interphase and in prometaphase. Strikingly, we observed that FHOD1 is activated in prometaphase (Fig. 4d) and SUN2 depletion prevented mitosis-dependent FHOD1 activation. We next analyzed the effect of FHOD1 depletion on force production and mitosis duration. We found that, FHOD1 knockdown

cells, like SUN2 depleted cells, generated less force during prometaphase (Fig. 4e) and completed mitosis in longer time (Fig. 4f). Another formin, diaphanous-related formin 1 (DIAPH1) was proposed to participate to cortex formation<sup>13</sup>. Interestingly, the formin inhibitor has a drastic effect on force production, compared to FHOD1 depletion (Fig. 4e) or DIAPH1 depletion<sup>13</sup>, which suggests that distinct formins are involved in cortical actin polymerization in mitotic cells. FHOD1 has been shown to participate to adhesion maturation<sup>28</sup> during interphase, however we observed that Sun2 depletion did not affect adhesion number (Fig. 4g, h), maturation (Supplementary Fig. 3b) and cell area (Fig 4i). This suggests that SUN2 participates to mitosis-dependent FHOD1 activation, but has little impact on FHOD1 activity during interphase, as demonstrated by the absence of effect of SUN2 depletion on FHOD1 phosphorylation in interphase (Fig. 4d). FHOD1 interacts with the LINC complex together with perinuclear actin filaments<sup>26</sup>. This perinuclear localization may be crucial for FHOD1 activation as cells enter mitosis. On rigid substrates, high levels of SUN2 may act as scaffold and favor FHOD1 activation. Interestingly, FHOD1 expression is increased in melanomas<sup>29,30</sup> and its inhibition decreases proliferation and tumor growth<sup>30</sup>.

Our results reveal a molecular mechanism which controls mitotic progression in response to changes in tissue mechanics. We found that ECM rigidity regulates SUN2 stability, which in turn impacts mitotic progression. When cells adhere to stiff ECM, high levels of SUN2 expression promote actin cortex formation and faster metaphase to anaphase transition. This mechanism may be important when cells are surrounded by stiff microenvironment. Interestingly, SUN2 protein expression correlates with tissue elasticity *in vivo*<sup>5</sup>. High levels of SUN2 may help consolidating the cortex *via* FHOD1 to act against confinement and allow chromosome segregation. The changes in cell volume that occur during mitosis have been suggested to be sufficient to push a rigid microenvironment, independently of the actin cortex<sup>31</sup>. However a tensed and solid actin cortex may be crucial for mitotic spindle formation to perform mitosis in timely fashion, as it is needed to enable unperturbed spindle morphogenesis when cells are confined within rigid microenvironment<sup>32</sup>.

**ACKNOWLEDGEMENTS:**

We thank Jacques Mazzega and Alexei Grichine for their assistance with the microscopy studies at the IAB Cell Imaging facility (MicroCell). CG. is supported by grants from the Agence Nationale de la Recherche ([ANR-13-JSV1-0008](#)) and from European Research Council (ERC) under European Union's Horizon 2020 research and innovation program (ERC Starting Grant n°[639300](#)).

**AUTHOR INFORMATION:**

Christophe Guilluy ([christophe.guilluy@inserm.fr](mailto:christophe.guilluy@inserm.fr)).

**Figure legends****Figure 1 – ECM rigidity regulates mitosis duration**

(a) A7R5 cells were cultured on soft (1 kPa) and stiff (50 kPa) hydrogels coated with collagen I. Cells were imaged using phase-contrast microscopy and mitotic duration was measured as the elapsed time between the onset of rounding to the first image demonstrating cytokinesis and post-mitotic spreading. Scale bar: 10  $\mu$ m (b) Mitosis duration was quantified for A7R5 (1 kPa n=33 cells; 50 kPa n=32 cells), MEFs (1 kPa n=88 cells; 50 kPa n=41 cells) and Hela Kyoto cells (1 kPa n=193 cells; 50 kPa n=151 cells) (c) A7R5 cells were cultured on hydrogels with various rigidities and mitosis durations were measured using phase-contrast microscopy (n=34 cells for 0.2 kPa; n=51 for 1 kPa; n=42 cells for 8 kPa; n=52 cells for 12 kPa; n=34 cells for 50 kPa and n=36 cells for plastic; Kruskal Wallis test; Dunn's multiple comparison post-test) (d) A7R5 cells were cultured on soft (1 kPa) and stiff (50 kPa) hydrogels coated with collagen. Elapsed time from initial cell margin retraction to complete rounding was measured (e) Rounding duration was quantified for A7R5 (n=29 cells for 1 kPa; n=25 cells for 50 kPa ; Mann-Whitney test) (f) Hela Kyoto cells cultured on soft (1 kPa) and stiff (50 kPa) hydrogels were fixed and the percentage of cells undergoing respectively prophase, metaphase, anaphase and telophase was quantified (n=77 mitotic cells for 1 kPa; n=116 mitotic cells for 50 kPa). (\*p<0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.0001; ns: not significant).

**Figure 2 – SUN2 stabilization regulates mitosis duration in response to ECM rigidity**

(a) Experimental design and schematic diagram of workflow used in this study. A7R5 cells were cultured on soft (1 kPa) and stiff (50 kPa) hydrogels for 24 hours. After purification, the detergent-insoluble proteomic content was analyzed using label-free mass spectrometry (b) A7R5 cells were cultured on soft (1 kPa) and stiff (50 kPa) hydrogels for 6 hours, 24 hours and 5 days. SUN2 expression was then analyzed using western blot. Results are representative of at least 4 independent experiments (c) A7R5 were cultured on soft (1 kPa) and stiff (50 kPa) hydrogels for 24 hours. After fixation, SUN2 expression was analyzed using immunofluorescence. Scale bar: 10  $\mu$ m (d) Corresponding quantifications of SUN2 intensity (n=72 cells for 1 kPa; n=67 cells for 50 kPa) (e) Hela cells depleted for SUN2 were cultured on plastic and mitosis duration was measured using phase-contrast microscopy (n=38 for control siRNA; n=55 for SUN2 siRNA) (f) A7R5 cells depleted for SUN2 siRNA were cultured on soft (1 kPa) and stiff (50 kPa) hydrogels for 24 hours. Mitosis duration was measured using phase-contrast microscopy (n=34 cells for each condition; one way ANOVA - Tukey's multiple comparisons post-test) (g) *SUN2* mRNA levels were analyzed by real-time qPCR in A7R5 cells cultured on soft (1 kPa) and stiff (50 kPa) hydrogels for 24 hours. Results are expressed as relative mRNA expression levels. (n=6; Mann-Whitney test) (h) A7R5 cells were cultured on soft (1 kPa) and stiff (50 kPa) hydrogels and treated with CHX (50  $\mu$ g/ml). After fixation, SUN2 expression was analyzed using immunofluorescence (i) Corresponding quantifications of SUN2 intensity (n=30 cells for 1 kPa; n=35 cells for 1 kPa+CHX, n=27 cells for 50 kPa; n=29 cells for 50 kPa+CHX; Kruskal-Wallis test - Dunn's multiple comparisons post-test) (\*p<0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*\*p<0.0001; ns: not significant).

**Figure 3 – SUN2 depletion causes cortical defects in metaphase**

(a) Hela Kyoto cells (EGFP- $\alpha$ -tubulin/H2B-mCherry) depleted for SUN2 were imaged using confocal microscopy and the duration of each stage was measured. Scale bar: 10  $\mu$ m (b) Corresponding quantifications of mitotic stage durations (n=79 cells for control; n=76 cells for SUN2 siRNA; ns: not significant; \*\*\*\*p<0.0001 determined by two-way ANOVA - Sidak's multiple comparisons post-test) (c) (d) (e) Cell diameter (n=102 cells for control; n=120 cells for SUN2 siRNA) and mitotic spindle length (n=42 cells for control siRNA; n=56 cells for SUN2 siRNA) were measured in Hela Kyoto cells depleted for SUN2. Scale bar: 10  $\mu$ m (f) Hela Kyoto cells depleted for SUN2 were treated with STC (5  $\mu$ M) and force production at constant height (8  $\mu$ m) was monitored using AFM. Initial peak force and persistent force (force at 100 s) were then measured following confinement (n=49 cells for control siRNA; n=54 cells for SUN2 siRNA) (\*p<0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*\*p<0.0001; ns: not significant).

**Figure 4 – SUN2 regulates actin cortex formation in mitosis *via* FHOD1**

(a) HeLa cells depleted for SUN2 were arrested in prometaphase using STC (5  $\mu$ M) and imaged at cell midsection using confocal microscopy. Scale bar: 10  $\mu$ m (b) Corresponding quantifications of F-actin cortex/cytoplasm ratio (n=57 cells for control siRNA; n=66 cells for SUN2 siRNA) (c) HeLa cells depleted for SUN2 were synchronized in prometaphase using STC (5  $\mu$ M). Following mitotic shake-off and lysis, Ect2 phosphorylation was analyzed using phosphate-affinity gel electrophoresis. Results are representative of at least 4 independent experiments (d) HeLa Kyoto cells depleted for SUN2 were synchronized in prometaphase using STC (5  $\mu$ M). Following mitotic shake-off and lysis, FHOD1 expression and phosphorylation were analyzed using western blot. Results are representative of at least 3 independent experiments (e) HeLa Kyoto cells depleted for FHOD1 were treated with STC (5  $\mu$ M) and force production at constant height (8  $\mu$ m) was monitored using AFM. Initial peak force and persistent force (force at 100 s) were then measured following confinement (n=49 cells for control siRNA; n=50 cells for FHOD1 siRNA) (f) Mitosis duration was measured in HeLa cells depleted for FHOD1 using phase-contrast microscopy (n=80 cells for control siRNA; n=94 cells for SUN2 siRNA) (g) A7R5 cells depleted for SUN2 were plated on fibronectin-coated coverslips, fixed, permeabilized and stained for F-actin (Alexa488-phalloidin) and paxillin. Scale bar: 10  $\mu$ m (h) A7R5 cells were treated as above and adhesion number were quantified (n=45 cells per condition from 4 independent experiments; ns=not significant) (i) A7R5 cells were treated as above and cell area was measured (n=93 for control siRNA and n=69 for SUN2 siRNA) (\*p<0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*\*p<0.0001; ns: not significant).

## Methods

**Cell lines, reagents and antibodies.** A7R5 (ATCC®CRL-1444™), HeLa (ATCC®CCL-2™) were bought from ATCC and grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Gibco) supplemented with 10% fetal bovine serum (Sigma) and antibiotic–antimycotic solution (Sigma). HeLa Kyoto EGFP- $\alpha$ -tubulin/H2B-mCherry were bought from Cell Lines Service (330670). Hydrogels with different stiffnesses coated with collagen were purchased from Matrigen. Antibody targeting SUN2 used for western blot (06-1038, 1/1000) was from Millipore. Antibodies against GAPDH (sc-166574, 1/5000), FHOD1 (sc-365437, 1/500) and Ect2 (sc-1005, 1/500) were purchased from Santa Cruz. Antibody against phosphorylated Paxillin (2541, 1/50) were from Cell Signaling. Antibody against phosphorylated FHOD1 was from ECM Biosciences (FP3481, 1/500). Antibody against Paxillin (ab3127, 1/250) and SUN2 for immunofluorescence (ab124916, 1/500) were from Abcam. Antibodies against  $\beta$ -actin (A5316, 1/10 000) and  $\alpha$ -tubulin (T9026, 1/5000) were from Sigma-Aldrich. Cells were lysed directly in Laemli buffer for western blot (Tris- HCl pH 6,8 0,12 M, Glycerol 10%, Sodium Dodecyl Sulfate 5%,  $\beta$ -mercaptoethanol 2.5%, bromophenol blue 0.005%). Cells were arrested in prometaphase using *S*-trityl-L-cysteine (STC) (Sigma-Aldrich) (5  $\mu$ M; 16 hours) and harvested by mitotic shake-off. Cells were treated with Cycloheximide (CHX) (Sigma-Aldrich) to block protein synthesis for 12 hours at 50  $\mu$ g/mL.

**siRNA.** Cells were transfected using Lipofectamine® RNAiMAX (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions with the corresponding siRNA: *Silencer*™ Negative Control No. 1 siRNA (Ambion™ AM4611); siRNA targeting: SUN2 (rat) were from Invitrogen (Unc84bRSS342353); SUN2 (human) were from SIGMA (SASI Hs01\_00176980); SUN1 (human) were from SIGMA (SASI\_Hs01\_00032809); FHOD1 (human) were from eurogentec (AGA-CCA-GGA-CAU-GCU-GAA).

**Microscopy.** For phase-contrast microscopy, live-cell imaging was performed using a Zeiss AxioObserver Z1 (objective Plan-Neofluar 10x/0,3 Ph1 with CoolSnap CCD camera) equipped with a temperature- and CO<sub>2</sub>-controlled incubator box (37°C and 5% CO<sub>2</sub>) and an image was taken every 2 minutes.

Mitotic duration was measured as the elapsed time between the onset of rounding to the first image demonstrating cytokinesis and post-mitotic spreading. Live-cell confocal imaging was performed using a Spinning Disk Andromeda, TILL-FEI (EMCCD iXon 897 camera with Plan-Apochromat 20x/0,75, WD 610 objective) equipped with a temperature and CO<sub>2</sub>-controlled incubator box (37°C and 5% CO<sub>2</sub>). For SUN2 fluorescent intensity analysis, corrected total nuclear fluorescence (CTNF) was calculated following this formula:

CTNF= Integrated Density - (Area of nucleus x mean fluorescence of background readings).

Adhesion size and number were analyzed using the Focal Adhesion Analysis Server (<http://faas.bme.unc.edu/>)<sup>33</sup>.

**Atomic Force Microscopy.** An AFM (CellHesion module; JPK Instruments) mounted on an optical microscope (Olympus) was used to perform single cell force measurement. Experiments were conducted at 37°C using the PetriDishHeater system and DMEM medium buffered with 20 mM HEPES and complemented with 10% FBS. Tipless cantilevers (CSC37/tipless - Mikromasch) with a nominal force constant of 0.3 N m<sup>-1</sup> were used and were calibrated using the thermal noise method. Following an approach on the adjacent surface, the cantilever was positioned over the cell at 8 µm above the substrate. Force measurement was then recorded for 180 seconds at constant height.

**qPCR with reverse transcription.** Total RNA was purified from cells using TRIzol<sup>®</sup> Reagent (MAN0001271 Ambion<sup>™</sup>, Thermo Fisher Scientific) and RNAqueous-Micro kit (Ambion-Life technologies) according to the manufacturer's instructions. RNA (1 µg) was reverse-transcribed into cDNA. Quantitative real-time PCR was conducted on the 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) and TaqMan<sup>®</sup> primers/probes for *SUN2* : Rn01505183\_m1 ; *GAPDH* : Rn01775763\_g1 according to the manufacturer's recommendations. Expression data were normalized to a standard curve generated from a pool of control cells. *GAPDH* was used as the reference gene.



**Statistics.** Statistical analysis were performed using GraphPad Software. Data are presented as mean  $\pm$  s.e.m. Unpaired T-test has been used unless stated otherwise. No exclusion criteria were used. The numbers of independent experiments performed for all of the quantitative data are indicated in the figure legends.

**References**

1. Discher, D. E., Janmey, P. & Wang, Y.-L. Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate. *Science* **310**, 1139–1143 (2005).
2. DuFort, C. C., Paszek, M. J. & Weaver, V. M. Balancing forces: architectural control of mechanotransduction. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **12**, 308–319 (2011).
3. Maddox, A. S. & Burridge, K. RhoA is required for cortical retraction and rigidity during mitotic cell rounding. *J. Cell Biol.* **160**, 255–265 (2003).
4. Hoffman, B. D., Grashoff, C. & Schwartz, M. A. Dynamic molecular processes mediate cellular mechanotransduction. *Nature* **475**, 316–323 (2011).
5. Swift, J. *et al.* Nuclear lamin-A scales with tissue stiffness and enhances matrix-directed differentiation. *Science* **341**, 1240104 (2013).
6. Ungricht, R., Klann, M., Horvath, P. & Kutay, U. Diffusion and retention are major determinants of protein targeting to the inner nuclear membrane. *J. Cell Biol.* **209**, 687–703 (2015).
7. Lovett, D. B., Shekhar, N., Nickerson, J. A., Roux, K. J. & Lele, T. P. Modulation of Nuclear Shape by Substrate Rigidity. *Cell. Mol. Bioeng.* **6**, 230–238 (2013).
8. Dumont, S. & Mitchison, T. J. Force and length in the mitotic spindle. *Curr. Biol. CB* **19**, R749–761 (2009).
9. Prosser, S. L. & Pelletier, L. Mitotic spindle assembly in animal cells: a fine balancing act. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **18**, 187–201 (2017).
10. Kunda, P. & Baum, B. The actin cytoskeleton in spindle assembly and positioning. *Trends Cell Biol.* **19**, 174–179 (2009).
11. Ramkumar, N. & Baum, B. Coupling changes in cell shape to chromosome segregation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **17**, 511–521 (2016).

12. Stewart, M. P. *et al.* Hydrostatic pressure and the actomyosin cortex drive mitotic cell rounding. *Nature* **469**, 226–230 (2011).
13. Ramanathan, S. P. *et al.* Cdk1-dependent mitotic enrichment of cortical myosin II promotes cell rounding against confinement. *Nat. Cell Biol.* **17**, 148–159 (2015).
14. Chugh, P. *et al.* Actin cortex architecture regulates cell surface tension. *Nat. Cell Biol.* **19**, 689–697 (2017).
15. di Pietro, F., Echard, A. & Morin, X. Regulation of mitotic spindle orientation: an integrated view. *EMBO Rep.* **17**, 1106–1130 (2016).
16. Kunda, P., Pelling, A. E., Liu, T. & Baum, B. Moesin controls cortical rigidity, cell rounding, and spindle morphogenesis during mitosis. *Curr. Biol. CB* **18**, 91–101 (2008).
17. Carreno, S. *et al.* Moesin and its activating kinase Slik are required for cortical stability and microtubule organization in mitotic cells. *J. Cell Biol.* **180**, 739–746 (2008).
18. Machicoane, M. *et al.* SLK-dependent activation of ERMs controls LGN-NuMA localization and spindle orientation. *J. Cell Biol.* **205**, 791–799 (2014).
19. Théry, M. *et al.* The extracellular matrix guides the orientation of the cell division axis. *Nat. Cell Biol.* **7**, 947–953 (2005).
20. Gachet, Y., Tournier, S., Millar, J. B. & Hyams, J. S. A MAP kinase-dependent actin checkpoint ensures proper spindle orientation in fission yeast. *Nature* **412**, 352–355 (2001).
21. Meadows, J. C. & Millar, J. Latrunculin A Delays Anaphase Onset in Fission Yeast by Disrupting an Ase1-independent Pathway Controlling Mitotic Spindle Stability. *Mol. Biol. Cell* **19**, 3713–3723 (2008).
22. Turgay, Y. *et al.* SUN proteins facilitate the removal of membranes from chromatin during nuclear envelope breakdown. *J. Cell Biol.* **204**, 1099–1109 (2014).
23. Lei, K. *et al.* SUN1 and SUN2 play critical but partially redundant roles in anchoring nuclei in skeletal muscle cells in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 10207–10212 (2009).

24. Liu, Q. *et al.* Functional association of Sun1 with nuclear pore complexes. *J. Cell Biol.* **178**, 785–798 (2007).
25. Rosa, A., Vlassaks, E., Pichaud, F. & Baum, B. Ect2/Pbl acts via Rho and polarity proteins to direct the assembly of an isotropic actomyosin cortex upon mitotic entry. *Dev. Cell* **32**, 604–616 (2015).
26. Kutscheidt, S. *et al.* FHOD1 interaction with nesprin-2G mediates TAN line formation and nuclear movement. *Nat. Cell Biol.* **16**, 708–715 (2014).
27. Schwartz, C. *et al.* Lamins and nesprin-1 mediate inside-out mechanical coupling in muscle cell precursors through FHOD1. *Sci. Rep.* **7**, 1253 (2017).
28. Iskratsch, T. *et al.* FHOD1 is needed for directed forces and adhesion maturation during cell spreading and migration. *Dev. Cell* **27**, 545–559 (2013).
29. Gardberg, M. *et al.* FHOD1, a Formin Upregulated in Epithelial-Mesenchymal Transition, Participates in Cancer Cell Migration and Invasion. *PLOS ONE* **8**, e74923 (2013).
30. Peippo, M. *et al.* FHOD1 formin is upregulated in melanomas and modifies proliferation and tumor growth. *Exp. Cell Res.* **350**, 267–278 (2017).
31. Zlotek-Zlotkiewicz, E., Monnier, S., Cappello, G., Le Berre, M. & Piel, M. Optical volume and mass measurements show that mammalian cells swell during mitosis. *J. Cell Biol.* **211**, 765–774 (2015).
32. Lancaster, O. M. *et al.* Mitotic rounding alters cell geometry to ensure efficient bipolar spindle formation. *Dev. Cell* **25**, 270–283 (2013).
33. Berginski, M. E. & Gomez, S. M. The Focal Adhesion Analysis Server: a web tool for analyzing focal adhesion dynamics. *F1000Research* (2013). doi:10.12688/f1000research.2-68.v1

Figure 1

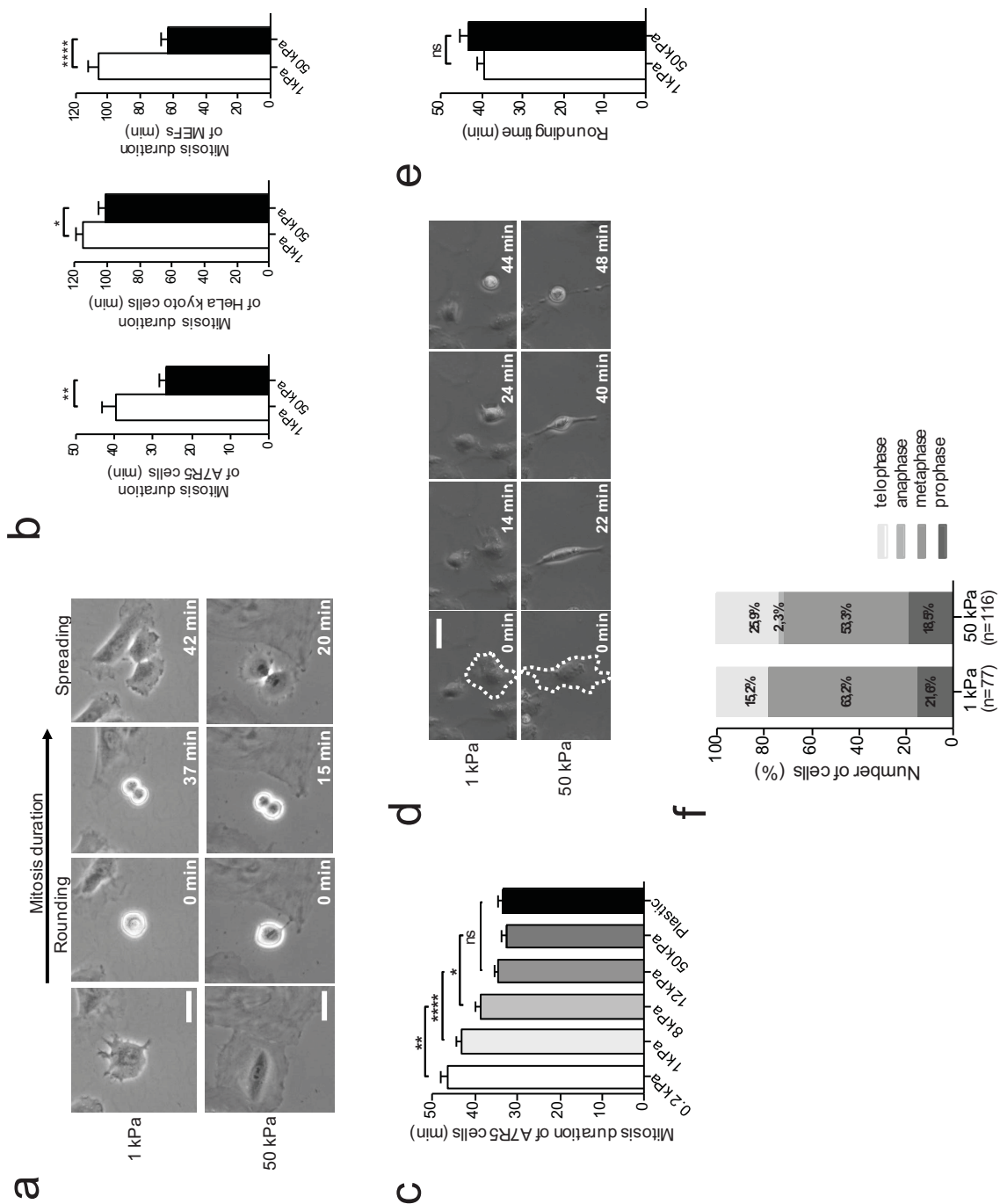


Figure 2

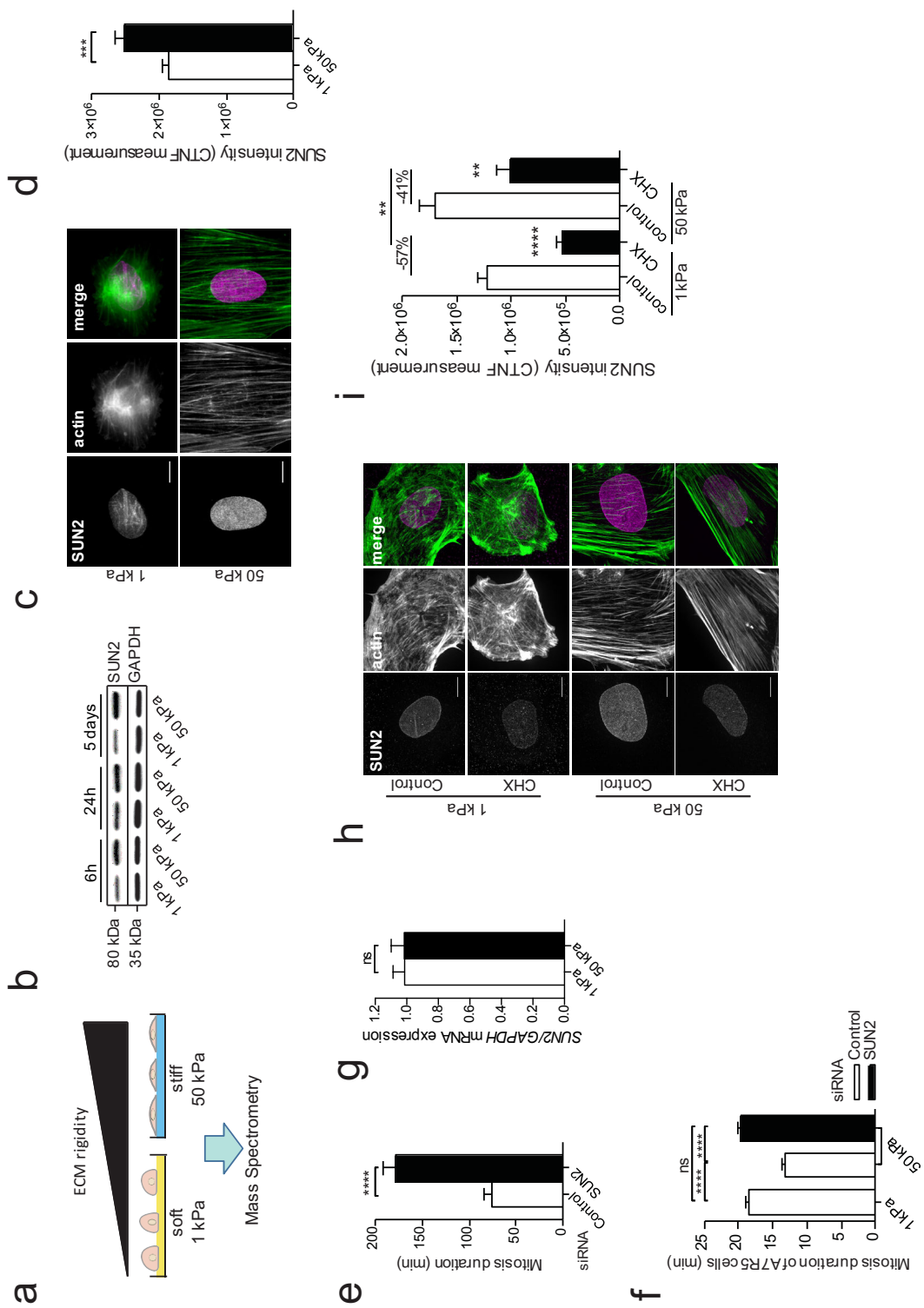


Figure 3

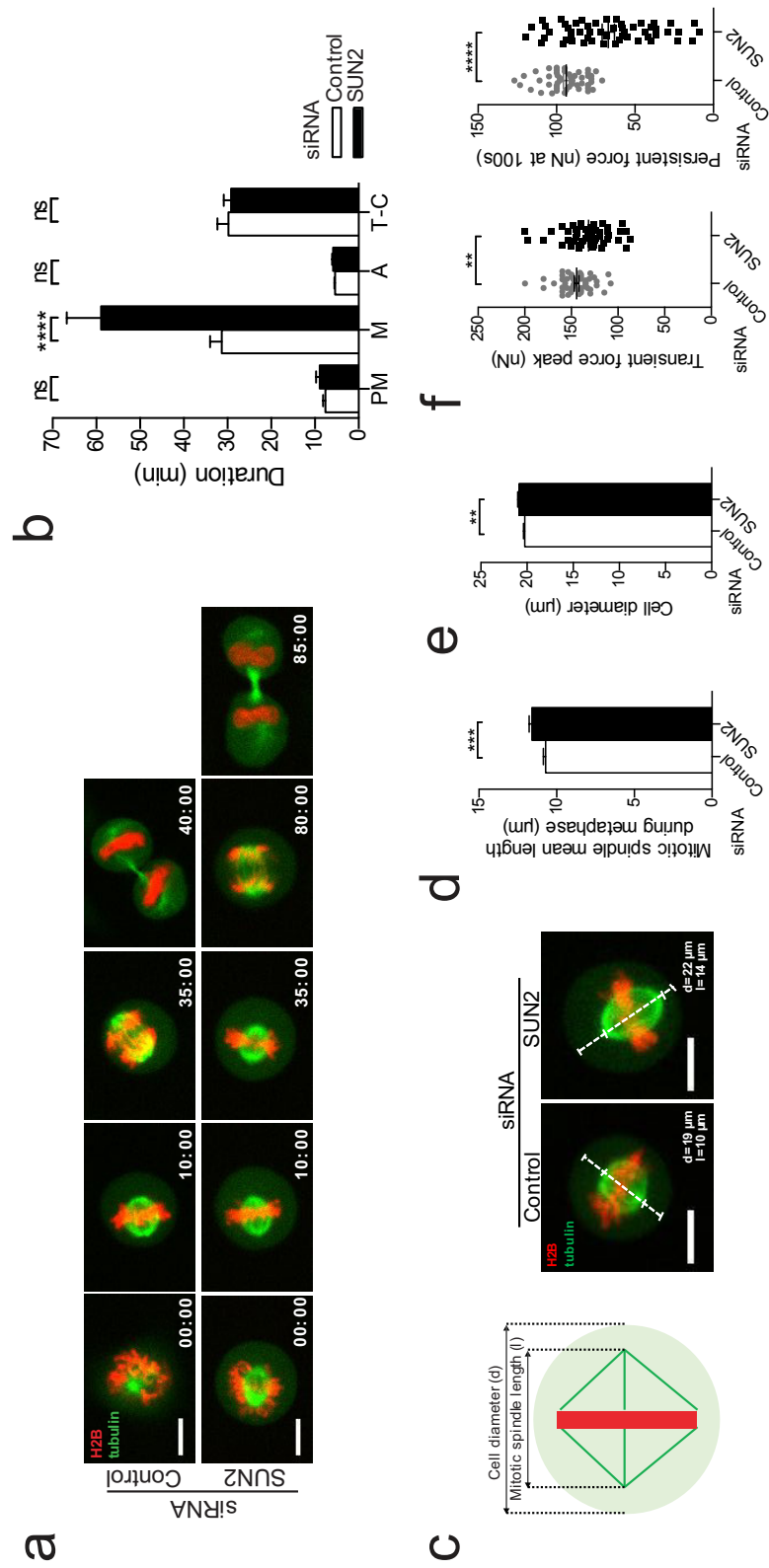
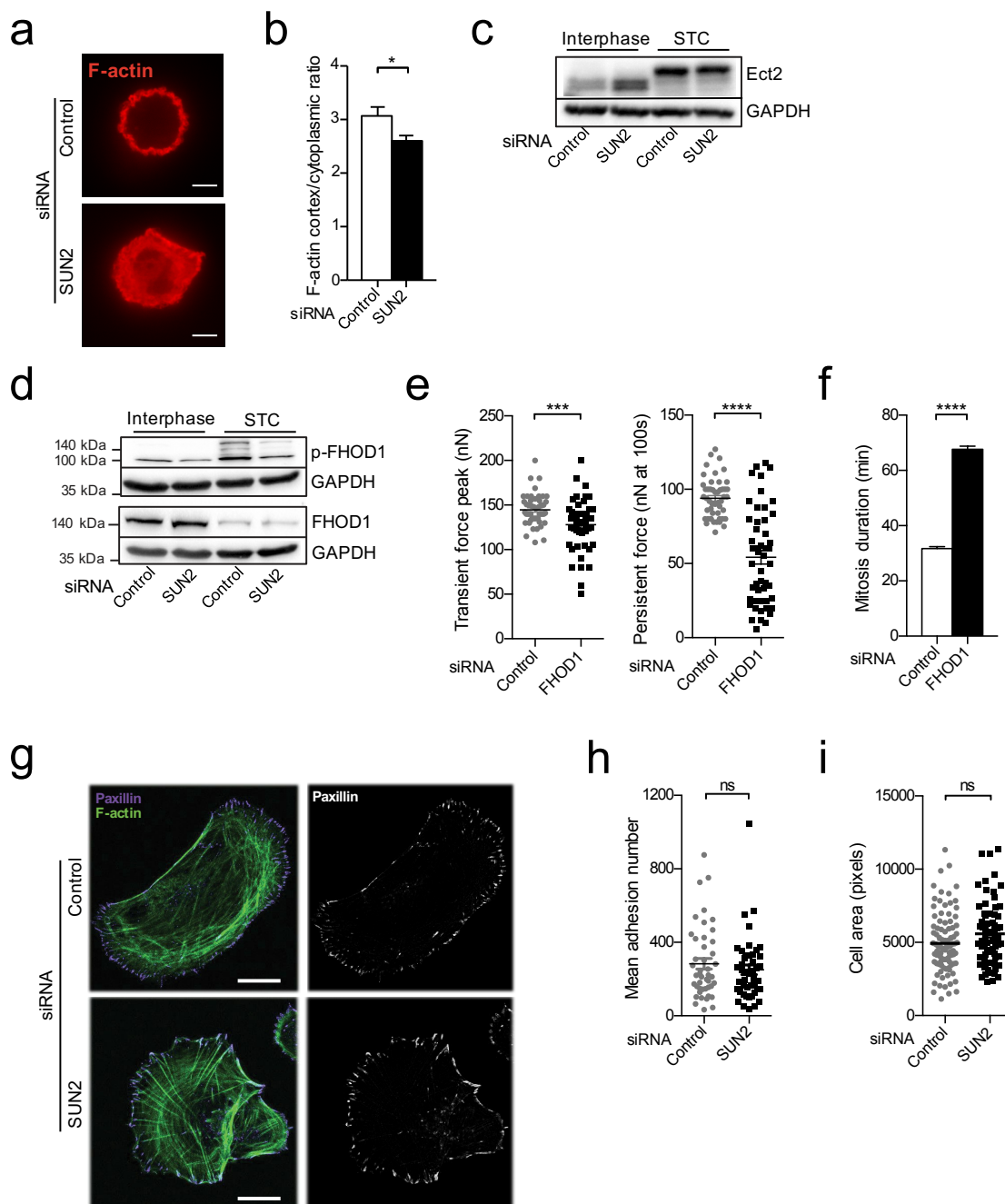


Figure 4





**Supplementary figures legends**

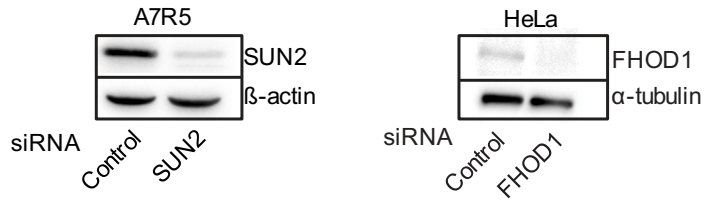
**Supplementary Figure 1** – (a) SUN2 and FHOD1 knockdown efficiency was assessed by western blot, here are shown two examples in A7R5 cells and HeLa cells respectively (b) HeLa cells depleted for SUN1 were cultured on plastic and mitosis duration was measured using phase-contrast microscopy (c) SUN2 degradation was analyzed by western blot in primary rat aortic smooth muscle cells cultured on soft (1 kPa) and stiff (50 kPa) substrates and treated with CHX (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) for 24 hours. Corresponding densitometric analysis representing SUN2 expression normalized to  $\beta$ -actin levels after CHX treatment (n=5 independent experiments; \*\*p<0,01 determined by Mann Whitney test).

**Supplementary Figure 2** – (a) Atomic force microscopy was used to measure force production of cells arrested in prometaphase using STC (5  $\mu\text{M}$ ). Following an approach on the adjacent surface of the cell, the cantilever was positioned over the cell at 8  $\mu\text{m}$  above the substrate. Force measurement was then recorded for 180 seconds at constant height (b) Curve depicting the vertical deflection of the cantilever (nN) according to time (seconds). Two major events were observed: an initial transient peak force that follows the cantilever approach and a persistent force that remains stable over minutes.

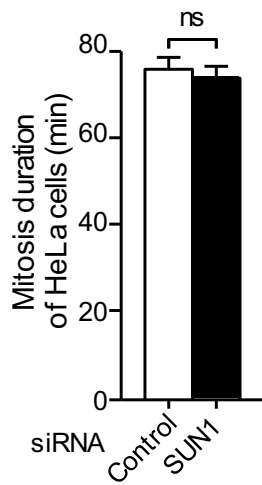
**Supplementary Figure 3** – (a) Rock activity assay was performed on HeLa cells transfected with control siRNA and depleted for SUN2 and treated with STC (5  $\mu\text{m}$ ) (b) A7R5 cells transfected with control siRNA or depleted for SUN2 were plated during 16 hours on coverslips coated with fibronectin (40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), were fixed, permeabilized and stained for paxillin and phosphorylated paxillin (Tyr118). Corresponding quantifications of adhesion number, length and area (n=18 cells for control siRNA and n=25 cells for SUN2 siRNA; ns: not significant determined by Mann Whitney test).

# Supplementary Fig. 1

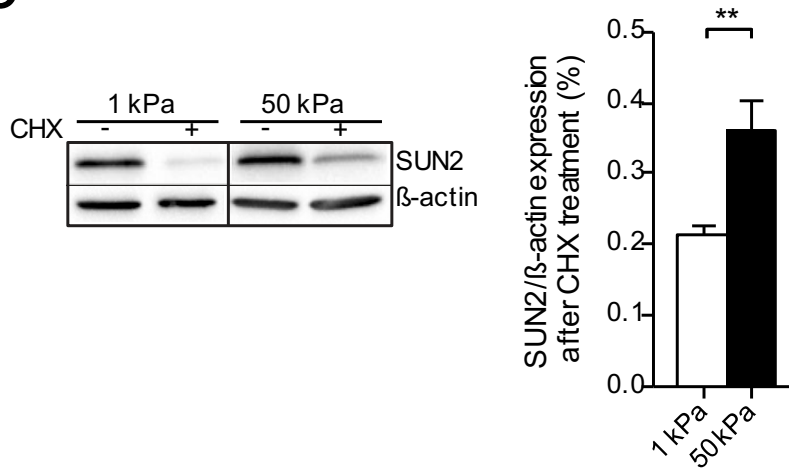
**a**



**b**

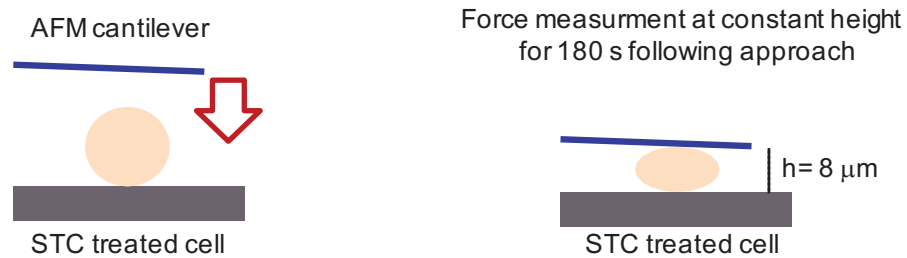


**c**

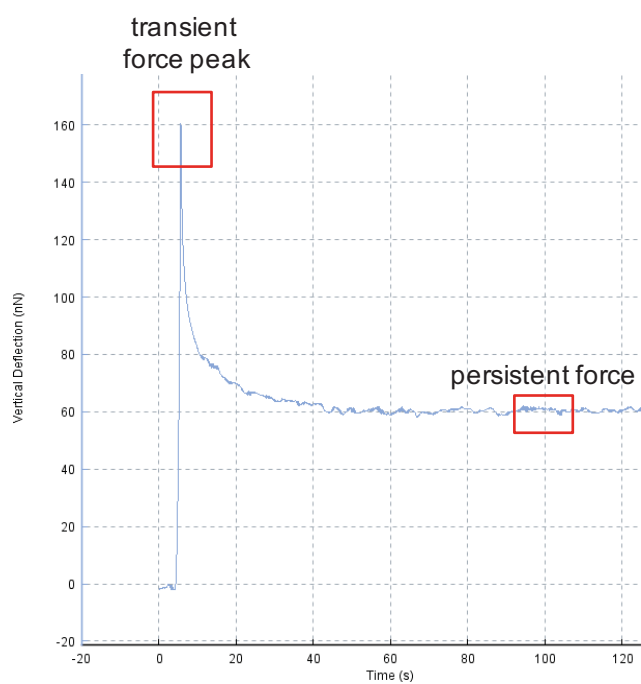


## Supplementary Fig. 2

a

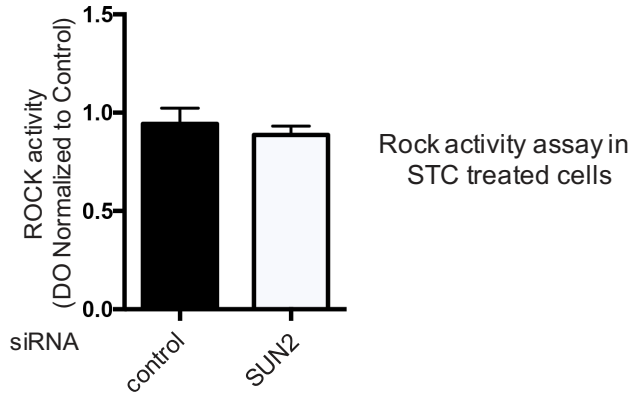


b

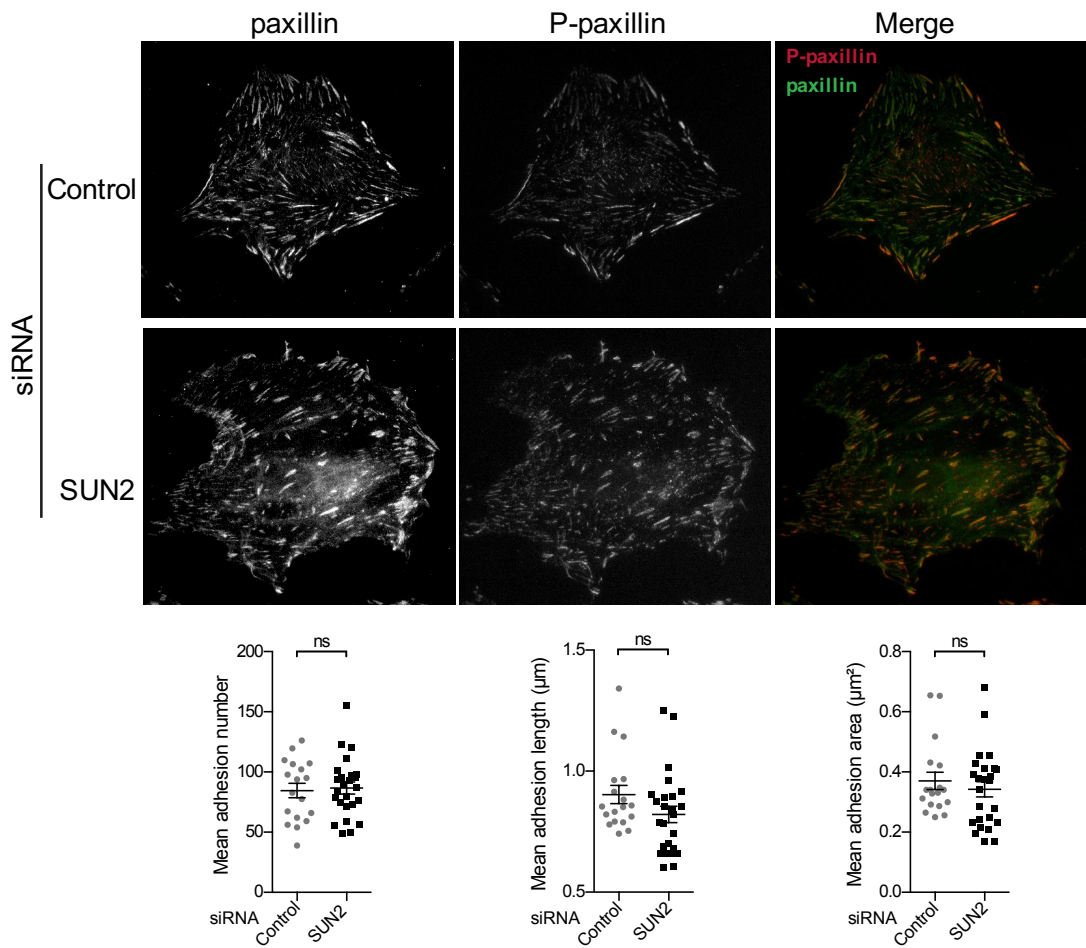


Supplementary Fig. 3

a



b



## ARTICLE n°3

### Analyzing Mechanotransduction Through the LINC Complex in Isolated Nuclei.

Belaadi N., Million-Frémillon A., Aureille J., Guilluy C.

Article publié dans Methods in molecular biology, 2018

#### Résumé

Les propriétés mécaniques du microenvironnement cellulaire peuvent impacter de nombreux aspects du comportement cellulaire, y compris les processus moléculaires dans le noyau. De récentes études indiquent que le complexe LINC et l'enveloppe nucléaire associé transmettent et transforment les signaux mécaniques en voies de signalisation biochimique, régulant finalement la structure nucléaire et l'expression de gènes. Ici nous décrivons une méthode pour appliquer des forces de tensions sur des complexes LINC de noyaux isolés. En utilisant des billes magnétiques et un aimant, cette technique peut être utilisée pour explorer les voies de signalisation biochimique qui sont activées en réponse à la tension appliquées à la surface de noyaux isolés.



# Chapter 7

## Analyzing Mechanotransduction Through the LINC Complex in Isolated Nuclei

Nejma Belaadi, Angélique Millon-Frémillon, Julien Aureille, and Christophe Guilluy

### Abstract

The mechanical properties of the cellular microenvironment can impact many aspects of cell behavior, including molecular processes in the nucleus. Recent studies indicate that the LINC complex and its associated nuclear envelope transmit and transduce mechanical stress into biochemical pathways that ultimately regulate nuclear structure or gene expression. Here we describe a method to apply tensional forces to the LINC complex of isolated nuclei. Using magnetic beads and magnets, this technique can be used to explore the biochemical pathways that are activated in response to tension applied to the surface of isolated nuclei.

**Key words** Mechanotransduction, Lamina, Nucleus, Mechanical tension, Nesprin

---

### 1 Introduction

Almost three centuries after the pioneering observations of the nucleus using light microscopy [1], electron microscopy images revealed that the nucleus is not isolated within the cell, but is connected to cytoskeletal filaments instead [2, 3]. The proteins that connect the cytoskeleton to the nuclear envelope constitute the linker of the nucleoskeleton and cytoskeleton (LINC) complex [4, 5]. This complex is composed of SUN (Sad1 and UNC-84) proteins anchored in the inner nuclear membrane and nesprin (nuclear envelope spectrin-repeat-containing proteins) anchored in the outer nuclear membrane [4, 6]. SUN proteins interact with nesprins within the perinuclear space through their highly conserved SUN (Sad1 UNC-84 homology) domain and KASH (Klarsicht, ANC-1, and Syne homology) domain, respectively [4].

The LINC complex constitutes a network of transmembrane proteins that transmit force between the cytoskeleton and the nuclear envelope [7, 8]. Using various techniques to apply mechanical stress to nuclei, recent work showed that mechanotransduction

mechanisms exist in the nucleus and transduce mechanical stress into signaling pathways that ultimately regulate nuclear structure or gene expression [9–12]. Interestingly, these recent advances revealed the LINC complex behaves like cell surface adhesion and undergoes remodeling in response to mechanical tension [8]. Here we describe a method that we designed to apply tensional forces to isolated nuclei using magnetic beads and magnets. This method is adapted from techniques that have been used to analyze the cellular response to forces applied to cell surface adhesion receptors [13–16].

In this protocol, tensional forces are applied to the LINC complex of isolated nuclei in order to mimic mechanical stress transmission from the cytoskeleton to the nucleus. This experimental system can be used to study either the mechanical response of isolated nuclei using magnetic tweezers or the force-dependent nuclear signaling pathways by various biochemical approaches. Another advantage of this method is the isolation of LINC complexes through a straightforward ligand affinity purification procedure. Here we detail the methods to isolate nuclei from HeLa cells and apply forces to nesprin-2 using magnetic beads. Additionally, we describe how to purify the LINC complex and analyze its protein composition following force application.

---

## 2 Materials

All solutions were prepared using ultrapure water, and common chemicals were from Sigma-Aldrich and Thermo Fisher Scientific.

### 2.1 Magnetic Bead Preparation

1. Magnetic beads: 2.8  $\mu\text{m}$  diameter M-280 tosyl-activated (Invitrogen, cat. no. 142.03).
2. Dynamag magnet separator (Thermo Fisher Scientific, cat. no. 12321D).
3. Buffer A: 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.4.
4. Buffer B: Combine 0.01 M sodium phosphate, pH 7.4, 0.0137 M NaCl, and 0.5% (w/v) delipidated BSA.
5. Nesprin-2 antibody (Abcam).
6. Phosphate-buffered saline (PBS): 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 1.8 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7.4.

### 2.2 Isolation of Nuclei

1. HeLa cells (ATCC, cat. no. CCL-2.1).
2. Medium: DMEM plus 10% fetal bovine serum.
3. Cell scraper.
4. Dounce homogenizer (7 mL capacity; Bellco, cat. no. 1984-10007).

5. Hypotonic buffer: 10 mM HEPES, pH 7.9, 1 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 mM dithiothreitol, and protease inhibitors (freshly added before use).
6. Buffer C: 20 mM HEPES, pH 7.8, 25 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.25 M sucrose, and 1 mM ATP (freshly added before use).

**2.3 Force  
Application with  
Magnetic Beads for  
Biochemical  
Measurements**

1. Poly-lysine-coated dishes (35 mm). To coat the dish, incubate with poly-L-lysine solution (Sigma, cat. no. P4707) 1 h in a 37 °C incubator, then remove the solution by vacuum aspiration, and allow surface to dry.
2. Isolated nuclei (as in Subheading 2.2).
3. Magnetic beads coated with anti-nesprin-2 or other nesprin antibodies (as in Subheading 2.1).
4. The magnets used to stimulate isolated nuclei with 30–40 pN force are the 1.25-in.-diameter × 0.25-in.-thick nickel-plated neodymium (grade N52) magnet (K&J Magnetics).
5. Buffer D: 20 mM HEPES, pH 7.8, 25 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, and 1 mM ATP (freshly added before use).
6. Lysis buffer: 20 mM Tris-HCl at pH 7.6, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, and protease inhibitors.
7. 2× SDS sample buffer: 0.125 M Tris-HCl (pH 6.8), 4% (wt/vol) SDS, 0.005% (wt/vol) bromophenol blue, 20% (vol/vol) β-mercaptoethanol (β-mercaptoethanol should be freshly added before use), 10% (vol/vol) glycerol.

---

## **3 Methods**

### **3.1 Magnetic Bead Conjugation**

1. Wash 90 μL of 2.8 μm tosyl-activated Dynabeads in 1 mL of buffer A in 1.5 mL microcentrifuge tube, and use the Dynamag magnet separator to collect the beads and aspirate the medium.
2. Mix 20 μg of anti-nesprin-2 antibody (Abcam) with appropriate volume of buffer B to bring the total volume to 200 μL and mix by pipetting (other antibodies targeting different isoforms of nesprin can be used here).
3. Combine antibody with beads, and incubate for 24 h at 37 °C on a rotor to allow covalent linkage of antibody to the bead.
4. Collect the beads using the magnetic separator (Dynamag).
5. Wash beads three times with 1 mL PBS using the magnetic separator to collect the beads.
6. Resuspend the beads in 1 mL PBS to give a concentration of  $6 \times 10^8$  beads/mL. Store beads at 4°C for up to 1 month (*see Note 1*).

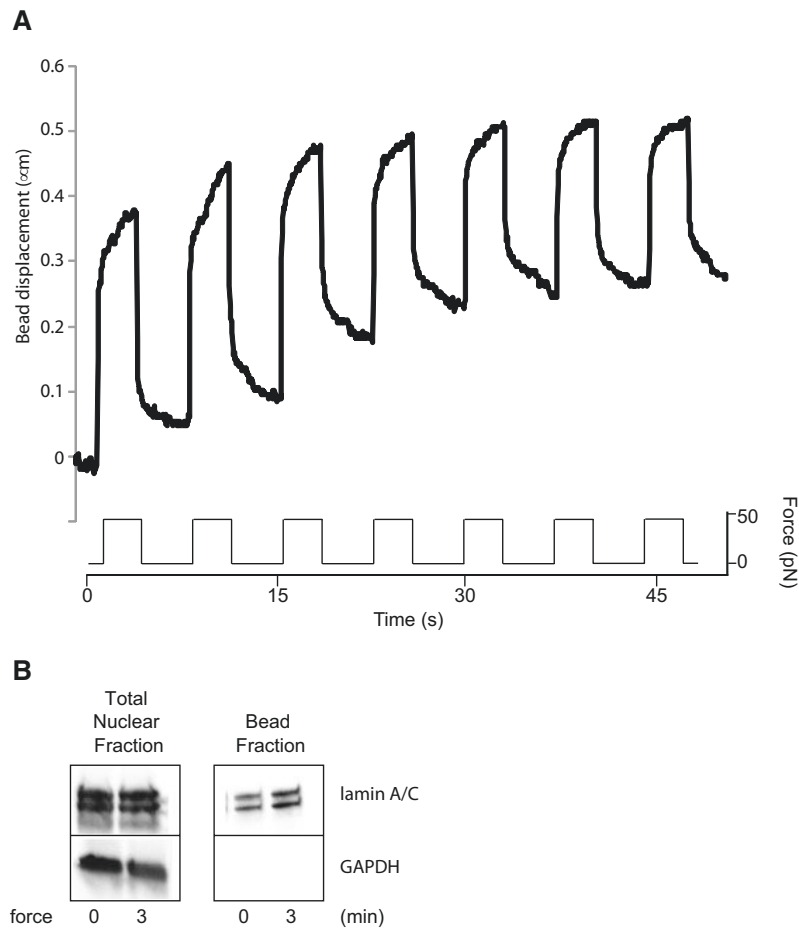


**3.2 Nuclei Isolation**

1. Use near-confluent HeLa cells plated on 150 mm dishes and serum starved with DMEM lacking serum for 16 h.
2. Aspirate the medium and wash two times with 10 mL PBS at 37 °C.
3. Aspirate the PBS.
4. Add ice-cold hypotonic buffer (6 mL), and detach the cell bodies using a cell scraper.
5. Homogenize the samples using 30 strokes of a Dounce homogenizer.
6. Transfer the sample to a 15 mL conical tube on ice. Incubate for 5 min on ice.
7. Centrifuge at  $700 \times g$  for 5 min at 4 °C.
8. Resuspend the pellet in hyponic buffer and centrifuge at  $700 \times g$  for 5 min at 4 °C.
9. Resuspend the nuclear pellet in buffer C (10 mL) and store on ice (*see Note 2*).
10. Following their isolation, the nuclei can be plated and stimulated in order to perform biochemical assay (as described below in Subheading 3.3) or force experiments using magnetic tweezers (*see Note 3*).

**3.3 Application of Tension to the LINC Complex Using Magnetic Beads and Permanent Magnets for Biochemical Analysis**

1. Plate  $10^6$  nuclei on poly-L-lysine-coated dishes (35 mm) for 30 min at 37 °C in 1 mL of buffer C.
2. Incubate nuclei with nesprin antibody-coated magnetic beads ( $2 \times 10^6$  beads per dish) at 37 °C for 20 min.
3. Wash twice with buffer C, and add 1 mL of buffer D for 15 min at 37 °C.
4. Stimulate with force by suspending the permanent magnet at 4.5 mm over nuclei (permanent magnet can be placed on the lid of the dish) for the appropriate amount of time (*see Notes 4 and 5*).
5. Aspirate buffer D.
6. Add 300  $\mu$ L of lysis buffer and use the cell scraper to detach the nuclei.
7. Collect the lysate in a 1.5 mL microcentrifuge tube and incubate on ice for 5 min.
8. Homogenize by pipetting and collect 50  $\mu$ L for total nuclear fraction.
9. Collect the beads using the magnetic separator.
10. Wash three times using lysis buffer.
11. Collect the beads using the magnetic separator, and add  $2 \times$  SDS sample buffer (50  $\mu$ L) to constitute the bead fraction (*see Note 6*).



**Fig. 1** Isolated nuclei respond to force applied to the LINC complex. **(A)** Typical displacement of a 2.8  $\mu\text{m}$  bead coated with anti-nesprin-2 antibody bound to an isolated nucleus during force pulse application. Stiffening is indicated by decreased displacement during later pulses. **(B)** Nuclei isolated from HeLa cells were incubated with anti-nesprin-2-coated magnetic beads. After stimulation with a permanent magnet for 3 min, the nuclei were lysed, and the protein complexes associated with the beads (bead complex) were isolated from the lysate using a magnetic separation stand, and both fractions were solubilized in SDS buffer and analyzed by Western blotting

12. Analyze the total nuclear fraction and bead fraction using Western blot (Fig. 1B) or mass spectrometry (*see Note 7*).

## 4 Notes

1. Beads can aggregate after conjugation. If vortexing is not sufficient to homogenize, beads separation can be achieved either by pipetting or by using sonication for a short period (20 s).
2. Depending on cell type, the nuclear fraction can be contaminated by cytosolic elements (tubulin), whose presence can be assessed using Western blot. If this is the case, the **steps 5–7** can be repeated.

3. For mechanical force experiments, the format of the slide or coverslip and volume of buffer depend on the magnetic tweezers set-up. Typically 10,000 nuclei are plated on a 12 mm diameter coverslip for 30 min at 37 °C in 0.5 mL of buffer C. The nuclei are then incubated with nesprin antibody-coated magnetic beads at 37 °C for 20 min. After two washes with buffer C, the appropriate volume of buffer D is added for 15 min at 37 °C. Magnetic tweezers can be used to apply pN tensional force to magnetic beads bound to nesprins. When coupled to live cell imaging, this experimental system allows the measurement of local viscoelastic properties by tracking the bead displacement due to a known force generated by the magnetic field from an electromagnetic pole tip. Figure 1A shows a representative bead displacement in response to constant force pulses of 50 pN.
4. The method described here uses a magnet for which the resulting force on a 2.8  $\mu\text{m}$  bead is about 30–40 pN (calculated by measuring the displacement of magnetic beads in undiluted glycerol, a Newtonian liquid with known viscosity); however, it is possible to use larger magnets to apply larger amount of force.
5. The magnets are extremely powerful and should be manipulated carefully.
6. The volume of SDS sample buffer added to the beads is only indicative and will depend on the cell type.
7. While exploring the tension-dependent signaling pathways, if no changes in the expected mechanosensing processes are detected, different possibilities can be considered. The duration of the stimulation with the magnet may not be sufficient and can be modulated (typical stimulation range from 1 to 10 min). The amount of force may not be sufficient and can be increased by using a thicker magnet (grade N52) or larger beads. To ensure that the LINC complex purification was efficient, Western blot can be used to probe for SUN proteins and/or nuclear envelope components. Additionally, analyzing lamin A/C recruitment to the LINC complex in response to force (using Western blot in Subheading 3.2) can be useful to determine if the force stimulation was sufficient.

---

## 5 Conclusion

Recent work shows that the nucleus may act as a mechanosensitive organelle, whose nucleoskeleton can dynamically remodel in response to mechanical stress. This dynamic reorganization hinges on nuclear mechanotransduction mechanisms, which are only beginning to be elucidated [8]. Various methods have been developed to manipulate and measure mechanical tension at the

molecular level, such as atomic force microscopy and molecular “tension sensors” [17]. Here we describe a method using magnetic beads and magnets to stimulate isolated nuclei with pN tensional forces and explore the force-dependent nuclear biochemical pathways.

This experimental system can be coupled with magnetic tweezers to explore the nuclear mechanical response to force of single isolated nucleus. Alternatively, a large numbers of isolated nuclei can be stimulated using a permanent magnet to yield sufficient material for biochemical or molecular biology assays. Additionally, this straightforward technique can allow LINC complex purification following force application. The purified LINC complex can then be used for various biochemical approaches, such as Western blot or kinase assays to investigate kinase activity in response to mechanical tension. This method is a simple way to explore the nuclear molecular mechanisms that are activated in response to mechanical tension and may help understanding how the mechanical properties of the cellular microenvironment regulate cell behavior.

---

## Acknowledgments

We thank Keith Burridge for his continuous support. C.G. is supported by grants from the Agence Nationale de la Recherche (ANR-13-JSVI-0008) and from European Research Council (ERC) under European Union’s Horizon 2020 research and innovation program (ERC Starting Grant n°639300).

## References

1. Pederson T (2011) The nucleus introduced. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3:a000521. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000521>
2. Capco DG, Wan KM, Penman S (1982) The nuclear matrix: three-dimensional architecture and protein composition. *Cell* 29:847–858
3. Lehto VP, Virtanen I, Kurki P (1978) Intermediate filaments anchor the nuclei in nuclear monolayers of cultured human fibroblasts. *Nature* 272:175–177
4. Crisp M, Liu Q, Roux K, Rattner JB, Shanahan C, Burke B, Stahl PD, Hodzic D (2006) Coupling of the nucleus and cytoplasm: role of the LINC complex. *J Cell Biol* 172:41–53. <https://doi.org/10.1083/jcb.200509124>
5. Chang W, Worman HJ, Gundersen GG (2015) Accessorizing and anchoring the LINC complex for multifunctionality. *J Cell Biol* 208:11–22. <https://doi.org/10.1083/jcb.201409047>
6. Gundersen GG, Worman HJ (2013) Nuclear positioning. *Cell* 152:1376–1389. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.02.031>
7. Maniotis AJ, Chen CS, Ingber DE (1997) Demonstration of mechanical connections between integrins, cytoskeletal filaments, and nucleoplasm that stabilize nuclear structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:849–854
8. Aureille J, Belaadi N, Guilluy C (2017) Mechanotransduction via the nuclear envelope: a distant reflection of the cell surface. *Curr Opin Cell Biol* 44:59–67. <https://doi.org/10.1016/j.ccb.2016.10.003>
9. Guilluy C, Osborne LD, Van Landeghem L, Sharek L, Superfine R, Garcia-Mata R, Burridge K (2014) Isolated nuclei adapt to force and reveal a mechanotransduction path-

- way in the nucleus. *Nat Cell Biol* 16:376–381. <https://doi.org/10.1038/ncb2927>
10. Swift J, Ivanovska IL, Buxboim A, Harada T, Dingal PCDP, Pinter J, Pajeroski JD, Spinler KR, Shin J-W, Tewari M, Rehfeldt F, Speicher DW, Discher DE (2013) Nuclear lamin-A scales with tissue stiffness and enhances matrix-directed differentiation. *Science* 341:1240104. <https://doi.org/10.1126/science.1240104>
  11. Enyedi B, Jelcic M, Niethammer P (2016) The cell nucleus serves as a mechanotransducer of tissue damage-induced inflammation. *Cell* 165:1160–1170. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.04.016>
  12. Kumar A, Mazzanti M, Mistrik M, Kosar M, Beznoussenko GV, Mironov AA, Garrè M, Parazzoli D, Shivashankar GV, Scita G, Bartek J, Foiani M (2014) ATR mediates a checkpoint at the nuclear envelope in response to mechanical stress. *Cell* 158:633–646. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.05.046>
  13. Marjoram RJ, Guilluy C, Burrridge K (2016) Using magnets and magnetic beads to dissect signaling pathways activated by mechanical tension applied to cells. *Methods San Diego Calif* 94:19–26. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2015.09.025>
  14. Zhao X-H, Laschinger C, Arora P, Szászi K, Kapus A, McCulloch CA (2007) Force activates smooth muscle alpha-actin promoter activity through the Rho signaling pathway. *J Cell Sci* 120:1801–1809. <https://doi.org/10.1242/jcs.001586>
  15. Guilluy C, Swaminathan V, Garcia-Mata R, O'Brien ET, Superfine R, Burrridge K (2011) The Rho GEFs LARG and GEF-H1 regulate the mechanical response to force on integrins. *Nat Cell Biol* 13:722–727. <https://doi.org/10.1038/ncb2254>
  16. Millon-Frémillon A, Aureille J, Guilluy C (2017) Analyzing cell surface adhesion remodeling in response to mechanical tension using magnetic beads. *J Vis Exp*. <https://doi.org/10.3791/55330>
  17. Arsenovic PT, Ramachandran I, Bathula K, Zhu R, Narang JD, Noll NA, Lemmon CA, Gundersen GG, Conway DE (2016) Nesprin-2G, a component of the nuclear LINC complex, is subject to myosin-dependent tension. *Biophys J* 110:34–43. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2015.11.014>

## ARTICLE n°4

### Analyzing Cell Surface Adhesion Remodeling in Response to Mechanical Tension Using Magnetic Beads.

Millon-Frémillon A.\* , Aureille J.\*, Guilluy C.  
(\* co-auteurs)

Article publié dans Journal of Visualized Experiments, 2017

#### Résumé :

Les complexes d'adhérence à la surface cellulaire permettent aux cellules de sentir les propriétés de leur environnement mécanique. De récentes études ont identifiées des protéines sensibles aux forces ainsi que des facteurs de transcription au niveau de ces sites d'adhérence. Cependant, le réseau de signalisation qui converti la tension mécanique en événement biochimique reste encore à déterminer. Pour explorer ces voies de signalisation activées en réponse à la tension appliquée sur les récepteurs de la surface cellulaire, des microbilles super paramagnétiques peuvent être utilisées. Nous présentons ici un protocole d'utilisation de ces microbilles pour appliquer des forces sur les protéines d'adhérence cellulaires. En utilisant cette approche, il est possible d'étudier les voies de signalisation dépendant de la force par des approches multiples de biochimie, mais également d'étudier les remodelages des adhérences grâce à l'isolation des complexes protéiques attaché aux microbilles. Ce protocole inclus la préparation de billes super paramagnétiques avec un ligand des intégrines, l'application d'une force de tension bien définie, ainsi que l'analyse biochimique. De plus, nous avons fournis des données issues d'échantillons représentatifs où la tension appliquée au niveau des adhérences entraîne un remodelage des adhérences et module la phosphorylation sur tyrosine.

Video Article

## Analyzing Cell Surface Adhesion Remodeling in Response to Mechanical Tension Using Magnetic Beads

Angélique Millon-Frémillon<sup>\*1</sup>, Julien Aureille<sup>\*1</sup>, Christophe Guilluy<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute for Advanced Biosciences, Centre de recherche UGA - INSERM U1209 - CNRS UMR

\*These authors contributed equally

Correspondence to: Angélique Millon-Frémillon at [angelique.stuani@inserm.fr](mailto:angelique.stuani@inserm.fr), Christophe Guilluy at [christophe.guilluy@inserm.fr](mailto:christophe.guilluy@inserm.fr)

URL: <https://www.jove.com/video/55330>

DOI: [doi:10.3791/55330](https://doi.org/10.3791/55330)

Keywords: Cellular Biology, Issue 121, Mechanotransduction, adhesion complex, magnetic beads, force, integrin, mechanical tension, extracellular matrix

Date Published: 3/8/2017

Citation: Millon-Frémillon, A., Aureille, J., Guilluy, C. Analyzing Cell Surface Adhesion Remodeling in Response to Mechanical Tension Using Magnetic Beads. *J. Vis. Exp.* (121), e55330, doi:10.3791/55330 (2017).

### Abstract

Mechanosensitive cell surface adhesion complexes allow cells to sense the mechanical properties of their surroundings. Recent studies have identified both force-sensing molecules at adhesion sites, and force-dependent transcription factors that regulate lineage-specific gene expression and drive phenotypic outputs. However, the signaling networks converting mechanical tension into biochemical pathways have remained elusive. To explore the signaling pathways engaged upon mechanical tension applied to cell surface receptor, superparamagnetic microbeads can be used. Here we present a protocol for using magnetic beads to apply forces to cell surface adhesion proteins. Using this approach, it is possible to investigate not only force-dependent cytoplasmic signaling pathways by various biochemical approaches, but also adhesion remodeling by magnetic isolation of adhesion complexes attached to the ligand-coated beads. This protocol includes the preparation of ligand-coated superparamagnetic beads, and the application of defined tensile forces followed by biochemical analyses. Additionally, we provide a representative sample of data demonstrating that tension applied to integrin-based adhesion triggers adhesion remodeling and alters protein tyrosine phosphorylation.

### Video Link

The video component of this article can be found at <https://www.jove.com/video/55330/>

### Introduction

In metazoa, mechanical tension directs tissue development and homeostasis through the regulation of a myriad of cellular processes such as proliferation, differentiation and survival<sup>1,2</sup>. Mechanical tension can arise from the extracellular matrix or can be generated by adherent cells, which sample their extracellular environment through the actomyosin contractile machinery that pulls onto extracellular matrix and probes its rigidity through tension-sensitive molecules. In response to tension, mechanosensitive adhesion proteins undergo conformational changes that trigger complex signaling cascades. In turn, these signaling pathways orchestrate a mechanoresponse encompassing proliferation, differentiation and survival that adjusts the cellular behavior to the extracellular environment. Such processes can be settled in a short-term time period (seconds to minutes) to quickly feed back onto the loop of mechanotransduction by modifying the mechanosensitive structures. For instance, integrin-based adhesions reinforce in response to tension through Rho GTPase-mediated cytoskeletal remodeling<sup>3,4,5</sup>. In parallel, other signaling pathways are activated over hours and days to control genetic programs that eventually impact cell fate<sup>6</sup>. Whereas, many studies have highlighted the effect of matrix stiffness on cell determinism and disease development<sup>1,2</sup>, the precise molecular mechanisms of adhesion-mediated mechanotransduction still remain elusive.

Various approaches have been developed to study the effects of cell-generated forces or external forces on cell behavior, including flow systems, fluorescence resonance energy transfer (FRET)-tension sensors<sup>7,8</sup>, compliant substrates<sup>9</sup>, magnetic tweezers, optical tweezers<sup>10</sup> and atomic force microscopy (AFM)<sup>11</sup>. Here we present a protocol using superparamagnetic beads to characterize mechanotransduction pathways in response to tensional forces applied to specific adhesion receptors. Superparamagnetic beads are particles that reversibly magnetize when placed in a magnetic field. Once coated with a ligand for a specific receptor, these beads provide a powerful tool to study the effects of extracellular force application. This method has been validated by several studies<sup>3,5,12-17</sup> and present the advantage to largely facilitate biochemical analysis on adherent cells. Using similar collagen-coated magnetic beads followed by biochemical analysis, early work reported an increase in protein tyrosine phosphorylation and RhoA activation in response to tension<sup>5,18,19</sup>. The method described below has also been used with fibronectin (FN)-coated beads to characterize the signaling pathways downstream from tension applied to integrins<sup>3</sup>. In this study, Guilluy et al. showed that tension activates RhoA through the recruitment of the two guanine nucleotide exchange factors (GEFs), LARG and GEF-H1, to integrin adhesion complexes. Since that, other studies have shown that GEF-H1 is recruited to adhesion complexes in response to cell-generated tension using different methods<sup>20,21</sup>, demonstrating the robustness of the methodology described here. As a result, activated RhoA was shown to promote adhesion reinforcement, through cytoskeletal remodeling. This system was also used to explore tension applied to cell/cell adhesion receptors. Application of forces onto magnetic beads coated with the extracellular domain of E-cadherin induced an increase in vinculin recruitment similarly to integrin associated adhesion complexes<sup>12</sup>. Collins and colleagues observed that application of tension to

PECAM-1 promotes integrin and RhoA activation<sup>13</sup>. Another experimental approach using magnetic beads is the study of tension applied to isolated nuclei. Using beads coated with antibodies against the nuclear envelope protein nesprin-1, nuclear envelope complexes were purified to show that they are dynamically regulated in response to mechanical tension<sup>22</sup>. These results support the powerfulness of this method in the study of mechanotransduction pathways. Moreover, while flow or traction force systems stimulate general cellular processes, magnetic beads specifically target a cell adhesion receptor by using either receptor ligands<sup>3</sup> or monoclonal antibodies against cell surface receptor<sup>13,15</sup>.

Another advantage of this method is the isolation of adhesion complexes through a straightforward ligand affinity purification procedure. It is well known that addition of ligand-coated beads to cells binds adhesion receptors and induces the recruitment of several adhesion proteins<sup>23</sup>. Further application of forces to ligand-coated magnetic beads turns these adhesion complexes into macromolecular platforms that mediate various tension-dependent signaling pathways<sup>4,24</sup>. Cell lysis followed by bead concentration using a magnet permits the isolation of the adhesion platforms. Other methods used to purify adhesion complexes have already been used in adherent cells. They combine chemical crosslinking to conserve protein-protein interactions and a cell lysis step by detergent and shear flow or sonication<sup>20,21,25,26,27,28</sup>. The final step is the collection of the resulting ventral plasma membranes containing the adhesion complexes. Unlike these methods, magnetic beads allow a greater purification level of cell adhesion complexes by selectively targeting a specific family of adhesion receptors. Magnetic beads have already been used to purify adhesion complexes in non-adherent cells attached to ligand-coated microbeads<sup>29,30</sup>. The method described below mimics biological situations where force is applied for a short sustained period (seconds to minutes). Therefore, it provides a powerful tool for investigating both the molecular composition of purified adhesion complexes and the downstream mechanosensitive-signaling pathways.

Here we present a detailed experimental protocol for using magnetic beads to apply tensional forces to adhesion surface proteins. A permanent neodymium magnet is placed on top of the culture dish surface. The pole face of the magnet is placed at a height of 6 mm so that the force on a single 2.8  $\mu\text{m}$  magnetic bead is constant (about 30-40 pN)<sup>31</sup>. The duration of tension stimulation is determined by the operator depending on the molecule of interest and its time-scale of activation. Cells are finally lysed, adhesion complexes are purified by beads separation using a magnet and biochemical analyses are processed. This protocol includes the preparation of ligand-coated superparamagnetic beads, and the application of tension through magnet followed by biochemical analyses. Additionally, we provide a representative sample of data demonstrating that tension applied to integrin-based adhesions induces adhesion remodeling and alters protein tyrosine phosphorylation.

## Protocol

### 1. Ligand Conjugation to Magnetic Beads

Note: Ligand conjugation is performed using superparamagnetic tosyl-activated beads with a 2.8  $\mu\text{m}$  diameter (stock solution concentration  $10^8$  beads/mL, 30 mg beads/mL). The following protocol is based on samples of approximately  $2 \times 10^5$  cells, which correspond to MRC-5 cells grown to 80% confluency in a 60 mm tissue culture plate. Adjust the volume of beads and reagents accordingly if using plates of different sizes or cells at different confluences. Use an amount of superparamagnetic beads in order to have 2 beads per cell. Therefore,  $4 \times 10^5$  beads are needed for a 60 mm plate.

1. Thoroughly resuspend the beads in the original vial by vortexing at least 30 s. Aliquot 40  $\mu\text{L}$  of the resuspended superparamagnetic beads (corresponding to  $4 \times 10^6$  beads) to 1.5 mL microcentrifuge tube.
2. **Place the tube on a magnetic separation stand in order to separate the magnetic beads from the solution. Discard the supernatant, remove tube from the magnetic separation stand and resuspend the beads in 1 mL 0.1 M Na-phosphate pH 7.4.**
  1. Repeat wash step twice with 1 mL 0.1 M Na-phosphate pH 7.4.
3. After the final wash, resuspend the beads in 1 mL 0.1 M Na-Phosphate pH 7.4.
4. Combine 100  $\mu\text{g}$  Bovine Fibronectin (FN) or any other cell adhesion receptor ligand to the 1 mL 0.1 M Na-phosphate pH 7.4 containing beads and mix by pipetting.
5. Repeat previous steps by replacing FN or any other specific ligand with BSA, poly-D-lysine or apo-transferrin for negative controls.
6. Optionally, for gel analysis, take a 10  $\mu\text{L}$  aliquot of ligand solution for analysis of crosslinking efficiency and mix with an appropriate volume of concentrated Laemmli Sample Buffer.
7. Incubate beads with the ligand containing solution for 12-24 h at 37 °C on a rotor.
8. If bead aggregates appear after the reaction has occurred, sonicate (continuous 39 W power) for no more than 10-20 s.
9. Isolate the beads using magnetic separation stand, aspirate the remaining solution and add 1 mL of PBS/0.2% BSA pH 7.6 solution. Incubate for 1 h on rotor at 37 °C.
10. Wash beads using a magnet twice with 1 mL PBS/0.2% BSA pH 7.6. Resuspend beads in 1 mL PBS/0.2% BSA pH 7.6.
11. Sonicate beads if aggregates appear for no more than 20-30 s.
12. Optionally, remove a 10  $\mu\text{L}$  aliquot to analyze coupling efficiency by western blot (mix with an appropriate volume of concentrated Laemmli Sample Buffer).
13. Proceed to cell assays or store beads at 4 °C for up to 1 month.
14. Optionally, run a SDS-PAGE gel and stain with Coomassie blue to analyze FN crosslinking to the magnetic beads.

### 2. Application of Tensional Forces on the Ligand-coated Beads Bound to Adhesion Receptors on the Dorsal Surface of Cells

1. Culture adherent cells on 60 mm tissue culture dish in appropriate growth medium (usually DMEM 4.5 g/L D-glucose supplemented with FCS 10%) until reaching 80% confluency.
2. Prepare non-denaturing non-ionic lysis buffer (20 mM Tris HCl pH 7.6, 150 mM NaCl, 2 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.1% NP-40) and chill microcentrifuge tubes.
3. Pellet the ligand-coated beads from section 1.10 and resuspend in 1 mL PBS/0.2% BSA pH 7.6. Add 100  $\mu\text{L}$  of the ligand-coated beads solution to 5 mL of warm culture medium and vortex.



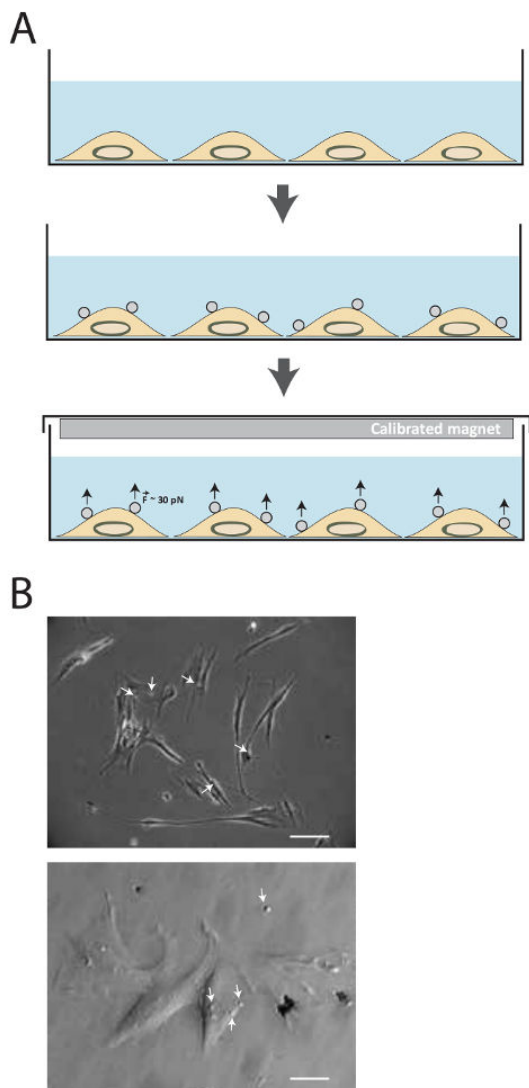
4. Aspirate medium in 60 mm culture dish and add 5 mL warm growth medium supplemented with beads.
5. Incubate for 20 min under cell culture conditions (37 °C and 5% CO<sub>2</sub>) to allow the beads to sediment and adhere to the cells. It is crucial to not exceed 20 min since beads may be internalized by phagocytosis.
6. Optionally, observe the beads under a light microscope using a 10X or 20X objective and check for bead adhesion by slightly shaking the dish to discriminate between attached and floating beads.
7. While keeping the culture dish in the incubator, swap the normal dish lid for a lid with a round 38 mm neodymium magnet attached on the upper face. The magnet is held in place by two smaller 13 mm neodymium magnets positioned on the lower face of the lid. Since the magnets are very powerful, manipulate them carefully.
8. Incubate cells subjected to tension for the desired time points at cell culture conditions (37 °C and 5% CO<sub>2</sub>).
9. After treatment, place dish on ice and carefully aspirate the entire medium from the dish.
10. Add 300  $\mu$ L of cell lysis buffer, and incubate for 10 min on ice. Collect the lysate using a cell scraper and transfer to a pre-chilled 1.5 mL microcentrifuge tube.
11. Pellet the magnetic beads using the magnetic separation stand and transfer the total cell lysate to a new pre-chilled 1.5 mL microcentrifuge tube. Store this fraction at -20 °C for further analysis.
12. Wash the beads 3 times with 1 mL ice-cold lysis buffer. Add 50  $\mu$ L Laemmli Sample buffer to the bead pellet, mix by pipetting and boil at 95 °C for 5 min using a dry block heater. This fraction contains the isolated adhesion complexes. Proceed to biochemical analysis or store at -20 °C.
13. From the total cell lysate obtained after beads separation (about 300  $\mu$ L), remove a 50  $\mu$ L aliquot for western blot analysis.  
NOTE: The 250  $\mu$ L left can be used for further biochemical studies such as protein-protein interaction studies (immunoprecipitation, GST pull-down assays) or GTPase activity experiments (changing the lysis buffer may be necessary depending on the GTPase of interest).

## Representative Results

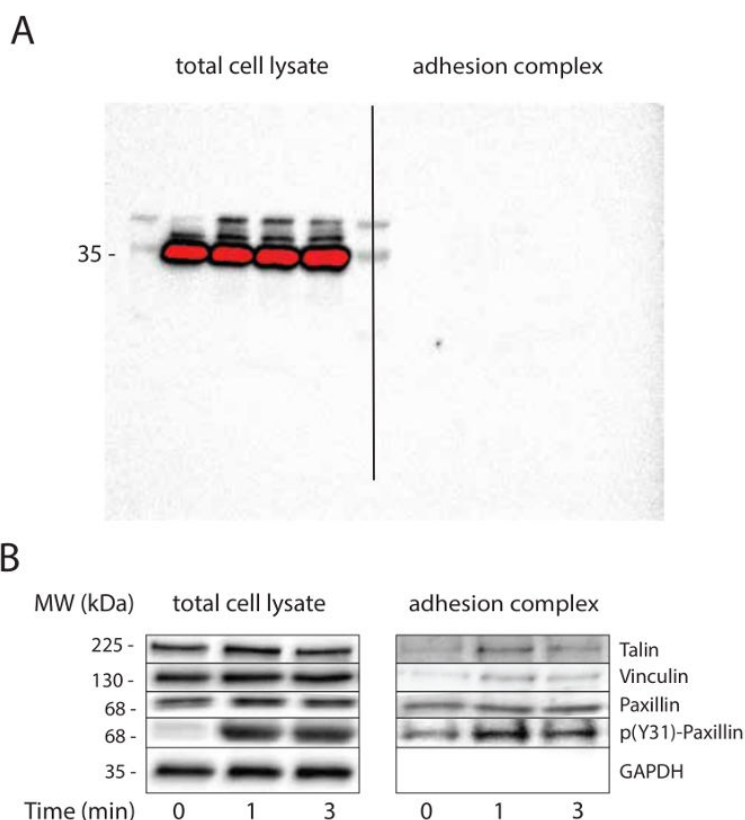
The schematic of the technique is illustrated in **Figure 1a**. Following ligand conjugation, magnetic beads are incubated with cells for 20 min, and then a permanent magnet is used to apply tensile forces of about 30-40 pN for various amount of time. **Figure 1b** shows 2.8  $\mu$ m FN-coated magnetic beads bound to MRC5 cell adhesion receptors.

The wash steps of superparamagnetic beads after cell lysis are crucial and determine the degree of purification. A minimum of three washes is recommended. GAPDH immunoblots with long exposures can be useful to test the purity of adhesion complexes (**Figure 2a**).

FN-coated beads were used to investigate the mechanotransduction processes that occur over time at the adhesion complexes in response to tension. After magnetic separation of the adhesion complex fraction, the lysate and the adhesion complex fraction were analyzed by western blot. As expected, we observed talin, vinculin and paxillin, but not GAPDH in the adhesion complexes fraction even in absence of mechanical stimulation (**Figure 2b**). Consistent with previous reports<sup>32,33</sup>, tension triggered vinculin recruitment to adhesion complexes. While tension did not affect paxillin recruitment to adhesion complexes, its phosphorylation on tyrosine 31 was enhanced in response to mechanical tension both in the total cell lysate and in the adhesion complex fraction.



**Figure 1. Description of the method.** (A) Schematic illustration of the technique. Cells are firstly cultured in medium culture until the desired confluency is reached. Then, superparamagnetic beads are added for 15-20 min. Tensional forces about 30-40 pN are then applied using the calibrated magnet for different amount of time. (B) Fibronectin-coated superparamagnetic beads bind to cell adhesion receptors. Cells are imaged by phase contrast in transmitted-light microscopy 15 min after adding the superparamagnetic beads (white arrow) in medium. (Top image: Scale bar= 25  $\mu\text{m}$ , bottom image: Scale bar = 100  $\mu\text{m}$ ) [Please click here to view a larger version of this figure.](#)



**Figure 2. Mechanical tension induces adhesion maturation.** (A) Purification of adhesion complexes. GAPDH immunoblotting is used as loading control for total cell lysate and to check the purity of adhesion complexes. The nitrocellulose membrane has been imaged using a long exposure to demonstrate the absence of signal in adhesion complex fraction. (B) Tension induces adhesion maturation. Loading control (GAPDH) and candidates (vinculin, talin and paxillin) known to be recruited or phosphorylated at adhesion complexes in response to mechanical tension are immunoblotted. This experiment has been performed on MRC5 cells. [Please click here to view a larger version of this figure.](#)

## Discussion

The method described here constitutes a straightforward approach to apply tension to cell surface adhesion receptors and allow their subsequent purification. However, some steps are critical to perform efficient adhesion purification and potential optimization can be done depending on the targeted adhesion receptors. We present potential issues the user may encounter below.

We used 2.8  $\mu\text{m}$  diameter magnetic beads but larger beads can be used such as 4.5  $\mu\text{m}$  diameter. However, bead diameter should be restricted to 2-5  $\mu\text{m}$  since phagocytosis might occur more quickly during 30-60 min incubation and larger beads have stronger adhesion so that bead displacement would be restricted under magnetic field<sup>34,35</sup>. Therefore, it is important to limit incubation time to short periods and use the proper bead size. The number of beads incubated per cell will impact the amount of force experience by a single cell. While one wants to efficiently stimulate cells with tension, too many beads per cell can lead to activation of irrelevant signaling pathways. We usually incubate an average of two beads per cell for FN-coated beads, but this quantity can be adjusted [1 to 5 beads per cell] depending on the cell type and the cell surface receptor. Regarding the magnet, the method described here used a magnet for which the resulting force on a 2.8  $\mu\text{m}$  has been measured (about 30-40 pN by measuring the displacement of magnetic beads in undiluted glycerol, a Newtonian liquid with known viscosity<sup>31</sup>, although it is possible to use larger magnets to apply larger amount of force if necessary. It is important to note that these magnets are extremely powerful and to manipulate them carefully.

After 12-24 h incubation with ECM ligand (step 1.7) as well as after 1 h incubation (step 1.9) with PBS/0.2% BSA pH 7.6 buffer, the magnetic microbeads might form aggregates. It is then critical to separate beads as much as possible to respect the ratio of 2 beads per cell. However, it is still acceptable to have a 5:1 ratio. Beads separation can be achieved either by mixing and pipetting or by using sonication, although for a short period (20-30 s).

Various proteins can be conjugated to the beads, including integrin ligand (FN, collagen), recombinant proteins or antibodies targeting specific cell surface receptors. The attachment of ligand-coated magnetic beads to the dorsal cell surface might be weakened by the low coupling

efficiency of the ligand onto the beads. It is recommended to check for ligand binding to the beads by collecting an aliquot of the diluted ligand solution before adding to the beads and an aliquot of beads at the end of the coupling process. These aliquots can be processed to SDS-PAGE analysis and Coomassie blue staining.

If no changes in signaling pathways or expected mechanosensing processes are detected, it is important to consider different possibilities. One way to identify the issue is to modulate the duration of the experiment with the magnet. It is well known that the velocity of cellular processes varies depending on the cell type used. Another option would be to test known tension-sensitive molecules and check for their post translational modifications by western blotting (for instance paxillin phosphorylation or FAK phosphorylation can be analyzed). The amount of force may be also critical and using a thicker magnet (same grade N52) or larger beads can be an option. Additionally, ligand/receptor binding efficiency can be explored by analyzing adhesion complex and look for cell surface receptors (such as cadherin or integrin). The cell confluency can also affect the cellular response to tension. As it has been observed that cell/cell adhesion can affect cell behavior and cytoskeletal prestress, it is important to note that the confluency may affect the cellular response to tension. Even though we recommend 80% confluency for application of tension to integrin-based adhesions, different conditions may be tested in order to optimize the experimental system.

Although this method provides a powerful tool to decipher the tension sensitive adhesome as well as the associated signaling pathways, it also had some limitations. First, since the main concern using such small size magnetic beads is the risk of their internalization by the cells, this method cannot be used for studying long-term mechanosensitive signaling cellular responses that modify cell fate such as differentiation and proliferation. Another limitation lies in the way of how forces are applied to the layer of cells in the culture plate. Indeed, since the magnetic field is always higher at the periphery of the magnet, forces could vary at the surface of the culture plate with a decreasing gradient of cell stretching from the periphery to the center and might lead to heterogeneous cellular responses.

The procedure described here constitutes a straightforward and cost effective method that allows studying mechanosensitive cellular pathways as well as investigating the molecular composition of adhesion complexes subjected to tension. Other approaches, such as stretching device that apply cyclic strain to cells, lead to the application of tension to all cell surface receptors interacting with the extracellular matrix. The method described here has the advantage of enabling force stimulation of a specific subset of cell surface receptors and a large variety of ligands can be used, such as integrin ligands or antibodies targeting cell surface receptors, allowing the study of many distinct mechanosensitive systems. Another advantage of this method is that it leads to the purification of the proteins complexes that experienced tension and to work on loadbearing elements which are known to play a central role in mechanotransduction<sup>36</sup>. The purified adhesion complex can also be used for various biochemical approaches<sup>14</sup>, such as kinase assays to investigate kinase activity in response to tension, or actin polymerization assay. Additionally, this experimental system can be coupled with magnetic tweezers to explore the cellular mechanical response and to correlate this response with the identified signaling pathways. Interestingly, magnetoplasmonic nanoparticles have been used recently to mechanically load Notch and E-cadherin with precise control in time and space<sup>37</sup>. This recent development may help exploring mechanosensitive signaling pathways with different spatial, temporal and mechanical inputs.

## Disclosures

The authors declare no competing financial interests.

## Acknowledgements

C.G. is supported by grants from the Agence National de la Recherche (ANR-13-JSV1-0008), from the European Union Seventh Framework Programme (Marie Curie Career Integration n° 8304162) and from European Research Council (ERC) under European Union's Horizon 2020 research and innovation program (ERC Starting Grant n° 639300).

## References

1. Discher, D. E., Janmey, P., & Wang, Y.-L. Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate. *Science (New York, N.Y.)*. **310** (5751), 1139-1143 (2005).
2. DuFort, C. C., Paszek, M. J., & Weaver, V. M. Balancing forces: architectural control of mechanotransduction. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **12** (5), 308-319 (2011).
3. Guilly, C., et al. The Rho GEFs LARG and GEF-H1 regulate the mechanical response to force on integrins. *Nat Cell Biol.* **13** (6), 722-727 (2011).
4. Matthews, B. D., Overby, D. R., Mannix, R., & Ingber, D. E. Cellular adaptation to mechanical stress: role of integrins, Rho, cytoskeletal tension and mechanosensitive ion channels. *J Cell Sci.* **119** (3), 508-518 (2006).
5. Zhao, X.-H., et al. Force activates smooth muscle alpha-actin promoter activity through the Rho signaling pathway. *J Cell Sci.* **120** (Pt 10), 1801-1809 (2007).
6. Engler, A. J., Sen, S., Sweeney, H. L., & Discher, D. E. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell.* **126** (4), 677-689 (2006).
7. Austen, K., Kluger, C., Freikamp, A., Chrostek-Grashoff, A., & Grashoff, C. Generation and analysis of biosensors to measure mechanical forces within cells. *Meth Mol Biol.* **1066**, 169-184 (2013).
8. Grashoff, C., et al. Measuring mechanical tension across vinculin reveals regulation of focal adhesion dynamics. *Nature.* **466** (7303), 263-266 (2010).
9. Pelham, R. J., & Wang, Y. I Cell locomotion and focal adhesions are regulated by substrate flexibility. *Proc Natl Acad Sci USA.* **94** (25), 13661-13665 (1997).
10. Choquet, D., Felsenfeld, D. P., & Sheetz, M. P. Extracellular matrix rigidity causes strengthening of integrin-cytoskeleton linkages. *Cell.* **88** (1), 39-48 (1997).
11. Chaudhuri, O., Parekh, S. H., Lam, W. A., & Fletcher, D. A. Combined atomic force microscopy and side-view optical imaging for mechanical studies of cells. *Nat Meth.* **6** (5), 383-387 (2009).

12. Bays, J. L., *et al.* Vinculin phosphorylation differentially regulates mechanotransduction at cell-cell and cell-matrix adhesions. *J Cell Biol.* **205** (2), 251-263 (2014).
13. Collins, C., *et al.* Localized tensional forces on PECAM-1 elicit a global mechanotransduction response via the integrin-RhoA pathway. *Curr Biol.* **22** (22), 2087-2094 (2012).
14. Gordon, W. R., *et al.* Mechanical Allostery: Evidence for a Force Requirement in the Proteolytic Activation of Notch. *Dev Cell.* **33** (6), 729-736 (2015).
15. Lessey-Morillon, E. C., *et al.* The RhoA guanine nucleotide exchange factor, LARG, mediates ICAM-1-dependent mechanotransduction in endothelial cells to stimulate transendothelial migration. *J Immunol.* **192** (7), 3390-3398 (2014).
16. Osborne, L. D., *et al.* TGF- $\beta$  regulates LARG and GEF-H1 during EMT to affect stiffening response to force and cell invasion. *Mol Biol Cell.* **25** (22), 3528-3540 (2014).
17. Scott, D. W., Tolbert, C. E., & Burridge, K. Tension on JAM-A activates RhoA via GEF-H1 and p115 RhoGEF. *Mol Biol Cell.* **27** (9), 1420-1430 (2016).
18. Glogauer, M., Ferrier, J., & McCulloch, C. A. Magnetic fields applied to collagen-coated ferric oxide beads induce stretch-activated Ca<sup>2+</sup> flux in fibroblasts. *Am J Physiol - Cell Physiol.* **269** (5), C1093-C1104 (1995).
19. Glogauer, M., *et al.* Calcium ions and tyrosine phosphorylation interact coordinately with actin to regulate cytoprotective responses to stretching. *J Cell Sci.* **110** (Pt 1), 11-21 (1997).
20. Kuo, J.-C., Han, X., Hsiao, C.-T., Yates, J. R., & Waterman, C. M. Analysis of the myosin-II-responsive focal adhesion proteome reveals a role for  $\beta$ -Pix in negative regulation of focal adhesion maturation. *Nat Cell Biol.* **13** (4), 383-393 (2011).
21. Schiller, H. B., *et al.*  $\beta$ 1- and  $\alpha$ v-class integrins cooperate to regulate myosin II during rigidity sensing of fibronectin-based microenvironments. *Nat Cell Biol.* **15** (6), 625-636 (2013).
22. Guilluy, C., *et al.* Isolated nuclei adapt to force and reveal a mechanotransduction pathway in the nucleus. *Nat Cell Biol.* **16** (4), 376-381 (2014).
23. Plopper, G. E., McNamee, H. P., Dike, L. E., Bojanowski, K., & Ingber, D. E. Convergence of integrin and growth factor receptor signaling pathways within the focal adhesion complex. *Mol Biol Cell.* **6** (10), 1349-1365 (1995).
24. Roca-Cusachs, P., Gauthier, N. C., Del Rio, A., & Sheetz, M. P. Clustering of  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 integrins determines adhesion strength whereas  $\alpha$ 5 $\beta$ 3 integrins enable mechanotransduction. *Proc Natl Acad Sci USA.* **106** (38), 16245-16250 (2009).
25. Ajeian, J. N., *et al.* Proteomic analysis of integrin-associated complexes from mesenchymal stem cells. *Proteomics Clin Appl.* **10** (1), 51-57 (2016).
26. Horton, E.R., Astudillo, P., Humphries, M.J., Humphries, J.D. Mechanosensitivity of integrin adhesion complexes: Role of the consensus adhesome. *Exp Cell Res.* (2015).
27. Jones, M. C., *et al.* Isolation of integrin-based adhesion complexes. *Curr Protoc in Cell Biol / Editorial Board, Juan S. Bonifacino ... [et Al.]*. **66**, 9.8.1-15 (2015).
28. Ng, D. H. J., Humphries, J. D., Byron, A., Millon-Frémillon, A., & Humphries, M. J. Microtubule-dependent modulation of adhesion complex composition. *PLoS One.* **9** (12), e115213 (2014).
29. Byron, A., Humphries, J. D., Bass, M. D., Knight, D., & Humphries, M. J. Proteomic analysis of integrin adhesion complexes. *Sci Sign.* **4** (167), pt2 (2011).
30. Byron, A., Humphries, J. D., Craig, S. E., Knight, D., & Humphries, M. J. Proteomic analysis of  $\alpha$ 4 $\beta$ 1 integrin adhesion complexes reveals  $\alpha$ -subunit-dependent protein recruitment. *Proteomics.* **12** (13), 2107-2114 (2012).
31. Marjoram, R. J., Guilluy, C., & Burridge, K. Using magnets and magnetic beads to dissect signaling pathways activated by mechanical tension applied to cells. *Methods (San Diego, Calif.)*. (2015).
32. Pasapera, A. M., Schneider, I. C., Rericha, E., Schlaepfer, D. D., & Waterman, C. M. Myosin II activity regulates vinculin recruitment to focal adhesions through FAK-mediated paxillin phosphorylation. *J Cell Biol.* **188** (6), 877-890 (2010).
33. Sawada, Y., & Sheetz, M. P. Force transduction by Triton cytoskeletons. *J Cell Biol.* **156** (4), 609-615 (2002).
34. Grinnell, F., & Geiger, B. Interaction of fibronectin-coated beads with attached and spread fibroblasts. Binding, phagocytosis, and cytoskeletal reorganization. *Exp Cell Res.* **162** (2), 449-461 (1986).
35. Schroeder, F., & Kinden, D. A. Measurement of phagocytosis using fluorescent latex beads. *J Biochem Biophys Meth.* **8** (1), 15-27 (1983).
36. Hoffman, B. D., Grashoff, C., & Schwartz, M. A. Dynamic molecular processes mediate cellular mechanotransduction. *Nature.* **475** (7356), 316-323 (2011).
37. Seo, D., *et al.* A Mechanogenetic Toolkit for Interrogating Cell Signaling in Space and Time. *Cell.* **165** (6), 1507-1518 (2016).

## REVUE n°1

### **Mechanotransduction via the nuclear envelope a distant reflection of the cell surface.**

Julien Aureille, Nėjma Belaadi and Christophe Guilluy

Article publié dans Current Opinion in Cell Biology, 2016

#### **Résumé :**

En tant qu'organite le plus gros et le plus rigide de la cellule, le noyau peut être soumis à d'importantes forces générées par le cytosquelette pour ajuster sa forme et sa position et s'adapter à la machinerie cellulaire durant la migration, la différenciation ou la division. Comme il l'a été anticipé, de récents travaux ont montrés que des mécanismes sensibles aux forces sont présent dans le noyau et régulent sa structure et sa fonction en réponse aux forces mécaniques. Bien que les mécanismes moléculaires responsables de cette réponse commencent seulement à être élucidés, l'enveloppe nucléaire semble jouer un rôle central dans ce processus. Ici, nous passons en revue ces mécanismes moléculaires, et mettons en avant leurs homologues de fonction avec ceux localisés au niveau de la surface cellulaire. De plus, nous discutons des fonctionnements de ces mécanismes de l'enveloppe nucléaire au cours de l'adhérence et de la migration, et de leur participation à l'organisation du cytosquelette par contacts physiques ou par la régulation d'évènements de signalisation.



ELSEVIER

Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

ScienceDirect

Current Opinion in  
Cell Biology

## Mechanotransduction via the nuclear envelope: a distant reflection of the cell surface

Julien Aureille<sup>1</sup>, Néjma Belaadi<sup>2</sup> and Christophe Guilluy<sup>1</sup>

As the largest and stiffest organelle in the cell, the nucleus can be subjected to significant forces generated by the cytoskeleton to adjust its shape and position, and accommodate the cellular machinery during cell migration, differentiation or division. As it was anticipated, recent work showed that mechanosensitive mechanisms exist in the nucleus and regulate its structure and function in response to mechanical force. While the molecular mechanisms that mediate this response are only beginning to be elucidated, the nuclear envelope seems to play a central role in this process. Here, we review these nuclear mechanosensitive mechanisms and highlight their functional homology with those located at the cell surface. Additionally, we discuss how these nuclear envelope mechanisms function during adhesion and migration, and how they participate in cytoskeletal organization, via direct physical contact or signaling event regulation.

### Addresses

<sup>1</sup> Institute for Advanced Biosciences, Inserm U1209, CNRS UMR 5309, Université Grenoble Alpes, 38000 Grenoble, France

<sup>2</sup> Institut du thorax, Inserm, CNRS, université de Nantes, 44000 Nantes, France

Corresponding author: Guilluy, Christophe ([christophe.guilluy@inserm.fr](mailto:christophe.guilluy@inserm.fr))

Current Opinion in Cell Biology 2016, 44:xx–yy

This review comes from a themed issue on **Cell architecture**

Edited by **Terry Lechler** and **Rafael Carazo Salas**

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ceb.2016.10.003>

0955-0674/© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### Introduction

Whenever cells adhere, divide or undergo differentiation, they adjust their architecture to accommodate the cellular machinery accordingly to these tasks. This constant reorganization of the cell interior is directed by cytoskeletal remodeling and molecular motor-generated forces, whose coordinated action hinges on mechanosensitive signaling pathways [1,2]. Force-dependent mechanisms that reinforce, repair or disassemble subcellular loadbearing structures maintain cell integrity while operating its reorganization [2]. In this context, the nucleus as the largest and stiffest organelle in the cell constitutes a major hindrance to cell reorganization and significant mechanical

stress is applied to drive changes in nuclear shape and position.

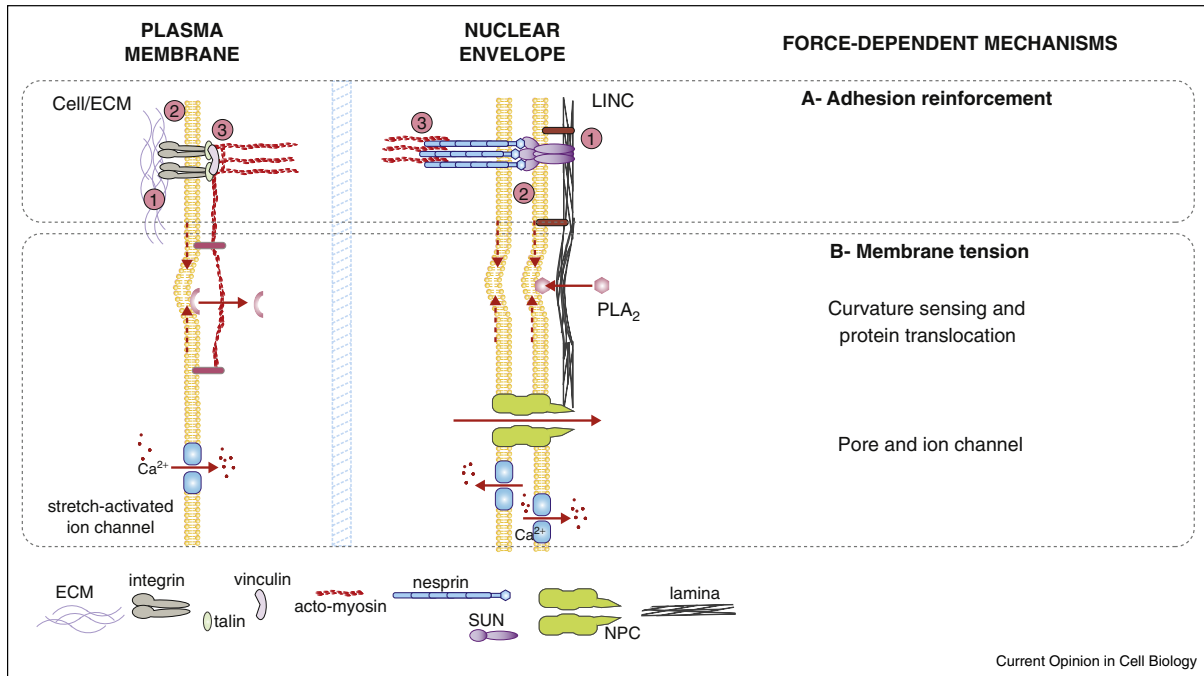
As it was anticipated [3], recent work identified mechanosensitive mechanisms in the nucleus that regulate its structure and function in response to mechanical tension. Whereas the molecular mechanisms that mediate this response are only beginning to be elucidated, compelling evidence strongly indicates that the nuclear envelope (NE) plays a key role in this process. The NE is formed by a double lipid membrane folded together and associated with a large network of proteins (more than 80 proteins [4]) which assemble into subnuclear structures, such as the linker of the nucleoskeleton and cytoskeleton (LINC) complex, the nuclear pore complex (NPC) and the underlying scaffold, the lamina. Additionally, NE anchors LEM (Lamina-associated polypeptide 2, Emerin, MAN1) domain proteins that promote interaction with chromatin, such as emerin [5]. Recent advances show that these elements constitute a membrane-bound network whose assembly and dynamics are regulated by mechanical tension [6,7<sup>\*\*</sup>,8<sup>\*\*</sup>,9<sup>\*\*</sup>], revealing a functional homology with the cell surface mechanosensitive molecules that are present at the plasma membrane (PM). Here, we review the force-dependent mechanisms that are initiated at the NE and focus primarily on their consequences on cell architecture. After discussing several NE mechanisms and highlighting their analogy with cell surface structures, we illustrate the importance of these nuclear processes with two examples, integrin-based adhesion and cell migration. While we acknowledge that there can be some fundamental differences in the biology of the PM and the nuclear membrane (NM), we believe that this parallel may help understanding the role and function of these newly identified nuclear mechanisms.

### The NE and the cell surface share their mechanosensitivity

One could anticipate that its localization in the cell interior should shield the NE from environmental mechanical stress, but in fact the NE, like the PM, can be subjected to significant tensile and compressive forces arising from the cytoskeleton or from cellular microenvironment [10,11]. Despite major differences in structure and trafficking between the PM and the NM, both include protein complexes whose activity and/or interaction are impacted by mechanical stress. This reminiscence of cell surface mechanosensitivity may be the consequence of NE coevolution with the endomembrane system [12<sup>\*\*</sup>] and is certainly best exemplified by the LINC complex that

## 2 Cell architecture

Figure 1



The NE and the cell surface share their mechanosensitivity. **(a)** LINC and cell surface adhesions reinforce through similar mechanisms: (1) Increased connection with a network of fibrous proteins (the nuclear matrix or the extracellular matrix). Additional lamina rearrangement [30,52\*\*] may also contribute to LINC reinforcement. (2) TM protein association in response to tension. (3) Increased connection with the actin cytoskeleton. **(b)** Like the PM, the NM can be subjected to tension arising from the cytoskeleton or directly from the external environment. Membrane tension can be converted in signaling pathways through curvature sensing and protein translocation or activation of mechanosensitive channels. At the NE, NPC-mediated transport may also be regulated by membrane tension.

remodels in response to tension [7\*\*,8\*\*], similarly to cell surface adhesion (Figure 1). But the LINC complex is not the only force-sensitive structure at the NE, and tension within the nuclear membrane or through the lamina can also trigger molecular responses as it does at the cell surface. Although these mechanisms are presented separately here, they are interdependent and may function in a coordinated fashion.

### LINC complex reinforcement

Spanning the NE, the LINC complex is formed by the association of Nesprin and SUN (Sad1 Unc-84) proteins and constitutes a physical link between the cytoplasm and the nucleoplasm. Anchored in the Outer Nuclear Membrane (ONM), Nesprins bind directly or interact indirectly with all three types of cytoskeletal filaments and with SUN proteins within the perinuclear space via a KASH domain. SUN proteins are embedded in the Inner Nuclear Membrane (INM) and interact with lamins and nucleoplasmic components [13–18]. In many aspects, the LINC complex mirrors integrin-based adhesions. In both cases, transmembrane proteins cross lipid membranes (Nesprin-SUN or

integrin) and allow force transmission between two compartments through interaction with the cytoskeleton on one side and with a network of fibrous proteins on the other side (i.e. the nuclear matrix [19] or the extracellular matrix). Interestingly, these complexes can aggregate and co-localize with actomyosin filaments. Whereas clustering of integrin-based adhesions was first observed decades ago, LINC complex clusters have been identified only recently by the Gunderson's group [6] and named Transmembrane Actin-Associated Nuclear (TAN) lines. Recent advances reveal that beyond its structural homology, the LINC complex behaves like cell surface adhesion and can remodel in response to tension [7\*\*,8\*\*], thus strengthening the connection between the cytoskeleton and the lamina.

Similar to integrin-based adhesions, the LINC complex can undergo reinforcement in response to tension through distinct but complementary modalities (Figure 1): **(1) Increased connection with the actin cytoskeleton.** Nesprin 2G experiences actomyosin-generated tension, as demonstrated by a recent study using a fluorescence resonance energy transfer-based tension biosensor [21].



Gundersen and colleagues showed that the formin FHOD1 interacts with Nesprin 2G and increases its avidity for actin by providing an additional actin binding site (ABS) and potentially by gathering Nesprin 2G molecules via FHOD1 dimer formation [7<sup>\*\*</sup>]. This strengthening response has been proposed to resist the substantial force necessary to mobilize the nucleus [7<sup>\*\*</sup>]. Interestingly, mDia, another formin, has been shown to impact integrin-based adhesion maturation in response to tension, although in this case it involves FH2-mediated actin elongation, rather than actin binding [22,23]. More recently, tension was shown to induce emerlin-dependent recruitment of myosin and actin polymerization [24<sup>\*\*</sup>] at the ONM, thus increasing LINC interaction with actin. (2) **TM protein association in response to tension.** Actomyosin filaments have been shown to co-localize with clustered LINC complex components that form TAN lines [6]. Additionally, myosin inhibition was reported to prevent formation of Nesprin 2G linear arrays, indicating that like integrins [25], Nesprin aggregates in response to actomyosin contractility. The structure of SUN-KASH complex has been resolved [26] and involves binding of three KASH domains to trimeric SUN proteins. SUN proteins contain coiled-coil domains which have been recently reported to regulate SUN domain accessibility and SUN multimerization [27]. It will be interesting to test if mechanical tension can modulate intramolecular interaction between coiled-coil domains and SUN domain and favor 'active' SUN conformation, in a similar way to what has been described for integrins [28]. (3) **Increased connection with lamina.** Using isolated nuclei, we recently observed that application of tensional forces to Nesprin 1 triggers an increased association of lamin A/C with the LINC complex [8<sup>\*\*</sup>], leading to a decrease in the strain and increased resistance to the applied tension. Whereas force-dependent emerlin phosphorylation was shown to be necessary, the molecular mechanisms that mediate this response are not fully understood, but involve enhanced interaction between SUN proteins and lamin A/C. It has been observed that cells lacking lamin A form less stable TAN lines, which slip over the nucleus [29], indicating that lamina composition may affect the response of the LINC complex to tension. Interestingly, the lamina can remodel in response to cell-generated contractility via lamin A/C stabilization or recruitment at the NE [30] (lamina remodeling is detailed below), suggesting that lamina rearrangement may also contribute to LINC reinforcement. Tension-induced LINC reinforcement may serve as an adaptive mechanism to resist the force applied by cytoskeletal filaments, thus offering robust nuclear anchoring. Mechanical tension is also transmitted via the LINC to the NM, where it can be converted into biochemical pathways.

### Nuclear membrane tension

Membrane tension within the PM is a major actor in mechanotransduction [31], where it is transmitted to

lipid-anchored protein complexes to trigger signaling pathways. Like the PM, the NM can be subjected to tension arising from the cytoskeleton or directly from the external environment. As a result, the NM can undergo deformation, whose extent depends mainly on the amount of membrane reservoir available and the mechanical properties of the surrounding cytoskeletal structures [31]. NM reservoir, such as the endoplasmic reticulum which is continuous with the ONM, can accommodate sudden changes in membrane tension and limit their consequences. Interestingly, intranuclear invaginations of the NE, also called nucleoplasmic reticulum, have been reported in many cell types [32] and may serve as membrane reservoir in cells whose NE is exposed to frequent or high mechanical stress. Experimental deformation of the NE, using micropipette aspiration of swollen and unswollen nuclei, showed that the lamina constitutes an extensible network that dampens mechanical stress [33,34]. Chromatin has also been shown to contribute to the deformability of the NM, due to its interaction with the lamina [33,34].

At the PM, tension can be converted into biochemical pathways through many different modalities including, curvature sensing proteins, membrane translocation of proteins and mechanosensitive channels [31]. These structures have potential nuclear counterparts that transduce nuclear membrane tension into nuclear signaling pathways: (1) **Curvature sensing and protein translocation.** Differences in lipid composition between the NM and the PM [35] may affect the modalities of protein recruitment, favoring hydrophobic rather than electrostatic interactions [36]. The ALPS domain, a known membrane curvature sensor, has been identified in NPC component Nup133 and promotes membrane anchoring and assembly of the NPC [37]. Remarkably, a recent study demonstrates that phospholipase A2 (PLA<sub>2</sub>) translocates from the nucleoplasm to the INM in response to excessive membrane tension following nuclear swelling [38<sup>\*\*</sup>]. In this study, the authors showed *in vivo* that this mechanotransduction mechanism triggers eicosanoid synthesis and inflammation in response to tissue damage [38<sup>\*\*</sup>] (Figure 1). Excessive NM tension can compromise nuclear integrity and cell survival, as recently observed when cells migrate in confined environment [39,40]. These studies reported that substantial physical stress is applied to the NE when cells cross tight interstitial spaces, leading to NE rupture and subsequent repair by recruitment of the endosomal sorting complexes required for transport III (ESCRT III) machinery. (2) **Mechanosensitive channels.** NPCs are large protein complexes that form aqueous channels positioned in the NE, where the ONM and INM are fused. NPCs allow nuclear import and export of molecules via passive or active diffusion and are closely linked to chromatin organization and gene expression as they facilitate mRNA export [41,42]. It has been suggested that mechanical stress transmission to the NE

#### 4 Cell architecture

may affect NPC structure, eventually modifying the size of the pore [10]. If this is the case, both NM tension and cytoskeletal tension may act coordinately to induce NPC deformation. SUN1, but not SUN2, has been shown to associate with NPCs [43] and may bridge NPCs with the lamina or with LINC-associated cytoskeletal filaments. NPCs are also connected to a filamentous network called 'pore-linked-filaments' (PLF) [44,45], which may connect it to other nucleoplasmic components. Changes in the dimension of the transport channel were detected in cells grown at different confluences [46]. However, despite the apparent flexibility of its constituents [42], whether NPC transport is sensitive to mechanical stress transmitted at the NE remains to be determined. Remarkably, mechanosensitive calcium channels have been observed in the ONM with similar surface density than in the PM of cardiac myocytes [47] (Figure 1). In the same study, the authors observed that nuclear calcium increased in cells adhering to rigid surfaces, but not to soft substrates, and correlated with changes in nuclear shape [47]. Calcium changes in the nucleoplasm may affect various nuclear signaling, including gene expression via activation of calmodulin-dependent kinase IV, apoptosis or protein import [48].

##### Lamina remodeling

A-type and B-type lamins are intermediate filaments that constitute the lamina scaffold underlying the INM [49] and thus are main determinants of NE mechanical properties [33,49]. Lamins are involved in many nuclear processes and contribute to chromatin and gene expression regulation [49], through lamina-dependent or independent pathways [50]. Dynamic rearrangements of lamin A/C have been observed in response to mechanical stress. Strikingly, it was found that lamin A/C levels scaled with tissue elasticity [9\*\*] *in vivo*. The same group reported that myosin-generated contractility induces lamin A/C dephosphorylation at Ser22, which promotes its stabilization [30] and results in increased stiffness of the NE and increased expression of serum response factor target genes. Lamin A/C enrichment at the NE was also shown to occur in response to shear stress in a prior study [51]. Interestingly, mechanical tension has been shown to affect directly lamin A/C conformation [9\*\*,52\*\*]. Application of shear stress to isolated nuclei induced partial unfolding of the lamin A immunoglobulin (Ig)-domain [9\*\*], which was suggested to impact its phosphorylation and subsequent stability. Using antibodies targeting conformational epitopes on the C-terminal Ig-domain and the N-terminus of A-type lamins, another group found that these two epitopes are inaccessible only at the basal NE in cells whose nuclei are compressed by an actin cap. Tension-induced reversible unfolding of Ig-domain or structurally related fibronectin 3 domain have been observed in other proteins involved in mechanotransduction pathways [52\*\*]. It will be interesting to test if force-dependent lamin A/C conformation uncovers a cryptic

site that affects its association between lamin molecules. Such mechanism has been observed in the extracellular matrix where tension promotes fibronectin fibrils formation [53], via exposure of new intermolecular binding sites. More recently, it was demonstrated that heterochromatin connection to the lamina is affected by tension, via an emerin-dependent regulation of nuclear actin level [24\*\*], resulting in gene expression regulation. However, whether the chromatin interaction with lamina participates in the dynamic changes in NE mechanical properties remains to be explored.

##### Force-dependent NE mechanisms during adhesion and migration

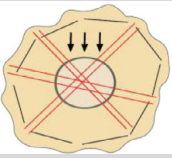
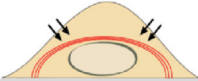
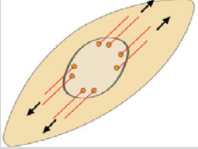
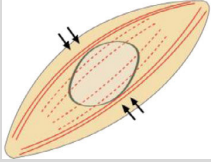
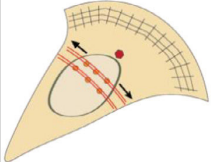
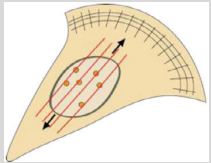
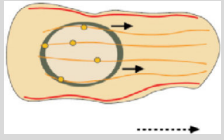
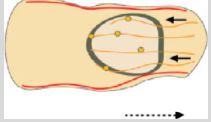
During adhesion and migration, the force-dependent mechanisms that are initiated at the NE not only impact the structure and function of the nucleus, but also the cytoplasmic architecture via physical contact with load-bearing elements or through regulation of signaling events, thus orchestrating an autonomous yet integrated response (Table 1).

##### Adhesion to extracellular matrix

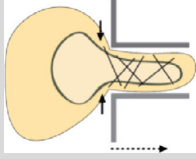
When cells adhere to flat surfaces, actomyosin filaments exerts mechanical tension to the nucleus, leading to affect its morphology, as shown by Ingber's pioneering work [54]. A dome-like actin cap, composed of contractile actin filament bundles that covers the top of the nucleus was shown to contribute to nuclear flattening [55] and exerts both compression to the NE and tension to the LINC complex [20,21,52\*\*]. However, while cells are spreading during the early phase of adhesion (<20 min), nuclear flattening might be driven by additional contractility-independent mechanisms. Dickinson and colleagues showed in fibroblasts that the nucleus flattens in absence of myosin activity [56]. The authors suggest that nuclear flattening may be the consequence of changes in cellular shape, as the intervening cytoskeletal network resists expansion or compression [56]. Interestingly, a plectin-associated dense network of intermediate filaments was shown to regulate nuclear shape in keratinocytes, independently of the LINC complex [57]. These studies suggest that two successive mechanisms may impact nuclear shape during adhesion: First a LINC-independent and contractility-independent early flattening, during which all cytoskeletal filaments may play a role (<20 min), followed by the generation of actomyosin-contractility applied to LINC complexes.

Regarding the NE, these two phases may have different consequences. As cells begin to spread, LINC-independent changes in nuclear shape may favor nuclear deformation by limiting lamina and LINC remodeling. Subsequent to this phase, cell-generated tension promotes LINC reinforcement [8\*\*] and lamina polarization and stabilization [9\*\*,30,52\*\*] in order to resist the significant cytoskeletal tension that builds up in late adhesion

**Mechanotransduction via the nuclear envelope: a distant reflection of the cell surface** Aureille, Belaadi and Guilluy 5**Table 1****NE mechanosensitive mechanisms during adhesion and migration**

	Mechanical stress	NE response	Potential consequence	Schematic representation	Publications
Adhesion	Cell shape changes transmitted through cytoskeletal structures. LINC independent	No lamina remodeling	Promotes nuclear deformation during early adhesion		[56]
Adhesion	Compressive forces emanating from actin cap (partially counteracted by intermediate filaments)	Lamina remodeling	Cytoskeletal anchoring and organization Gene expression		[9**,30,52**,55]
Adhesion	Tensile forces generated by actomyosin contractility	LINC reinforcement Nuclear mechanosensitive channels activation	Cytoskeletal anchoring and organization Gene expression		[8**,21] [24**,58,59] [47]
Adhesion	Lateral nuclear compression generated by actomyosin contractility	Lamina remodeling?	Condensation of chromatin Decreases proliferation		[60,61]
Migration	Tensile forces emanating from TAN lines	LINC reinforcement	Cytoskeletal anchoring and organization Allows nuclear positioning and centrosome reorientation		[6,7**]
Migration	Tensile forces generated by actin cap	LINC reinforcement	Nuclear translocation Favors persistent migration		[63,64,65]
3D Migration	Tensile forces generated by vimentin-associated actomyosin	LINC reinforcement	Cytoskeletal anchoring and organization Drives lamellipodia-independent migration		[68]
3D Migration	Compressive forces on the anterior side of the nucleus	Lamina remodeling?			[68]

## 6 Cell architecture

Table 1 (Continued)					
	Mechanical stress	NE response	Potential consequence	Schematic representation	Publications
3D Migration	Confined environment	Lamina disruption	Enables nuclear deformation and facilitates cell migration through confined environment		[70]

(Table 1). It is interesting to note that Riveline and colleagues observed adhesion maturation in response to application of pulling forces to the nucleus [22]. This suggests that LINC reinforcement may regulate adhesion maturation by allowing the attachment of contractile filaments. Additionally force-induced LINC remodeling can affect gene expression at later stage of adhesion. A recent study showed that mechanical tension induces an emerin-dependent decrease in nuclear actin that results in transcription attenuation and accumulation of H3K27me3 at facultative heterochromatin [24\*\*]. This work is consistent with previous reports demonstrating that the LINC complex regulates chromatin organization [58,59]. Other NE force-dependent mechanisms may also regulate gene expression in response to cell-tractility, such as lamina stabilization [30] or nuclear mechanosensitive calcium channels which have been shown to increase nucleoplasmic calcium during cell spreading, resulting in myocyte enhancer factor 2 increased transcription [47]. Cell-generated contractility applied to the NE was also reported to promote proliferation [60,61], although the involvement of force-dependent mechanisms has not been determined yet.

### Cell migration

The mechanisms that drive nuclear positioning during individual cell migration can arise from all three types of cytoskeletal elements [62] and depend on many factors including the type of migration, the mechanical properties of the environment and the cell type. Microtubules and their associated molecular motors can apply shear forces to the NE, resulting in nuclear rotation or translocation. Actomyosin-dependent nuclear movement exerts various types of forces [63], which have been shown to either pull or push the nucleus [63,64] and enable centrosome orientation through TAN lines [6,7\*\*]. Studying migration of isolated fibroblasts, a study showed that actomyosin contraction leads to nuclear translocation [63]. Consistent with this, the Wirtz group observed that actin cap driven nuclear translocation were found to favor persistent migration, whereas dynein-mediated nuclear rotation mediates changes in direction [65]. Whether emanating from TAN lines or actin cap structures, actomyosin tension promotes LINC rearrangements which play a central role to resist tension [7\*\*]. Beyond affecting

nuclear positioning, altered LINC anchorage was shown to impact the whole cell architecture, resulting in trailing edge detachment defects [63] and alterations in cell speed and persistence [65]. Additionally, actin cap-associated adhesions are greatly sensitive to changes in matrix rigidity [66], suggesting that the LINC complex and its associated cytoskeleton participate in durotaxis. The LINC complex plays also a central role in organizing migration in 3D. The Wirtz group found that defective LINC resulted in altered actin-based protrusions and matrix tractions [67]. Interestingly, Petrie and colleagues found that actomyosin-coupled vimentin filaments pull the nucleus which serves as piston and generates a forward compartment with high hydrostatic pressure, necessary for lamellipodia-independent displacements [68]. As the forward compartment may exert compressive forces to the anterior face of the NE, it will be interesting to analyze lamina polarity and conformation epitope availability. Lamina stiffness is a major determinant of 3D migration efficiency [69\*\*]. Interestingly, migration through confined pores triggers the formation of a perinuclear Arp2/3-dependent actin network that disrupts the lamina in dendritic cells [70], promoting NE deformation. Surprisingly, myosin inhibition had no effect on this response, suggesting that this perinuclear actin structure is not contractile. It will be interesting to explore whether this actin network impacts tension within the NM or the contiguous PM, or the friction between the two membranes.

### Conclusion

NE mechanosensitive structures integrate mechanical signals and dynamically regulate cellular organization during adhesion, migration and many other contexts which are associated with changes in nuclear position or shape. This central role in cell architecture is certainly best exemplified by the myriad of cellular defects that are associated with genetic diseases targeting NE proteins [62]. A recent inside-out model has been proposed to explain the origin of the cell nucleus [12\*\*]. In this model the ONM, the PM and the cytoplasm derived from extracellular protrusions and preceded PM fusion. According to this model, LINC complex components may descend from archaical S-layer glycoproteins. This would suggest that the development of mechanosensitive

## Mechanotransduction via the nuclear envelope: a distant reflection of the cell surface Aureille, Belaadi and Guilluy 7

structures at the NM may have been anterior to the emergence of those located at the PM, positioning the cell surface as a reflection of the NE.

### Acknowledgements

We apologize to those whose work was not discussed due to space limitations. We thank Keith Burridge, David Graham, Laurianne Van Landeghem and Lydia Pernet for their critical readings of the manuscript. C.G. is supported by grants from the Agence Nationale de la Recherche (ANR-13-JSV1-0008), from the European Union Seventh Framework Programme (Marie Curie Career Integration #8304162) and from European Research Council (ERC) under European Union's Horizon 2020 research and innovation program (ERC Starting Grant #639300).

### References and recommended reading

Papers of particular interest, published within the period of review, have been highlighted as:

- of special interest
  - of outstanding interest
1. Hoffman BD, Grashoff C, Schwartz MA: **Dynamic molecular processes mediate cellular mechanotransduction.** *Nature* 2011, **475**:316-323.
  2. Parsons JT, Horwitz AR, Schwartz MA: **Cell adhesion: integrating cytoskeletal dynamics and cellular tension.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010, **11**:633-643.
  3. Wang N, Tytell JD, Ingber DE: **Mechanotransduction at a distance: mechanically coupling the extracellular matrix with the nucleus.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009, **10**:75-82.
  4. Schirmer EC, Florens L, Guan T, Yates JR, Gerace L: **Nuclear membrane proteins with potential disease links found by subtractive proteomics.** *Science* 2003, **301**:1380-1382.
  5. Simon DN, Wilson KL: **The nucleoskeleton as a genome-associated dynamic "network of networks."** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2011, **12**:695-708.
  6. Luxton GWG, Gomes ER, Folker ES, Vintinner E, Gundersen GG: **Linear arrays of nuclear envelope proteins harness retrograde actin flow for nuclear movement.** *Science* 2010, **329**:956-959.
  7. Kutscheid S, Zhu R, Antoku S, Luxton GWG, Stagljar I, Fackler OT, Gundersen GG: **FHOD1 interaction with nesprin-2G mediates TAN line formation and nuclear movement.** *Nat Cell Biol* 2014, **16**:708-715.
  - This study found that FHOD1 interacts with Nesprin 2G and mediates LINC reinforcement by providing an additional actin binding site.
  8. Guilluy C, Osborne LD, Van Landeghem L, Sharek L, Superfine R, Garcia-Mata R, Burridge K: **Isolated nuclei adapt to force and reveal a mechanotransduction pathway in the nucleus.** *Nat Cell Biol* 2014, **16**:376-381.
  - This work demonstrates that application of tension to Nesprin triggers an emerin-dependent LINC rearrangement that resists the applied tension.
  9. Swift J, Ivanovska IL, Buxboim A, Harada T, Dingal PCDP, Pinter J, Pajerowski JD, Spinler KR, Shin J-W, Tewari M, Rehfeldt F, Speicher DW, Discher DE: **Nuclear lamin-A scales with tissue stiffness and enhances matrix-directed differentiation.** *Science* 2013, **341**:1240104.
  - This remarkable work used proteomics and observed that lamin A/C scales with tissue elasticity and participates to matrix-directed stem cells differentiation.
  10. Wang N, Tytell JD, Ingber DE: **Mechanotransduction at a distance: mechanically coupling the extracellular matrix with the nucleus.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009, **10**:75-82.
  11. Maniotis AJ, Chen CS, Ingber DE: **Demonstration of mechanical connections between integrins, cytoskeletal filaments, and nucleoplasm that stabilize nuclear structure.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997, **94**:849-854.
  12. Baum DA, Baum B: **An inside-out origin for the eukaryotic cell.** *BMC Biol* 2014, **12**:76.
  - This work proposes a new 'inside-out' model to explain the evolutionary origin of the cell nucleus.
  13. Zhen Y-Y, Libotte T, Munck M, Noegel AA, Korenbaum E: **NUANCE, a giant protein connecting the nucleus and actin cytoskeleton.** *J Cell Sci* 2002, **115**:3207-3222.
  14. Padmakumar VC, Libotte T, Lu W, Zaim H, Abraham S, Noegel AA, Gotzmann J, Foisner R, Karakesisoglou I: **The inner nuclear membrane protein Sun1 mediates the anchorage of Nesprin-2 to the nuclear envelope.** *J Cell Sci* 2005, **118**:3419-3430.
  15. Wilhelmens K, Litjens SHM, Kuikman I, Tshimbalanga N, Janssen H, van den Bout I, Raymond K, Sonnenberg A: **Nesprin-3, a novel outer nuclear membrane protein, associates with the cytoskeletal linker protein plectin.** *J Cell Biol* 2005, **171**:799-810.
  16. Crisp M, Liu Q, Roux K, Rattner JB, Shanahan C, Burke B, Stahl PD, Hodzic D: **Coupling of the nucleus and cytoplasm: role of the LINC complex.** *J Cell Biol* 2006, **172**:41-53.
  17. Haque F, Lloyd DJ, Smallwood DT, Dent CL, Shanahan CM, Fry AM, Trembath RC, Shackleton S: **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**:3738-3751.
  18. Schmitt J, Benavente R, Hodzic D, Höög C, Stewart CL, Alsheimer M: **Transmembrane protein Sun2 is involved in tethering mammalian meiotic telomeres to the nuclear envelope.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007, **104**:7426-7431.
  19. Berezney R, Coffey DS: **Identification of a nuclear protein matrix.** *Biochem Biophys Res Commun* 1974, **60**:1410-1417.
  20. Nagayama K, Yamazaki S, Yahiro Y, Matsumoto T: **Estimation of the mechanical connection between apical stress fibers and the nucleus in vascular smooth muscle cells cultured on a substrate.** *J Biomech* 2014, **47**:1422-1429.
  21. Arsenovic PT, Ramachandran I, Bathula K, Zhu R, Narang JD, Noll NA, Lemmon CA, Gundersen GG, Conway DE: **Nesprin-2G, a component of the nuclear LINC complex, is subject to myosin-dependent tension.** *Biophys J* 2016, **110**:34-43.
  22. Riveline D, Zamir E, Balaban NQ, Schwarz US, Ishizaki T, Narumiya S, Kam Z, Geiger B, Bershadsky AD: **Focal contacts as mechanosensors: externally applied local mechanical force induces growth of focal contacts by an mDia1-dependent and ROCK-independent mechanism.** *J Cell Biol* 2001, **153**:1175-1186.
  23. Schiller HB, Hermann M-R, Polleux J, Vignaud T, Zanivan S, Friedel CC, Sun Z, Raducanu A, Gottschalk K-E, Théry M, Mann M, Fässler R:  **$\beta$ 1- and  $\alpha$ v-class integrins cooperate to regulate myosin II during rigidity sensing of fibronectin-based microenvironments.** *Nat Cell Biol* 2013, **15**:625-636.
  24. Huy QL, Ghatak S, Chloé Yeung C-Y, Tellkamp F, Günshmann C, Dieterich C, Yeroslaviz A, Habermann B, Pombo A, Niessen CM, Wickström SA: **Mechanical regulation of transcription controls Polycomb-mediated gene silencing during lineage commitment.** *Nat Cell Biol* 2016.
  - This work demonstrates that heterochromatin connection to the lamina is affected by tension, via an emerin-dependent regulation of nuclear actin level, resulting in gene expression regulation and stem cell commitment.
  25. Chrzanowska-Wodnicka M, Burridge K: **Rho-stimulated contractility drives the formation of stress fibers and focal adhesions.** *J Cell Biol* 1996, **133**:1403-1415.
  26. Sosa BA, Rothballer A, Kutay U, Schwartz TU: **LINC complexes form by binding of three KASH peptides to domain interfaces of trimeric SUN proteins.** *Cell* 2012, **149**:1035-1047.
  27. Nie S, Ke H, Gao F, Ren J, Wang M, Huo L, Gong W, Feng W: **Coiled-coil domains of SUN proteins as intrinsic dynamic regulators.** *Struct Lond Engl* 1993 2016, **24**:80-91.
  28. Schwartz MA: **Cell biology. The force is with us.** *Science* 2009, **323**:588-589.
  29. Folker ES, Ostlund C, Luxton GWG, Worman HJ, Gundersen GG: **Lamin A variants that cause striated muscle disease are defective in anchoring transmembrane actin-associated nuclear lines for nuclear movement.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011, **108**:131-136.

## 8 Cell architecture

30. Buxboim A, Swift J, Irianto J, Spinler KR, Dingal PCDP, Athirasala A, Kao Y-RC, Cho S, Harada T, Shin J-W, Discher DE: **Matrix elasticity regulates lamin-A, C phosphorylation and turnover with feedback to actomyosin.** *Curr Biol CB* 2014.
31. Diz-Muñoz A, Fletcher DA, Weiner OD: **Use the force: membrane tension as an organizer of cell shape and motility.** *Trends Cell Biol* 2013, **23**:47-53.
32. Malhas A, Goulbourne C, Vaux DJ: **The nucleoplasmic reticulum: form and function.** *Trends Cell Biol* 2011, **21**:362-373.
33. Dahl KN, Kahn SM, Wilson KL, Discher DE: **The nuclear envelope lamina network has elasticity and a compressibility limit suggestive of a molecular shock absorber.** *J Cell Sci* 2004, **117**:4779-4786.
34. Dahl KN, Engler AJ, Pajeroski JD, Discher DE: **Power-law rheology of isolated nuclei with deformation mapping of nuclear substructures.** *Biophys J* 2005, **89**:2855-2864.
35. van Meer G, Voelker DR, Feigenson GW: **Membrane lipids: where they are and how they behave.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008, **9**:112-124.
36. Bigay J, Antonny B, Curvature: **Lipid packing, and electrostatics of membrane organelles: defining cellular territories in determining specificity.** *Dev Cell* 2012, **23**:886-895.
37. Kim SJ, Fernandez-Martinez J, Sampathkumar P, Martel A, Matsui T, Tsuruta H, Weiss TM, Shi Y, Markina-Inarrairaegui A, Bonanno JB, Sauder JM, Burley SK, Chait BT, Almo SC, Rout MP, Sali A: **Integrative structure-function mapping of the nucleoporin Nup133 suggests a conserved mechanism for membrane anchoring of the nuclear pore complex.** *Mol Cell Proteomics MCP* 2014, **13**:2911-2926.
38. Enyedi B, Jelcic M, Niethammer P: **The cell nucleus serves as a mechanotransducer of tissue damage-induced inflammation.** *Cell* 2016, **165**:1160-1170.
- This study demonstrated that nuclear translocation of PLA2 mediates a mechanotransduction mechanism in response to nuclear swelling during tissue damage.
39. Raab M, Gentili M, de Belly H, Thiam HR, Vargas P, Jimenez AJ, Lautenschlaeger F, Voituriez R, Lennon-Duménil AM, Manel N, Piel M: **ESCR1 III repairs nuclear envelope ruptures during cell migration to limit DNA damage and cell death.** *Science* 2016, **352**:359-362.
40. Denais CM, Gilbert RM, Isermann P, McGregor AL, te Lindert M, Weigel B, Davidson PM, Friedl P, Wolf K, Lammerding J: **Nuclear envelope rupture and repair during cancer cell migration.** *Science* 2016, **352**:353-358.
41. Kabachinski G, Schwartz TU: **The nuclear pore complex – structure and function at a glance.** *J Cell Sci* 2015, **128**:423-429.
42. Knochenhauer KE, Schwartz TU: **The nuclear pore complex as a flexible and dynamic gate.** *Cell* 2016, **164**:1162-1171.
43. Liu Q, Pante N, Misteli T, Elsagga M, Crisp M, Hodzic D, Burke B, Roux KJ: **Functional association of Sun1 with nuclear pore complexes.** *J Cell Biol* 2007, **178**:785-798.
44. Cordes VC, Reidenbach S, Köhler A, Stuurman N, van Driel R, Franke WW: **Intranuclear filaments containing a nuclear pore complex protein.** *J Cell Biol* 1993, **123**:1333-1344.
45. Kiseleva E, Drummond SP, Goldberg MW, Rutherford SA, Allen TD, Wilson KL: **Actin- and protein-4.1-containing filaments link nuclear pore complexes to subnuclear organelles in *Xenopus* oocyte nuclei.** *J Cell Sci* 2004, **117**:2481-2490.
46. Feldherr CM, Akin D: **The permeability of the nuclear envelope in dividing and nondividing cell cultures.** *J Cell Biol* 1990, **111**:1-8.
47. Itano N, Okamoto S, Zhang D, Lipton SA, Ruoslahti E: **Cell spreading controls endoplasmic and nuclear calcium: a physical gene regulation pathway from the cell surface to the nucleus.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003, **100**:5181-5186.
48. Malviya AN, Rogue PJ: **“Tell me where is calcium bred”: clarifying the roles of nuclear calcium.** *Cell* 1998, **92**:17-23.
49. Osmanagic-Myers S, Dechat T, Foisner R: **Lamins at the crossroads of mechanosignaling.** *Genes Dev* 2015, **29**:225-237.
50. Dechat T, Gesson K, Foisner R: **Lamina-independent lamins in the nuclear interior serve important functions.** *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 2010, **75**:533-543.
51. Philip JT, Dahl KN: **Nuclear mechanotransduction: response of the lamina to extracellular stress with implications in aging.** *J Biomech* 2008, **41**:3164-3170.
52. 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* 2015.
- This work showed that cell-generated tension regulates lamin A formation in cells.
53. Zhong C, Chrzanowska-Wodnicka M, Brown J, Shaub A, Belkin AM, Burrigge K: **Rho-mediated contractility exposes a cryptic site in fibronectin and induces fibronectin matrix assembly.** *J Cell Biol* 1998, **141**:539-551.
54. Sims JR, Karp S, Ingber DE: **Altering the cellular mechanical force balance results in integrated changes in cell, cytoskeletal and nuclear shape.** *J Cell Sci* 1992, **103**(Pt 4):1215-1222.
55. Khatau SB, Hale CM, Stewart-Hutchinson PJ, Patel MS, Stewart CL, Searson PC, Hodzic D, Wirtz D: **A perinuclear actin cap regulates nuclear shape.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009, **106**:19017-19022.
56. Li Y, Lovett D, Zhang Q, Neelam S, Kuchibhotla RA, Zhu R, Gundersen GG, Lele TP, Dickinson RB: **Moving cell boundaries drive nuclear shaping during cell spreading.** *Biophys J* 2015, **109**:670-686.
57. Almeida FV, Walko G, McMillan JR, McGrath JA, Wiche G, Barber AH, Connelly JT: **The cytolinker plectin regulates nuclear mechanotransduction in keratinocytes.** *J Cell Sci* 2015, **128**:4475-4486.
58. Hernandez M, Patzig J, Mayoral SR, Costa KD, Chan JR, Casaccia P: **Mechanostimulation promotes nuclear and epigenetic changes in oligodendrocytes.** *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 2016, **36**:806-813.
59. Kim DH, Wirtz D: **Cytoskeletal tension induces the polarized architecture of the nucleus.** *Biomaterials* 2015.
60. Versaevael M, Grevesse T, Gabriele S: **Spatial coordination between cell and nuclear shape within micropatterned endothelial cells.** *Nat Commun* 2012, **3**:671.
61. Nagayama K, Hamaji Y, Sato Y, Matsumoto T: **Mechanical trapping of the nucleus on micropillared surfaces inhibits the proliferation of vascular smooth muscle cells but not cervical cancer HeLa cells.** *J Biomech* 2015, **48**:1796-1803.
62. Gundersen GG, Worman HJ: **Nuclear positioning.** *Cell* 2013, **152**:1376-1389.
63. Alam SG, Lovett D, Kim DI, Roux KJ, Dickinson RB, Lele TP: **The nucleus is an intracellular propagator of tensile forces in NIH 3T3 fibroblasts.** *J Cell Sci* 2015, **128**:1901-1911.
64. Wu J, Kent IA, Shekhar N, Chancellor TJ, Mendonca A, Dickinson RB, Lele TP: **Actomyosin pulls to advance the nucleus in a migrating tissue cell.** *Biophys J* 2014, **106**:7-15.
65. Kim D-H, Cho S, Wirtz D: **Tight coupling between nucleus and cell migration through the perinuclear actin cap.** *J Cell Sci* 2014, **127**:2528-2541.
66. Kim D-H, Khatau SB, Feng Y, Walcott S, Sun SX, Longmore GD, Wirtz D: **Actin cap associated focal adhesions and their distinct role in cellular mechanosensing.** *Sci Rep* 2012, **2**:555.
67. Khatau SB, Bloom RJ, Bajpai S, Razafsky D, Zang S, Giri A, Wu P-H, Marchand J, Celedon A, Hale CM, Sun SX, Hodzic D, Wirtz D: **The distinct roles of the nucleus and nucleus-cytoskeleton connections in three-dimensional cell migration.** *Sci Rep* 2012, **2**:488.

**Mechanotransduction via the nuclear envelope: a distant reflection of the cell surface** Aureille, Belaadi and Guilluy 9

68. Petrie RJ, Koo H, Yamada KM: **Generation of compartmentalized pressure by a nuclear piston governs cell motility in a 3D matrix.** *Science* 2014, **345**:1062-1065.
69. Harada T, Swift J, Irianto J, Shin J-W, Spinler KR, Athirasala A, Diegmiller R, Dingal PCDP, Ivanovska IL, Discher DE: **Nuclear lamin stiffness is a barrier to 3D migration, but softness can limit survival.** *J Cell Biol* 2014, **204**:669-682.
70. Thiam H-R, Vargas P, Carpi N, Crespo CL, Raab M, Terriac E, King MC, Jacobelli J, Alberts AS, Stradal T, Lennon-Dumenil A-M, Piel M: **Perinuclear Arp2/3-driven actin polymerization enables nuclear deformation to facilitate cell migration through complex environments.** *Nat Commun* 2016, **7**:10997.

This work demonstrated that lamina stiffness determines the ability of cells to migrate in 3D environment.

## REVUE n°2

### Under Pressure : Mechanical Stress Management in the Nucleus

Néjma Belaadi, Julien Aureille and Christophe Guilluy

Article publié dans Cells, 2016

#### Résumé :

Les cellules s'adaptent constamment aux propriétés mécaniques de leur environnement *via* des mécanismes de mécanotransduction. Alors qu'il a été démontré que les structures d'adhérence jouent un rôle central dans la mécanotransduction, il apparaît maintenant que le noyau peut agir comme une structure mécanosensible. Ici, nous passons en revue les récents progrès démontrant que les contraintes mécaniques émanant du cytosquelette peuvent activer des voies de signalisation dans le noyau pouvant impacter la structure nucléaire et la machinerie transcriptionnelle.



Review

# Under Pressure: Mechanical Stress Management in the Nucleus

Néjma Belaadi <sup>1</sup>, Julien Aureille <sup>2</sup> and Christophe Guilluy <sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup> Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, UMR 1087, l'institut du thorax, CNRS, UMR 6291, Université de Nantes, 44000 Nantes, France; nejma.belaadi@univ-nantes.fr

<sup>2</sup> Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, UMR 1209, Institute for Advanced Biosciences, CNRS UMR 5309, Université Grenoble Alpes, 38041 Grenoble, France; julien.aureille@inserm.fr

\* Correspondence: christophe.guilluy@inserm.fr; Tel.: +33-476-549-573

Academic Editor: Thomas Dechat

Received: 28 April 2016; Accepted: 6 June 2016; Published: 14 June 2016

**Abstract:** Cells are constantly adjusting to the mechanical properties of their surroundings, operating a complex mechanochemical feedback, which hinges on mechanotransduction mechanisms. Whereas adhesion structures have been shown to play a central role in mechanotransduction, it now emerges that the nucleus may act as a mechanosensitive structure. Here, we review recent advances demonstrating that mechanical stress emanating from the cytoskeleton can activate pathways in the nucleus which eventually impact both its structure and the transcriptional machinery.

**Keywords:** mechanotransduction; nucleoskeleton; lamina; lamin; LINC; nucleus; mechanical stress

## 1. Introduction

It has long been observed that mechanical forces play an important role in biology, perhaps most remarkably throughout the process of morphogenesis when tissue architecture appears to be shaped by mechanical loading [1,2]. However, it is only recently that the molecular mechanisms activated by mechanical stress are beginning to be elucidated. These recent advances were allowed by the emergence of new technologies to manipulate and measure mechanical tension at the molecular level, such as optical tweezers or atomic force microscopy [3,4] and more recently, the design of molecular “tension sensors” [5,6]. Additionally, the development of new surfaces with tunable mechanical or geometrical properties [7–12] enabled us to culture cells in a controlled microenvironment, thus extending the possibility to explore their mechanics. Within the last 20 years, these tools have yielded numerous findings, demonstrating that changes in the mechanical properties of the cellular environment can deeply affect cell behavior and fate [10,13–15]. Mechanical tension, whether it is generated by the cell’s cytoskeleton or externally applied to the cell surface, has been shown to regulate cell division and growth [8,16] or orient the transcriptional machinery and drive cell differentiation [10,14]. Interestingly, these mechanical stimuli can have an antagonistic effect on the cellular behavior. The quintessential example of this dual effect is certainly the impact of shear stress on endothelial cells, which depends on blood flow magnitude, frequency and direction [17–19]. Whereas low and oscillatory shear stress will promote inflammation and atherosclerosis development, high and unidirectional shear stress prevents inflammation and plaque formation [18].

## 2. Sensing and Responding to Mechanical Force

In parallel to the emerging importance of mechanical signals in biology, scientists have questioned the molecular mechanisms which allow cells to “sense” and transduce mechanical force into biochemical pathways. This has led to the identification of molecular mechanisms that coordinately transmit and transduce mechanical stress in order to trigger an appropriate cellular response [19].

Typical mechanotransduction mechanisms involve proteins whose conformation can be regulated by mechanical tension, ultimately affecting its post-translational modification (PTM), interaction or subcellular localization. Among the first candidates identified as mechanosensors were cell membrane proteins which directly experience stress applied to the cell surface, such as mechanosensitive ion channels whose activity are regulated by membrane tension [20]. In this context, the protein complexes that constitute adhesion with the extracellular matrix (ECM) or with neighboring cells have been shown to play an important role in mechanotransduction [21–25].

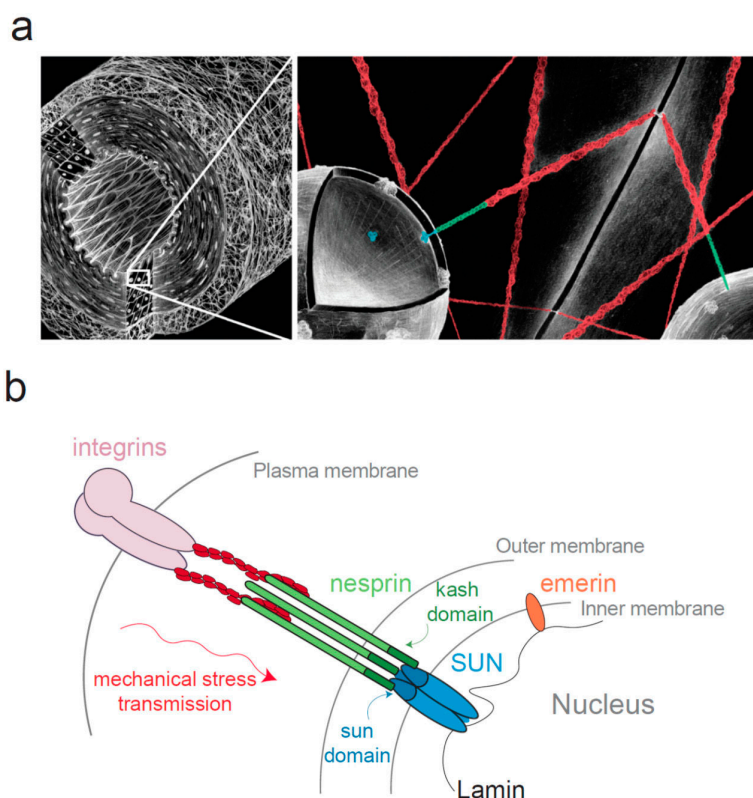
Mechanical tension can affect not only components of the cell surface, but it can also regulate molecular processes within the nucleus, such as gene expression or DNA damage [14,26–29]. Both externally applied and internally generated mechanical forces have been shown to regulate the gene expression patterns [27]. Two main possibilities of mechanical stress transduction to the nucleus have been proposed: (1) Tension may signal to the nucleus via a cascade of biochemical pathways that involve translocation of cytoplasmic components into the nucleus; (2) another possibility is that mechanical stress may be transmitted to the nucleus where it activates signaling pathways to regulate gene expression [30]. Multiple molecular relays have been found to shuttle from the cytoplasm to the nucleus in response to mechanical stress [31–33], such as proteins containing the Lin11-Is1-Mec3 (LIM) domain [34] or Yes-associated protein (YAP) and transcriptional coactivator with PDZ-binding motif (TAZ) [31], indicating that the first transduction modality plays a major role. However, recent evidences indicate that a mechanotransduction mechanism exists within the nucleus and may contribute to control cell fate and phenotype [35–37].

### 3. Mechanical Stress Transmission to the Nucleus

The possibility that mechanical stress can be transmitted from the cell surface to the nucleus was first demonstrated in a seminal work from Donald Ingber's group [38]. Using beads coated with integrin ligand and a glass micropipette, they applied tensional forces to the cell surface adhesion of endothelial cells and observed nuclear envelope (NE) distortion. Interestingly, Maniotis and colleagues observed that both actin and intermediate filaments participate to stress transmission. These results indicated for the first time that cell surface integrins were connected with the nucleus [38].

Whereas the adhesion proteins that connect the cytoskeleton with integrins have been extensively studied [39–42], the protein responsible for the attachment of the cytoskeleton to the nucleus were identified only recently [43–45] and belong to the Linker of Nucleoskeleton and Cytoskeleton (LINC) complex [43,44] (Figure 1). This complex consists in SUN (Sad1 and UNC-84) proteins anchored in the inner nuclear membrane (INM) and nesprin (nuclear envelope spectrin-repeat-containing proteins also called Syne, Myne or NUANCE) anchored in the outer nuclear membrane (ONM) [43,46–48]. As first observed with SUN1 [49], SUN proteins and nesprins interact together within the perinuclear space respectively through their SUN (Sad1 Unc-84 homology) domain highly conserved from fission yeast to mammals and KASH (Klarsicht, ANC-1, and Syne homology) domain, a short peptide of ~30 residues associated with a transmembrane domain (Figure 1). The crystal structure of SUN/KASH interaction has been recently determined and SUN domain was shown to organize in a trimeric fashion to bind three KASH peptides [50,51]. The stability of this interaction is essential for force transmission, and depends partly on a covalent disulfide bond of conserved cysteines between SUN2 and KASH2 [52]. SUN proteins exist in five isoforms in humans (SUN1 to SUN5). SUN1 and SUN2 are widely expressed [49] while SUN3, SUN4 also known as SPAG4 (Sperm Associated Antigen 4) and SUN5 also known as SPAG4L (SPAG4-Like) have a more restricted expression, they are almost exclusively found in testes [53–56]. SUN proteins are linked to lamins [46] and chromatin in the nucleoplasm [57,58]. Recent work showed that SUN1 and SUN2 co-depletion slows down the removal of chromatin during nuclear envelope breakdown, SUN proteins facilitate then mitotic progression [58]. This interaction with DNA might suggest that SUN proteins may participate in gene transcription regulation. Four nesprin isoforms have been identified in humans (nesprin-1 to nesprin-4), themselves with multiple splice isoforms able to link cytoskeletal components [59].

Nesprin-1 and -2 bind to F-actin [48,60] and to microtubules motors such as kinesin, dynein and meckelin in the cytoplasm [61,62]. Nesprin-3 interacts with plectin, which binds intermediate filaments and integrin  $\alpha6\beta4$  in keratinocytes [63–66]. Nesprin 4 can connect with microtubules via kinesin [67]. Interestingly, not all nesprins are found anchored in the ONM and some isoforms such as nesprin-1 $\alpha$  or nesprin-2 are located in the INM where they have been shown to interact directly with lamins and emerin [68,69].



**Figure 1.** The Linker of Nucleoskeleton and Cytoskeleton (LINC) complex connects the nucleus to the cytoskeleton. (a) Diagram of a blood vessel (left panel) at two different scales, demonstrating the mechanical continuum that exists between the cell surface adhesion and the nucleus; (b) Schematic representation of the LINC complex. This complex consists in SUN proteins anchored in the inner nuclear membrane (INM) and nesprins anchored in the outer nuclear membrane (ONM). SUN domain was shown to organize in a trimeric fashion to bind three KASH peptides [50,51].

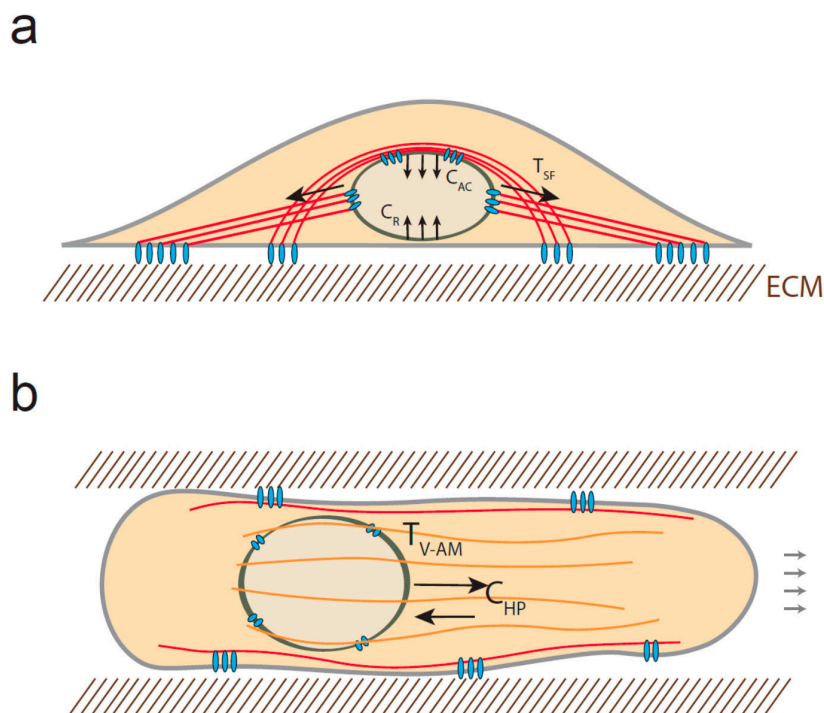
Because the LINC complex proteins are anchored in the NE, they were widely described as contributing to nuclear organization. Their silencing causes nuclei distortion, NE deformations and blebbing in different cell types [70–72]. Depleting SUN in *Caenorhabditis elegans*, Starr and colleagues observed that most of the cells had normal NE architecture and only muscle cells displayed NE spacing abnormalities, suggesting that functional LINC may only be necessary for maintaining NE width in cells subjected to high mechanical forces [73].

#### 4. Mechanical Stress Experienced by the Nucleus

As a consequence of its LINC-mediated anchorage to the NE, the cytoskeleton transmits mechanical stress emanating from the ECM or generated by molecular motors to the nucleus. For example, tensional forces are applied to nesprin-2G by the large array of actomyosin-based TAN (transmembrane actin-associated nuclear) lines to allow nuclear movements. Gundersen and

colleagues demonstrate that TAN lines promote centrosome reorientation in migrating cells [74], by driving rearward nuclear movement and positioning the centrosome between the nucleus and the leading edge of the cell [74–77]. It was recently confirmed that myosin-generated tension is applied to nesprin2-G by using a fluorescence resonance energy transfer (FRET)-based tension biosensor developed with a shortened version of nesprin-2G, although the exact amount of force experienced by the LINC complex remains to be determined [78].

Actin filaments can also apply compressive force to the nucleus. When cells are cultured on a flat surface, a subset of contractile actin filament bundles cover the nucleus and form the so-called actin cap [79]. These filaments control nucleus rotation and translocation via their attachment to the nuclear envelope through KASH-SUN interaction, which thus promotes cell repolarization and migration [80]. As a consequence, the nucleus is compressed between the actin cap structures and the substrate, resulting in a compressive force whose amount depends on the rigidity of the substrate [36] (Figure 2a).



**Figure 2.** Mechanical stress experienced by the nucleus. (a) Diagram of a stationary cell. When cells are cultured on 2D surfaces, the nucleus can be subjected to tensional forces emanating from stress fibers ( $T_{SF}$ ) and compressive forces due to the actin cap ( $C_{AC}$ ) structures and the resistance of the surface ( $C_R$ ). The red solid lines represent the actin filaments; (b) In 3D, cells may also experience both tension, generated by vimentin-associated actomyosin filaments (orange structures) ( $T_{V-AM}$ ) and compression resulting from the high pressure of the anterior compartment ( $C_{HP}$ ).

Interestingly, the nucleus may also be subjected to both compressive and tensile forces when cells migrate in 3D. Petrie and colleagues observed that the nucleus separates an anterior high-pressure compartment from a low pressure compartment behind the nucleus [81]. They showed that both myosin and vimentin interact with nesprin-3, indicating that myosin-generated tension may be transmitted to intermediate filaments and LINC complex in order to pull the nucleus forward and increase compartmentalized pressure. As a result, one could anticipate that in addition to the tension applied to nesprin 3, the anterior side of the nucleus may be subjected to compressive force resulting from the pressure gradient (Figure 2b). Additionally, it has recently been shown that the nucleus can

be substantially compressed when cells migrate in confining environment [27,82]. Two independent studies indicate that the highly strained NE can rupture and get repaired at the leading tip of the nucleus as it progresses into small constriction [27,82]. Interestingly, lamin A/C depletion increases NE ruptures occurrence, whereas increased-lamin A/C expression limits nuclear deformation and prevents migration through small pores. This indicates that lamin expression and organization may determine the capacity of cells to migrate in 3D [83,84]; however, it is not known if lamin A/C can dynamically remodel in response to compression.

## 5. Nuclear Response to Mechanical Force

Various methods have been developed to apply mechanical stress to nuclei and measure their response in order to decipher their mechanical properties [35,37,85–89], using either nuclei in intact cells or isolated nuclei. These experimental approaches showed that both lamina-based nucleoskeleton and chromatin contribute to the mechanical properties of nuclei [88,90]. While the nucleoskeleton displays viscoelastic mechanical properties, the chromatin has been shown to be viscous and has liquid-like behavior [88,90]. The nuclear lamina represents a protein meshwork composed of type-A and type-B lamins that form apparently distinct networks [91–93]. Whereas at least one type-B lamin is expressed in every mammalian cells, lamin A/C levels can vary depending on the cell type [91]. Lamin A/C is a major contributor to NE mechanical properties [35,88,90] and depletion of lamin A/C increase nuclear deformability in response to mechanical stress [35,88,94]. Depletion of lamin-partners which connect the lamina to the LINC complex or to the envelope, such as titin,  $\alpha$ II-spectrin [95] or emerin [35] has also been shown to affect nuclear strain. This indicates that local nuclear strain may depend not only on lamin A/C level, but also on its connection to other nucleoskeletal elements which experience mechanical stress, whether it is the NE or the LINC complex.

Investigating the nuclear response to force, some recent studies observed that the nucleoskeleton can dynamically remodel in response to mechanical stress, indicating that the nucleus behaves like a material that can adjust its own mechanical properties depending on the mechanical load [35–37,96]. The Disher lab showed that lamin A/C level matches with tissue elasticity in mice and human cells, as a result of lamin dephosphorylation, subsequent stabilization, and vitamin A/retinoic acid-dependent effect on lamin transcription [37]. They showed that this mechanism controls gene expression and participates in matrix-directed stem cell lineage determination. Additionally, they observed that application of shear stress to isolated nuclei induces a decrease in lamin phosphorylation at Ser390 [37], indicating that lamin A/C conformation may be sensitive to mechanical stress. Consistent with this, Vogel and colleagues showed that lamin A/C undergoes a conformational change when subjected to compressive force by using an antibody that recognizes a conformational epitope [36]. It will be interesting to test if this conformational change can affect lamin phosphorylation or stability. Applying tension to nesprin 1 in isolated nuclei, we recently found that emerin mediates a nuclear stiffening in response to pulses of force [35]. We observed that emerin phosphorylation triggers a rearrangement of the LINC complex that strengthens the connection between the LINC and lamin A/C, thus limiting nuclear deformation. Remarkably, the response was very similar to what has been described when tension was applied to cell surface adhesion [97,98]. Philip and Dahl showed that lamins are reorganized in response to shear stress and nuclear periphery, which may also be due to reinforcement of the connection between LINC and lamin A/C [99]. Whether emerin is necessary for this response remains to be determined. Interestingly, the cytoplasmic protein FHOD1 has been shown to strengthen the interaction between actin and nesprin-2G [77,100] in response to tension, suggesting that a coordinated strengthening of the cytoskeletal elements may occur from the adhesion to the nucleus in response to tension. However, one could anticipate that this stiffening response is more likely limited, especially in tissues subjected to frequent stretch, suggesting that counteracting mechanisms may exist to limit nuclear stiffness or decrease its connection to the LINC complex depending on the mechanical constraint of the environment.

## 6. Conclusions

Recent work indicates that the nucleus may act as a mechanosensitive structure, whose nucleoskeleton can dynamically remodel in response to changes in the mechanical properties of the cellular microenvironment. This dynamic reorganization hinges on nuclear mechanotransduction mechanisms and the initial mechanosensor(s) that triggers this response remains to be identified [93,96,101]. Lamin A/C conformation is sensitive to mechanical stress, but we can speculate that different mechanosensors may exist and be independently activated, whether mechanical stress is applied to the LINC complex or to the overall NE. It will be crucial to measure the amount of stress experienced by the nucleus *in vivo*, in order to test the relevance of such mechanisms. Whether these nuclear mechanotransduction mechanisms can control gene expression while the nucleus experiences force, remains also to be clarified. Certainly, depletion or mutation of nucleoskeletal components can impact transcription such as SRF or YAP/TAZ [35,37,102,103], but further investigations are required to understand how dynamic nucleoskeletal remodeling can affect transcription factor activity or chromatin organization.

**Acknowledgments:** We apologize to those whose work was not discussed due to space limitations. We thank Keith Burrige for his continuous support and Jérémy Ségard for his artistic contribution to the illustrations. C.G. is supported by grants from the Agence National de la Recherche (ANR-13-JSV1-0008), from the European Union Seventh Framework Programme (Marie Curie Career Integration n°8304162) and from European Research Council (ERC) under European Union's Horizon 2020 research and innovation programme (ERC Starting Grant n°639300).

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

## References

1. Thompson, D. *On Growth and Form*; Cambridge University Press: New York, NY, USA, 1945.
2. Wolff, J. The classic: On the inner architecture of bones and its importance for bone growth. 1870. *Clin. Orthop.* **2010**, *468*, 1056–1065. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Chaudhuri, O.; Parekh, S.H.; Lam, W.A.; Fletcher, D.A. Combined atomic force microscopy and side-view optical imaging for mechanical studies of cells. *Nat. Methods* **2009**, *6*, 383–387. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Hoffman, B.D.; Crocker, J.C. Cell Mechanics: Dissecting the physical responses of cells to force. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **2009**, *11*, 259–288. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Austen, K.; Kluger, C.; Freikamp, A.; Chrostek-Grashoff, A.; Grashoff, C. Generation and analysis of biosensors to measure mechanical forces within cells. *Methods Mol. Biol. Clifton* **2013**, *1066*, 169–184.
6. Grashoff, C.; Hoffman, B.D.; Brenner, M.D.; Zhou, R.; Parsons, M.; Yang, M.T.; McLean, M.A.; Sligar, S.G.; Chen, C.S.; Ha, T.; *et al.* Measuring mechanical tension across vinculin reveals regulation of focal adhesion dynamics. *Nature* **2010**, *466*, 263–266. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Boudou, T.; Legant, W.R.; Mu, A.; Borochin, M.A.; Thavandiran, N.; Radisic, M.; Zandstra, P.W.; Epstein, J.A.; Margulies, K.B.; Chen, C.S. A microfabricated platform to measure and manipulate the mechanics of engineered cardiac microtissues. *Tissue Eng. Part A* **2012**, *18*, 910–919. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Folkman, J.; Moscona, A. Role of cell shape in growth control. *Nature* **1978**, *273*, 345–349. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Harris, A.K.; Wild, P.; Stopak, D. Silicone rubber substrata: A new wrinkle in the study of cell locomotion. *Science* **1980**, *208*, 177–179. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Pelham, R.J.; Wang, Y. Cell locomotion and focal adhesions are regulated by substrate flexibility. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 13661–13665. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Tee, S.-Y.; Fu, J.; Chen, C.S.; Janmey, P.A. Cell shape and substrate rigidity both regulate cell stiffness. *Biophys. J.* **2011**, *100*, L25–L27. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Théry, M.; Piel, M. Adhesive micropatterns for cells: A microcontact printing protocol. *Cold Spring Harb. Protoc.* **2009**, *2009*. [[CrossRef](#)]
13. Discher, D.E.; Janmey, P.; Wang, Y.-L. Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate. *Science* **2005**, *310*, 1139–1143. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Engler, A.J.; Sen, S.; Sweeney, H.L.; Discher, D.E. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell* **2006**, *126*, 677–689. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

15. Sun, Y.; Chen, C.S.; Fu, J. Forcing stem cells to behave: A biophysical perspective of the cellular microenvironment. *Annu. Rev. Biophys.* **2012**, *41*, 519–542. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Paszek, M.J.; Zahir, N.; Johnson, K.R.; Lakins, J.N.; Rozenberg, G.I.; Gefen, A.; Reinhart-King, C.A.; Margulies, S.S.; Dembo, M.; Boettiger, D.; *et al.* Tensional homeostasis and the malignant phenotype. *Cancer Cell* **2005**, *8*, 241–254. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Feaver, R.E.; Gelfand, B.D.; Blackman, B.R. Human haemodynamic frequency harmonics regulate the inflammatory phenotype of vascular endothelial cells. *Nat. Commun.* **2013**, *4*, 1525. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Chatzizisis, Y.S.; Coskun, A.U.; Jonas, M.; Edelman, E.R.; Feldman, C.L.; Stone, P.H. Role of endothelial shear stress in the natural history of coronary atherosclerosis and vascular remodeling: Molecular, cellular, and vascular behavior. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2007**, *49*, 2379–2393. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Hoffman, B.D.; Grashoff, C.; Schwartz, M.A. Dynamic molecular processes mediate cellular mechanotransduction. *Nature* **2011**, *475*, 316–323. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Martinac, B. Mechanosensitive ion channels: Molecules of mechanotransduction. *J. Cell Sci.* **2004**, *117*, 2449–2460. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Geiger, B.; Spatz, J.P.; Bershadsky, A.D. Environmental sensing through focal adhesions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2009**, *10*, 21–33. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Bershadsky, A.D.; Balaban, N.Q.; Geiger, B. Adhesion-dependent cell mechanosensitivity. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **2003**, *19*, 677–695. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Tzima, E.; Irani-Tehrani, M.; Kiosses, W.B.; Dejana, E.; Schultz, D.A.; Engelhardt, B.; Cao, G.; DeLisser, H.; Schwartz, M.A. A mechanosensory complex that mediates the endothelial cell response to fluid shear stress. *Nature* **2005**, *437*, 426–431. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Collins, C.; Osborne, L.D.; Guilluy, C.; Chen, Z.; O'Brien, E.T.; Reader, J.S.; Burridge, K.; Superfine, R.; Tzima, E. Haemodynamic and extracellular matrix cues regulate the mechanical phenotype and stiffness of aortic endothelial cells. *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 3984. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Lecuit, T.; Yap, A.S. E-cadherin junctions as active mechanical integrators in tissue dynamics. *Nat. Cell Biol.* **2015**, *17*, 533–539. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Bissell, M.J.; Hall, H.G.; Parry, G. How does the extracellular matrix direct gene expression? *J. Theor. Biol.* **1982**, *99*, 31–68. [[CrossRef](#)]
27. Denais, C.M.; Gilbert, R.M.; Isermann, P.; McGregor, A.L.; te Lindert, M.; Weigel, B.; Davidson, P.M.; Friedl, P.; Wolf, K.; Lammerding, J. Nuclear envelope rupture and repair during cancer cell migration. *Science* **2016**, *352*, 353–358. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Mammoto, A.; Mammoto, T.; Ingber, D.E. Mechanosensitive mechanisms in transcriptional regulation. *J. Cell Sci.* **2012**, *125*, 3061–3073. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Mendez, M.G.; Janmey, P.A. Transcription factor regulation by mechanical stress. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2012**, *44*, 728–732. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Wang, N.; Tytell, J.D.; Ingber, D.E. Mechanotransduction at a distance: Mechanically coupling the extracellular matrix with the nucleus. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2009**, *10*, 75–82. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Dupont, S.; Morsut, L.; Aragona, M.; Enzo, E.; Giulitti, S.; Cordenonsi, M.; Zanconato, F.; Le Digabel, J.; Forcato, M.; Bicciato, S.; *et al.* Role of YAP/TAZ in mechanotransduction. *Nature* **2011**, *474*, 179–183. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Hervy, M.; Hoffman, L.; Beckerle, M.C. From the membrane to the nucleus and back again: Bifunctional focal adhesion proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2006**, *18*, 524–532. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Somogyi, K.; Rørth, P. Evidence for tension-based regulation of Drosophila MAL and SRF during invasive cell migration. *Dev. Cell* **2004**, *7*, 85–93. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Smith, M.A.; Hoffman, L.M.; Beckerle, M.C. LIM proteins in actin cytoskeleton mechanoreponse. *Trends Cell Biol.* **2014**, *24*, 575–583. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Guilluy, C.; Osborne, L.D.; van Landeghem, L.; Sharek, L.; Superfine, R.; Garcia-Mata, R.; Burridge, K. Isolated nuclei adapt to force and reveal a mechanotransduction pathway in the nucleus. *Nat. Cell Biol.* **2014**, *16*, 376–381. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Ihalainen, T.O.; Aires, L.; Herzog, F.A.; 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.* **2015**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

37. Swift, J.; Ivanovska, I.L.; Buxboim, A.; Harada, T.; Dingal, P.D.; Pinter, J.; Pajeroski, J.D.; Spinler, K.R.; Shin, J.-W.; Tewari, M.; *et al.* Nuclear lamin-A scales with tissue stiffness and enhances matrix-directed differentiation. *Science* **2013**, *341*, 1240104. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Maniotis, A.J.; Chen, C.S.; Ingber, D.E. Demonstration of mechanical connections between integrins, cytoskeletal filaments, and nucleoplasm that stabilize nuclear structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 849–854. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Burridge, K.; Molony, L.; Kelly, T. Adhesion plaques: Sites of transmembrane interaction between the extracellular matrix and the actin cytoskeleton. *J. Cell Sci. Suppl.* **1987**, *8*, 211–229. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Kanchanawong, P.; Shtengel, G.; Pasapera, A.M.; Ramko, E.B.; Davidson, M.W.; Hess, H.F.; Waterman, C.M. Nanoscale architecture of integrin-based cell adhesions. *Nature* **2010**, *468*, 580–584. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Mangeat, P.; Burridge, K. Actin-membrane interaction in fibroblasts: What proteins are involved in this association? *J. Cell Biol.* **1984**, *99*, 95s–103s. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Zaidel-Bar, R.; Itzkovitz, S.; Ma'ayan, A.; Iyengar, R.; Geiger, B. Functional atlas of the integrin adhesome. *Nat. Cell Biol.* **2007**, *9*, 858–867. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Crisp, M.; Liu, Q.; Roux, K.; Rattner, J.B.; Shanahan, C.; Burke, B.; Stahl, P.D.; Hodzic, D. Coupling of the nucleus and cytoplasm: Role of the LINC complex. *J. Cell Biol.* **2006**, *172*, 41–53. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Padmakumar, V.C.; Libotte, T.; Lu, W.; Zaim, H.; Abraham, S.; Noegel, A.A.; Gotzmann, J.; Foisner, R.; Karakesiosoglou, I. The inner nuclear membrane protein Sun1 mediates the anchorage of Nesprin-2 to the nuclear envelope. *J. Cell Sci.* **2005**, *118*, 3419–3430. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Razafsky, D.; Hodzic, D. Bringing KASH under the SUN: The many faces of nucleo-cytoskeletal connections. *J. Cell Biol.* **2009**, *186*, 461–472. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Haque, F.; Lloyd, D.J.; Smallwood, D.T.; Dent, C.L.; Shanahan, C.M.; Fry, A.M.; Trembath, R.C.; Shackleton, S. 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*, 3738–3751. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Chang, W.; Worman, H.J.; Gundersen, G.G. Accessorizing and anchoring the LINC complex for multifunctionality. *J. Cell Biol.* **2015**, *208*, 11–22. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Zhen, Y.-Y.; Libotte, T.; Munck, M.; Noegel, A.A.; Korenbaum, E. NUANCE, a giant protein connecting the nucleus and actin cytoskeleton. *J. Cell Sci.* **2002**, *115*, 3207–3222. [[PubMed](#)]
49. Hodzic, D.M.; Yeater, D.B.; Bengtsson, L.; Otto, H.; Stahl, P.D. Sun2 is a novel mammalian inner nuclear membrane protein. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 25805–25812. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Zhou, Z.; Du, X.; Cai, Z.; Song, X.; Zhang, H.; Mizuno, T.; Suzuki, E.; Yee, M.R.; Berezov, A.; Murali, R.; *et al.* Structure of Sad1-UNC84 homology (SUN) domain defines features of molecular bridge in nuclear envelope. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 5317–5326. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Sosa, B.A.; Rothballer, A.; Kutay, U.; Schwartz, T.U. LINC complexes form by binding of three KASH peptides to domain interfaces of trimeric SUN proteins. *Cell* **2012**, *149*, 1035–1047. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Jahed, Z.; Shams, H.; Mofrad, M.R. A Disulfide Bond Is Required for the Transmission of Forces through SUN-KASH Complexes. *Biophys. J.* **2015**, *109*, 501–509. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Göb, E.; Schmitt, J.; Benavente, R.; Alsheimer, M. Mammalian sperm head formation involves different polarization of two novel LINC complexes. *PLoS One* **2010**, *5*, e12072. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Jiang, X.-Z.; Yang, M.-G.; Huang, L.-H.; Li, C.-Q.; Xing, X.-W. SPAG4L, a novel nuclear envelope protein involved in the meiotic stage of spermatogenesis. *DNA Cell Biol.* **2011**, *30*, 875–882. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Pasch, E.; Link, J.; Beck, C.; Scheuerle, S.; Alsheimer, M. The LINC complex component Sun4 plays a crucial role in sperm head formation and fertility. *Biol. Open* **2015**, *4*, 1792–1802. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Yeh, C.-H.; Kuo, P.-L.; Wang, Y.-Y.; Wu, Y.-Y.; Chen, M.-F.; Lin, D.-Y.; Lai, T.-H.; Chiang, H.-S.; Lin, Y.-H. SEPT12/SPAG4/LAMINB1 complexes are required for maintaining the integrity of the nuclear envelope in postmeiotic male germ cells. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0120722. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Schmitt, J.; Benavente, R.; Hodzic, D.; Höög, C.; Stewart, C.L.; Alsheimer, M. Transmembrane protein Sun2 is involved in tethering mammalian meiotic telomeres to the nuclear envelope. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 7426–7431. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Turgay, Y.; Champion, L.; Balazs, C.; Held, M.; Toso, A.; Gerlich, D.W.; Meraldi, P.; Kutay, U. SUN proteins facilitate the removal of membranes from chromatin during nuclear envelope breakdown. *J. Cell Biol.* **2014**, *204*, 1099–1109. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



59. Zhang, Q.; Skepper, J.N.; Yang, F.; Davies, J.D.; Hegyi, L.; Roberts, R.G.; Weissberg, P.L.; Ellis, J.A.; Shanahan, C.M. Nesprins: A novel family of spectrin-repeat-containing proteins that localize to the nuclear membrane in multiple tissues. *J. Cell Sci.* **2001**, *114*, 4485–4498. [[PubMed](#)]
60. Padmakumar, V.C.; Abraham, S.; Braune, S.; Noegel, A.A.; Tunggal, B.; Karakesisoglou, I.; Korenbaum, E. Enaptin, a giant actin-binding protein, is an element of the nuclear membrane and the actin cytoskeleton. *Exp. Cell Res.* **2004**, *295*, 330–339. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
61. Dawe, H.R.; Adams, M.; Wheway, G.; Szymanska, K.; Logan, C.V.; Noegel, A.A.; Gull, K.; Johnson, C.A. Nesprin-2 interacts with meckelin and mediates ciliogenesis via remodelling of the actin cytoskeleton. *J. Cell Sci.* **2009**, *122*, 2716–2726. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Yu, J.; Lei, K.; Zhou, M.; Craft, C.M.; Xu, G.; Xu, T.; Zhuang, Y.; Xu, R.; Han, M. KASH protein Syne-2/Nesprin-2 and SUN proteins SUN1/2 mediate nuclear migration during mammalian retinal development. *Hum. Mol. Genet.* **2011**, *20*, 1061–1073. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Wilhelmsen, K.; Litjens, S.H.; Kuikman, I.; Tshimbalanga, N.; Janssen, H.; van den Bout, I.; Raymond, K.; Sonnenberg, A. Nesprin-3, a novel outer nuclear membrane protein, associates with the cytoskeletal linker protein plectin. *J. Cell Biol.* **2005**, *171*, 799–810. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Ketema, M.; Wilhelmsen, K.; Kuikman, I.; Janssen, H.; Hodzic, D.; Sonnenberg, A. Requirements for the localization of nesprin-3 at the nuclear envelope and its interaction with plectin. *J. Cell Sci.* **2007**, *120*, 3384–3394. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Postel, R.; Ketema, M.; Kuikman, I.; de Pereda, J.M.; Sonnenberg, A. Nesprin-3 augments peripheral nuclear localization of intermediate filaments in zebrafish. *J. Cell Sci.* **2011**, *124*, 755–764. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Ketema, M.; Kreft, M.; Secades, P.; Janssen, H.; Sonnenberg, A. 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* **2013**, *24*, 2454–2466. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Roux, K.J.; Crisp, M.L.; Liu, Q.; Kim, D.; Kozlov, S.; Stewart, C.L.; Burke, B. Nesprin 4 is an outer nuclear membrane protein that can induce kinesin-mediated cell polarization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 2194–2199. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
68. Mislow, J.M.; Holaska, J.M.; Kim, M.S.; Lee, K.K.; Segura-Totten, M.; Wilson, K.L.; McNally, E.M. Nesprin-1alpha self-associates and binds directly to emerin and lamin A *in vitro*. *FEBS Lett.* **2002**, *525*, 135–140. [[CrossRef](#)]
69. Libotte, T.; Zaim, H.; Abraham, S.; Padmakumar, V.C.; Schneider, M.; Lu, W.; Munck, M.; Hutchison, C.; Wehnert, M.; Fahrenkrog, B.; *et al.* Lamin A/C-dependent localization of Nesprin-2, a giant scaffold at the nuclear envelope. *Mol. Biol. Cell* **2005**, *16*, 3411–3424. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
70. Cain, N.E.; Starr, D.A. SUN proteins and nuclear envelope spacing. *Nucl. Austin Tex* **2015**, *6*, 2–7. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
71. Lüke, Y.; Zaim, H.; Karakesisoglou, I.; Jaeger, V.M.; Sellin, L.; Lu, W.; Schneider, M.; Neumann, S.; Beijer, A.; Munck, M.; *et al.* Nesprin-2 Giant (NUANCE) maintains nuclear envelope architecture and composition in skin. *J. Cell Sci.* **2008**, *121*, 1887–1898. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. Zhang, Q.; Bethmann, C.; Worth, N.F.; Davies, J.D.; Wasner, C.; Feuer, A.; Ragnauth, C.D.; Yi, Q.; Mellad, J.A.; Warren, D.T.; *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*, 2816–2833. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Cain, N.E.; Tapley, E.C.; McDonald, K.L.; Cain, B.M.; Starr, D.A. The SUN protein UNC-84 is required only in force-bearing cells to maintain nuclear envelope architecture. *J. Cell Biol.* **2014**, *206*, 163–172. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Luxton, G.W.G.; Gomes, E.R.; Folker, E.S.; Vintinner, E.; Gundersen, G.G. Linear Arrays of Nuclear Envelope Proteins Harness Retrograde Actin Flow for Nuclear Movement. *Science* **2010**, *329*, 956–959. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Chang, W.; Antoku, S.; Östlund, C.; Worman, H.J.; Gundersen, G.G. Linker of nucleoskeleton and cytoskeleton (LINC) complex-mediated actin-dependent nuclear positioning orients centrosomes in migrating myoblasts. *Nucl. Austin Tex* **2015**, *6*, 77–88. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. Gomes, E.R.; Jani, S.; Gundersen, G.G. Nuclear movement regulated by Cdc42, MRCK, myosin, and actin flow establishes MTOC polarization in migrating cells. *Cell* **2005**, *121*, 451–463. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

77. Kutscheidt, S.; Zhu, R.; Antoku, S.; Luxton, G.W.G.; Stagljar, I.; Fackler, O.T.; Gundersen, G.G. FHOD1 interaction with nesprin-2G mediates TAN line formation and nuclear movement. *Nat. Cell Biol.* **2014**, *16*, 708–715. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
78. Arsenovic, P.T.; Ramachandran, I.; Bathula, K.; Zhu, R.; Narang, J.D.; Noll, N.A.; Lemmon, C.A.; Gundersen, G.G.; Conway, D.E. Nesprin-2G, a Component of the Nuclear LINC Complex, Is Subject to Myosin-Dependent Tension. *Biophys. J.* **2016**, *110*, 34–43. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
79. Khatau, S.B.; Hale, C.M.; Stewart-Hutchinson, P.J.; Patel, M.S.; Stewart, C.L.; Searson, P.C.; Hodzic, D.; Wirtz, D. A perinuclear actin cap regulates nuclear shape. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 19017–19022. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
80. Kim, D.-H.; Cho, S.; Wirtz, D. Tight coupling between nucleus and cell migration through the perinuclear actin cap. *J. Cell Sci.* **2014**, *127*, 2528–2541. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
81. Petrie, R.J.; Koo, H.; Yamada, K.M. Generation of compartmentalized pressure by a nuclear piston governs cell motility in a 3D matrix. *Science* **2014**, *345*, 1062–1065. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
82. Raab, M.; Gentili, M.; de Belly, H.; Thiam, H.R.; Vargas, P.; Jimenez, A.J.; Lautenschlaeger, F.; Voituriez, R.; Lennon-Duménil, A.M.; Manel, N.; *et al.* ESCRT III repairs nuclear envelope ruptures during cell migration to limit DNA damage and cell death. *Science* **2016**, *352*, 359–362. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
83. Burke, B. CELL BIOLOGY. When cells push the envelope. *Science* **2016**, *352*, 295–296. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
84. Harada, T.; Swift, J.; Irianto, J.; Shin, J.-W.; Spinler, K.R.; Athirasala, A.; Diegmiller, R.; Dingal, P.C.D.P.; Ivanovska, I.L.; Discher, D.E. Nuclear lamin stiffness is a barrier to 3D migration, but softness can limit survival. *J. Cell Biol.* **2014**, *204*, 669–682. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
85. Dahl, K.N.; Kahn, S.M.; Wilson, K.L.; Discher, D.E. The nuclear envelope lamina network has elasticity and a compressibility limit suggestive of a molecular shock absorber. *J. Cell Sci.* **2004**, *117*, 4779–4786. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
86. Dahl, K.N.; Engler, A.J.; Pajeroski, J.D.; Discher, D.E. Power-Law Rheology of Isolated Nuclei with Deformation Mapping of Nuclear Substructures. *Biophys. J.* **2005**, *89*, 2855–2864. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
87. Lammerding, J.; Dahl, K.N.; Discher, D.E.; Kamm, R.D. Nuclear mechanics and methods. *Methods Cell Biol.* **2007**, *83*, 269–294. [[PubMed](#)]
88. Pajeroski, J.D.; Dahl, K.N.; Zhong, F.L.; Sammak, P.J.; Discher, D.E. Physical plasticity of the nucleus in stem cell differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 15619–15624. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
89. Rowat, A.C.; Lammerding, J.; Ipsen, J.H. Mechanical Properties of the Cell Nucleus and the Effect of Emerin Deficiency. *Biophys. J.* **2006**, *91*, 4649–4664. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
90. Dahl, K.N.; Kalinowski, A. Nucleoskeleton mechanics at a glance. *J. Cell Sci.* **2011**, *124*, 675–678. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
91. Gruenbaum, Y.; Foisner, R. Lamins: Nuclear intermediate filament proteins with fundamental functions in nuclear mechanics and genome regulation. *Annu. Rev. Biochem.* **2015**, *84*, 131–164. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
92. Ho, C.Y.; Lammerding, J. Lamins at a glance. *J. Cell Sci.* **2012**, *125*, 2087–2093. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
93. Osmanagic-Myers, S.; Dechat, T.; Foisner, R. Lamins at the crossroads of mechanosignaling. *Genes Dev.* **2015**, *29*, 225–237. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
94. Thiam, H.-R.; Vargas, P.; Carpi, N.; Crespo, C.L.; Raab, M.; Terriac, E.; King, M.C.; Jacobelli, J.; Alberts, A.S.; Stradal, T.; *et al.* Perinuclear Arp2/3-driven actin polymerization enables nuclear deformation to facilitate cell migration through complex environments. *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 10997. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
95. Zhong, Z.; Wilson, K.L.; Dahl, K.N. Beyond lamins other structural components of the nucleoskeleton. *Methods Cell Biol.* **2010**, *98*, 97–119. [[PubMed](#)]
96. Navarro, A.P.; Collins, M.A.; Folker, E.S. The nucleus is a conserved mechanosensation and mechanoreponse organelle. *Cytoskeleton* **2016**, *73*, 59–67. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
97. Guilluy, C.; Swaminathan, V.; Garcia-Mata, R.; O'Brien, E.T.; Superfine, R.; Burrridge, K. The Rho GEFs LARG and GEF-H1 regulate the mechanical response to force on integrins. *Nat. Cell Biol.* **2011**, *13*, 722–727. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
98. Huvneers, S.; Oldenburg, J.; Spanjaard, E.; van der Krogt, G.; Grigoriev, I.; Akhmanova, A.; Rehmann, H.; de Rooij, J. Vinculin associates with endothelial VE-cadherin junctions to control force-dependent remodeling. *J. Cell Biol.* **2012**, *196*, 641–652. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
99. Philip, J.T.; Dahl, K.N. Nuclear mechanotransduction: Response of the lamina to extracellular stress with implications in aging. *J. Biomech.* **2008**, *41*, 3164–3170. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

100. Antoku, S.; Zhu, R.; Kutscheidt, S.; Fackler, O.T.; Gundersen, G.G. Reinforcing the LINC Complex Connection to Actin Filaments: The Role of FHOD1 In TAN Line Formation and Nuclear Movement. *Cell Cycle* **2015**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
101. Guilluy, C.; Burrige, K. Nuclear mechanotransduction: Forcing the nucleus to respond. *Nucl. Austin Tex* **2015**, *6*, 19–22. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
102. Bertrand, A.T.; Ziaei, S.; Ehret, C.; Duchemin, H.; Mamchaoui, K.; Bigot, A.; Mayer, M.; Quijano-Roy, S.; Desguerre, I.; Lainé, J.; *et al.* Cellular microenvironments reveal defective mechanosensing responses and elevated YAP signaling in LMNA-mutated muscle precursors. *J. Cell Sci.* **2014**, *127*, 2873–2884. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
103. Ho, C.Y.; Jaalouk, D.E.; Vartiainen, M.K.; Lammerding, J. Lamin A/C and emerin regulate MKL1-SRF activity by modulating actin dynamics. *Nature* **2013**, *497*, 507–511. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



© 2016 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC-BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## Références bibliographiques

Aaronson, R.P., and Blobel, G. (1974). On the attachment of the nuclear pore complex. *J. Cell Biol.* *62*, 746–754.

Aaronson, R.P., and Blobel, G. (1975). Isolation of nuclear pore complexes in association with a lamina. *Proc Natl Acad Sci U S A* *72*, 1007–1011.

Abercrombie, M., and Dunn, G.A. (1975). Adhesions of fibroblasts to substratum during contact inhibition observed by interference reflection microscopy. *Exp. Cell Res.* *92*, 57–62.

Ahmed, Z.M., Goodyear, R., Riazuddin, S., Lagziel, A., Legan, P.K., Behra, M., Burgess, S.M., Lilley, K.S., Wilcox, E.R., Riazuddin, S., et al. (2006). The tip-link antigen, a protein associated with the transduction complex of sensory hair cells, is protocadherin-15. *J. Neurosci.* *26*, 7022–7034.

Akhtar, R., Sherratt, M.J., Cruickshank, J.K., and Derby, B. (2011). Characterizing the elastic properties of tissues. *Materials Today* *14*, 96–105.

Alam, S.G., Lovett, D., Kim, D.I., Roux, K.J., Dickinson, R.B., and Lele, T.P. (2015). The nucleus is an intracellular propagator of tensile forces in NIH 3T3 fibroblasts. *J. Cell. Sci.* *128*, 1901–1911.

Allen, T.D., Cronshaw, J.M., Bagley, S., Kiseleva, E., and Goldberg, M.W. (2000). The nuclear pore complex: mediator of translocation between nucleus and cytoplasm. *J. Cell. Sci.* *113* ( Pt 10), 1651–1659.

Almeida, F.V., Walko, G., McMillan, J.R., McGrath, J.A., Wiche, G., Barber, A.H., and Connelly, J.T. (2015a). The cytolinker plectin regulates nuclear mechanotransduction in keratinocytes. *J Cell Sci* *128*, 4475–4486.

Almeida, F.V., Walko, G., McMillan, J.R., McGrath, J.A., Wiche, G., Barber, A.H., and Connelly, J.T. (2015b). The cytolinker plectin regulates nuclear mechanotransduction in keratinocytes. *J Cell Sci* *128*, 4475–4486.

Amano, M., Chihara, K., Kimura, K., Fukata, Y., Nakamura, N., Matsuura, Y., and Kaibuchi, K. (1997). Formation of actin stress fibers and focal adhesions enhanced by Rho-kinase. *Science* *275*, 1308–1311.

Ando, J., Nomura, H., and Kamiya, A. (1987). The effect of fluid shear stress on the migration and proliferation of cultured endothelial cells. *Microvasc. Res.* *33*, 62–70.

Anselme, K., Wakhloo, N.T., Rougerie, P., and Pieuchot, L. (2018). Role of the Nucleus as a Sensor of Cell Environment Topography. *Adv Healthc Mater* *7*, e1701154.

- Aragona, M., Panciera, T., Manfrin, A., Giulitti, S., Michielin, F., Elvassore, N., Dupont, S., and Piccolo, S. (2013). A mechanical checkpoint controls multicellular growth through YAP/TAZ regulation by actin-processing factors. *Cell* *154*, 1047–1059.
- Arsenovic, P.T., Ramachandran, I., Bathula, K., Zhu, R., Narang, J.D., Noll, N.A., Lemmon, C.A., Gundersen, G.G., and Conway, D.E. (2016). Nesprin-2G, a Component of the Nuclear LINC Complex, Is Subject to Myosin-Dependent Tension. *Biophys. J.* *110*, 34–43.
- Arthur, W.T., and Burridge, K. (2001). RhoA inactivation by p190RhoGAP regulates cell spreading and migration by promoting membrane protrusion and polarity. *Mol. Biol. Cell* *12*, 2711–2720.
- Assoian, R.K., and Zhu, X. (1997). Cell anchorage and the cytoskeleton as partners in growth factor dependent cell cycle progression. *Curr. Opin. Cell Biol.* *9*, 93–98.
- Auernheimer, V., Lautscham, L.A., Leidenberger, M., Friedrich, O., Kappes, B., Fabry, B., and Goldmann, W.H. (2015). Vinculin phosphorylation at residues Y100 and Y1065 is required for cellular force transmission. *J. Cell. Sci.* *128*, 3435–3443.
- Aymard, F., Aguirrebengoa, M., Guillou, E., Javierre, B.M., Bugler, B., Arnould, C., Rocher, V., Iacovoni, J.S., Biernacka, A., Skrzypczak, M., et al. (2017). Genome-wide mapping of long-range contacts unveils clustering of DNA double-strand breaks at damaged active genes. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *24*, 353–361.
- Babaei-Jadidi, R., Li, N., Saadeddin, A., Spencer-Dene, B., Jandke, A., Muhammad, B., Ibrahim, E.E., Muraleedharan, R., Abuzinadah, M., Davis, H., et al. (2011). FBXW7 influences murine intestinal homeostasis and cancer, targeting Notch, Jun, and DEK for degradation. *J. Exp. Med.* *208*, 295–312.
- Baker, B.M., Trappmann, B., Wang, W.Y., Sakar, M.S., Kim, I.L., Shenoy, V.B., Burdick, J.A., and Chen, C.S. (2015). Cell-mediated fibre recruitment drives extracellular matrix mechanosensing in engineered fibrillar microenvironments. *Nature Materials* *14*, 1262–1268.
- Barry, S.T., and Critchley, D.R. (1994). The RhoA-dependent assembly of focal adhesions in Swiss 3T3 cells is associated with increased tyrosine phosphorylation and the recruitment of both pp125FAK and protein kinase C-delta to focal adhesions. *J. Cell. Sci.* *107* ( Pt 7), 2033–2045.
- Barton, L.J., Soshnev, A.A., and Geyer, P.K. (2015). Networking in the nucleus: a spotlight on LEM-domain proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* *34*, 1–8.
- Baum, B., and Kunda, P. (2005). Actin nucleation: spire - actin nucleator in a class of its own. *Curr. Biol.* *15*, R305-308.

- Bays, J.L., and DeMali, K.A. (2017). Vinculin in cell–cell and cell–matrix adhesions. *Cell. Mol. Life Sci.* *74*, 2999–3009.
- Beadle, C., Assanah, M.C., Monzo, P., Vallee, R., Rosenfeld, S.S., and Canoll, P. (2008). The role of myosin II in glioma invasion of the brain. *Mol. Biol. Cell* *19*, 3357–3368.
- 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. *The Journal of Immunology* *153*, 682–690.
- Bélaadi, N., Aureille, J., and Guilluy, C. (2016). Under Pressure: Mechanical Stress Management in the Nucleus. *Cells*.
- Belmont, A.S., Zhai, Y., and Thilenius, A. (1993). Lamin B distribution and association with peripheral chromatin revealed by optical sectioning and electron microscopy tomography. *J. Cell Biol.* *123*, 1671–1685.
- Belz, G.G. (1995). Elastic properties and Windkessel function of the human aorta. *Cardiovasc Drugs Ther* *9*, 73–83.
- Benham-Pyle, B.W., Pruitt, B.L., and Nelson, W.J. (2015). Cell adhesion. Mechanical strain induces E-cadherin-dependent Yap1 and  $\beta$ -catenin activation to drive cell cycle entry. *Science* *348*, 1024–1027.
- Ben-Harush, K., Wiesel, N., Frenkiel-Krispin, D., Moeller, D., Soreq, E., Aebi, U., Herrmann, H., Gruenbaum, Y., and Medalia, O. (2009). The supramolecular organization of the *C. elegans* nuclear lamin filament. *J. Mol. Biol.* *386*, 1392–1402.
- Ben-Ze’ev, A., Farmer, S.R., and Penman, S. (1980). Protein synthesis requires cell-surface contact while nuclear events respond to cell shape in anchorage-dependent fibroblasts. *Cell* *21*, 365–372.
- Berghe, T.V., Linkermann, A., Jouan-Lanhouet, S., Walczak, H., and Vandenabeele, P. (2014). Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* *15*, 135–147.
- Bershadsky, A.D., Tint, I.S., Neyfakh, A.A., and Vasiliev, J.M. (1985). Focal contacts of normal and RSV-transformed quail cells. Hypothesis of the transformation-induced deficient maturation of focal contacts. *Exp. Cell Res.* *158*, 433–444.
- Bertrand, A.T., Ziaei, S., Ehret, C., Duchemin, H., Mamchaoui, K., Bigot, A., Mayer, M., Quijano-Roy, S., Desguerre, I., Lainé, J., et al. (2014). Cellular microenvironments reveal defective mechanosensing responses and elevated YAP signaling in LMNA-mutated muscle precursors. *J. Cell. Sci.* *127*, 2873–2884.

- Biamonti, G., Giacca, M., Perini, G., Contreas, G., Zentilin, L., Weighardt, F., Guerra, M., Della Valle, G., Saccone, S., and Riva, S. (1992). The gene for a novel human lamin maps at a highly transcribed locus of chromosome 19 which replicates at the onset of S-phase. *Mol. Cell. Biol.* *12*, 3499–3506.
- Bickmore, W.A., and van Steensel, B. (2013). Genome architecture: domain organization of interphase chromosomes. *Cell* *152*, 1270–1284.
- Biggiogera, M., Malatesta, M., Abolhassani-Dadras, S., Amalric, F., Rothblum, L.I., and Fakan, S. (2001). Revealing the unseen: the organizer region of the nucleolus. *J. Cell. Sci.* *114*, 3199–3205.
- Bissell, M.J., Hall, H.G., and Parry, G. (1982). How does the extracellular matrix direct gene expression? *Journal of Theoretical Biology* *99*, 31–68.
- Blanchoin, L., Pollard, T.D., and Mullins, R.D. (2000). Interactions of ADF/cofilin, Arp2/3 complex, capping protein and profilin in remodeling of branched actin filament networks. *Curr. Biol.* *10*, 1273–1282.
- Böhmer, R.M., Scharf, E., and Assoian, R.K. (1996). Cytoskeletal integrity is required throughout the mitogen stimulation phase of the cell cycle and mediates the anchorage-dependent expression of cyclin D1. *Mol. Biol. Cell* *7*, 101–111.
- Bonnans, C., Chou, J., and Werb, Z. (2014). Remodelling the extracellular matrix in development and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *15*, 786–801.
- Bonne, G., Di Barletta, M.R., Varnous, S., Bécane, H.M., Hammouda, E.H., Merlini, L., Muntoni, F., Greenberg, C.R., Gary, F., Urtizberea, J.A., et al. (1999). Mutations in the gene encoding lamin A/C cause autosomal dominant Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Nat. Genet.* *21*, 285–288.
- Borrego-Pinto, J., Jegou, T., Osorio, D.S., Auradé, F., Gorjánácz, M., Koch, B., Mattaj, I.W., and Gomes, E.R. (2012). Samp1 is a component of TAN lines and is required for nuclear movement. *J. Cell. Sci.* *125*, 1099–1105.
- Boschetti, F., Pennati, G., Gervaso, F., Peretti, G.M., and Dubini, G. (2004). Biomechanical properties of human articular cartilage under compressive loads. *Biorheology* *41*, 159–166.
- Brachner, A., Braun, J., Ghodgaonkar, M., Castor, D., Zlopasa, L., Ehrlich, V., Jiricny, J., Gotzmann, J., Knasmüller, S., and Foisner, R. (2012). The endonuclease Ankle1 requires its LEM and GIY-YIG motifs for DNA cleavage in vivo. *J. Cell. Sci.* *125*, 1048–1057.
- Broers, J.L.V., Peeters, E.A.G., Kuijpers, H.J.H., Endert, J., Bouten, C.V.C., Oomens, C.W.J., Baaijens, F.P.T., and Ramaekers, F.C.S. (2004). 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.

Bronshtein, I., Kepten, E., Kanter, I., Berezin, S., Lindner, M., Redwood, A.B., Mai, S., Gonzalo, S., Foisner, R., Shav-Tal, Y., et al. (2015). Loss of lamin A function increases chromatin dynamics in the nuclear interior. *Nat Commun* *6*, 8044.

Bronshtein, I., Kanter, I., Kepten, E., Lindner, M., Berezin, S., Shav-Tal, Y., and Garini, Y. (2016). Exploring chromatin organization mechanisms through its dynamic properties. *Nucleus* *7*, 27–33.

Buckley, C.D., Tan, J., Anderson, K.L., Hanein, D., Volkmann, N., Weis, W.I., Nelson, W.J., and Dunn, A.R. (2014a). Cell adhesion. The minimal cadherin-catenin complex binds to actin filaments under force. *Science* *346*, 1254211.

Buckley, C.D., Tan, J., Anderson, K.L., Hanein, D., Volkmann, N., Weis, W.I., Nelson, W.J., and Dunn, A.R. (2014b). Cell adhesion. The minimal cadherin-catenin complex binds to actin filaments under force. *Science* *346*, 1254211.

Bui, K.H., von Appen, A., DiGuilio, A.L., Ori, A., Sparks, L., Mackmull, M.-T., Bock, T., Hagen, W., Andrés-Pons, A., Glavy, J.S., et al. (2013). Integrated structural analysis of the human nuclear pore complex scaffold. *Cell* *155*, 1233–1243.

Burke, B., and Gerace, L. (1986). A cell free system to study reassembly of the nuclear envelope at the end of mitosis. *Cell* *44*, 639–652.

Burnette, D.T., Manley, S., Sengupta, P., Sougrat, R., Davidson, M.W., Kachar, B., and Lippincott-Schwartz, J. (2011). A role for actin arcs in the leading-edge advance of migrating cells. *Nature Cell Biology* *13*, 371–382.

Burridge, K. (1981a). Are stress fibres contractile? *Nature* *294*, 691–692.

Burridge, K. (1981b). Are stress fibres contractile? *Nature* *294*, 691–692.

Burridge, K., and Connell, L. (1983). Talin: a cytoskeletal component concentrated in adhesion plaques and other sites of actin-membrane interaction. *Cell Motil.* *3*, 405–417.

Burridge, K., and Feramisco, J.R. (1982). Alpha-actinin and vinculin from nonmuscle cells: calcium-sensitive interactions with actin. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* *46 Pt 2*, 587–597.

Butin-Israeli, V., Adam, S.A., Goldman, A.E., and Goldman, R.D. (2012). Nuclear lamin functions and disease. *Trends Genet.* *28*, 464–471.

Buxboim, A., Swift, J., Irianto, J., Spinler, K.R., Dingal, P.C.D.P., Athirasala, A., Kao, Y.-R.C., Cho, S., Harada, T., Shin, J.-W., et al. (2014). Matrix elasticity regulates

lamin-A,C phosphorylation and turnover with feedback to actomyosin. *Curr. Biol.* *24*, 1909–1917.

Cai, M., Huang, Y., Ghirlando, R., Wilson, K.L., Craigie, R., and Clore, G.M. (2001). Solution structure of the constant region of nuclear envelope protein LAP2 reveals two LEM-domain structures: one binds BAF and the other binds DNA. *EMBO J.* *20*, 4399–4407.

Campbell, I.D., and Humphries, M.J. (2011). *Integrin Structure, Activation, and Interactions*. Cold Spring Harb Perspect Biol *3*.

Campellone, K.G., and Welch, M.D. (2010). A nucleator arms race: cellular control of actin assembly. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *11*, 237–251.

Caputo, S., Couprie, J., Duband-Goulet, I., Kondé, E., Lin, F., Braud, S., Gondry, M., Gilquin, B., Worman, H.J., and Zinn-Justin, S. (2006). The carboxyl-terminal nucleoplasmic region of MAN1 exhibits a DNA binding winged helix domain. *J. Biol. Chem.* *281*, 18208–18215.

Case, L.B., Baird, M.A., Shtengel, G., Campbell, S.L., Hess, H.F., Davidson, M.W., and Waterman, C.M. (2015). Molecular mechanism of vinculin activation and nanoscale spatial organization in focal adhesions. *Nat. Cell Biol.* *17*, 880–892.

Chambliss, A.B., Khatau, S.B., Erdenberger, N., Robinson, D.K., Hodzic, D., Longmore, G.D., and Wirtz, D. (2013a). The LINC-anchored actin cap connects the extracellular milieu to the nucleus for ultrafast mechanotransduction. *Sci Rep* *3*, 1087.

Chambliss, A.B., Khatau, S.B., Erdenberger, N., Robinson, D.K., Hodzic, D., Longmore, G.D., and Wirtz, D. (2013b). The LINC-anchored actin cap connects the extracellular milieu to the nucleus for ultrafast mechanotransduction. *Sci Rep* *3*, 1087.

Chan, C.E., and Odde, D.J. (2008). Traction dynamics of filopodia on compliant substrates. *Science* *322*, 1687–1691.

Chang, W., Antoku, S., Östlund, C., Worman, H.J., and Gundersen, G.G. (2015a). Linker of nucleoskeleton and cytoskeleton (LINC) complex-mediated actin-dependent nuclear positioning orients centrosomes in migrating myoblasts. *Nucleus* *6*, 77–88.

Chang, W., Antoku, S., Östlund, C., Worman, H.J., and Gundersen, G.G. (2015b). Linker of nucleoskeleton and cytoskeleton (LINC) complex-mediated actin-dependent nuclear positioning orients centrosomes in migrating myoblasts. *Nucleus* *6*, 77–88.

Chaudhuri, O., Koshy, S.T., Cunha, C.B. da, Shin, J.-W., Verbeke, C.S., Allison, K.H., and Mooney, D.J. (2014). Extracellular matrix stiffness and composition jointly regulate the induction of malignant phenotypes in mammary epithelium. *Nature Materials* *13*, 970–978.

- Chen, C.S. (2008). Mechanotransduction - a field pulling together? *J. Cell. Sci.* *121*, 3285–3292.
- Chen, W.T., and Singer, S.J. (1982). Immunoelectron microscopic studies of the sites of cell-substratum and cell-cell contacts in cultured fibroblasts. *J. Cell Biol.* *95*, 205–222.
- Chen, H., Choudhury, D.M., and Craig, S.W. (2006). Coincidence of Actin Filaments and Talin Is Required to Activate Vinculin. *J. Biol. Chem.* *281*, 40389–40398.
- Chen, K.D., Li, Y.S., Kim, M., Li, S., Yuan, S., Chien, S., and Shyy, J.Y. (1999). Mechanotransduction in response to shear stress. Roles of receptor tyrosine kinases, integrins, and Shc. *J. Biol. Chem.* *274*, 18393–18400.
- Choi, C.K., Vicente-Manzanares, M., Zareno, J., Whitmore, L.A., Mogilner, A., and Horwitz, A.R. (2008). Actin and alpha-actinin orchestrate the assembly and maturation of nascent adhesions in a myosin II motor-independent manner. *Nat. Cell Biol.* *10*, 1039–1050.
- Chow, K.-H., Factor, R.E., and Ullman, K.S. (2012). The nuclear envelope environment and its cancer connections. *Nat. Rev. Cancer* *12*, 196–209.
- Chrzanowska-Wodnicka, M., and Burridge, K. (1996). Rho-stimulated contractility drives the formation of stress fibers and focal adhesions. *J. Cell Biol.* *133*, 1403–1415.
- Codelia, V.A., Sun, G., and Irvine, K.D. (2014). Regulation of YAP by mechanical strain through Jnk and Hippo signaling. *Curr. Biol.* *24*, 2012–2017.
- Cohen, D.M., Chen, H., Johnson, R.P., Choudhury, B., and Craig, S.W. (2005). Two distinct head-tail interfaces cooperate to suppress activation of vinculin by talin. *J. Biol. Chem.* *280*, 17109–17117.
- Connelly, J.T., Gautrot, J.E., Trappmann, B., Tan, D.W.-M., Donati, G., Huck, W.T.S., and Watt, F.M. (2010). Actin and serum response factor transduce physical cues from the microenvironment to regulate epidermal stem cell fate decisions. *Nature Cell Biology* *12*, 711–718.
- Cooke, P. (1976). A filamentous cytoskeleton in vertebrate smooth muscle fibers. *J. Cell Biol.* *68*, 539–556.
- Cooper, S.T., Maxwell, A.L., Kizana, E., Ghoddusi, M., Hardeman, E.C., Alexander, I.E., Allen, D.G., and North, K.N. (2004). C2C12 co-culture on a fibroblast substratum enables sustained survival of contractile, highly differentiated myotubes with peripheral nuclei and adult fast myosin expression. *Cell Motil. Cytoskeleton* *58*, 200–211.

- Cordes, V.C., Reidenbach, S., Köhler, A., Stuurman, N., van Driel, R., and Franke, W.W. (1993). Intranuclear filaments containing a nuclear pore complex protein. *J. Cell Biol.* *123*, 1333–1344.
- Coste, B., Mathur, J., Schmidt, M., Earley, T.J., Ranade, S., Petrus, M.J., Dubin, A.E., and Patapoutian, A. (2010). Piezo1 and Piezo2 are essential components of distinct mechanically activated cation channels. *Science* *330*, 55–60.
- Courtemanche, N., Lee, J.Y., Pollard, T.D., and Greene, E.C. (2013). Tension modulates actin filament polymerization mediated by formin and profilin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *110*, 9752–9757.
- Cramer, L.P., and Mitchison, T.J. (1995). Myosin is involved in postmitotic cell spreading. *J. Cell Biol.* *131*, 179–189.
- Crisp, M., Liu, Q., Roux, K., Rattner, J.B., Shanahan, C., Burke, B., Stahl, P.D., and Hodzic, D. (2006). Coupling of the nucleus and cytoplasm: role of the LINC complex. *J. Cell Biol.* *172*, 41–53.
- Critchley, D.R. (2000). Focal adhesions - the cytoskeletal connection. *Curr. Opin. Cell Biol.* *12*, 133–139.
- Csiszar, K. (2001). Lysyl oxidases: a novel multifunctional amine oxidase family. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* *70*, 1–32.
- Dahl, K.N., and Kalinowski, A. (2011). Nucleoskeleton mechanics at a glance. *J. Cell. Sci.* *124*, 675–678.
- Dahl, K.N., Kahn, S.M., Wilson, K.L., and Discher, D.E. (2004). The nuclear envelope lamina network has elasticity and a compressibility limit suggestive of a molecular shock absorber. *J. Cell. Sci.* *117*, 4779–4786.
- Dahl, K.N., Engler, A.J., Pajerowski, J.D., and Discher, D.E. (2005). Power-law rheology of isolated nuclei with deformation mapping of nuclear substructures. *Biophys. J.* *89*, 2855–2864.
- Damodaran, K., Venkatachalapathy, S., Alisafaei, F., Radhakrishnan, A.V., Sharma Jokhun, D., Shenoy, V.B., and Shivashankar, G.V. (2018). Compressive force induces reversible chromatin condensation and cell geometry dependent transcriptional response. *Mol. Biol. Cell* mbcE18040256.
- Das, A., Fischer, R.S., Pan, D., and Waterman, C.M. (2016). YAP Nuclear Localization in the Absence of Cell-Cell Contact Is Mediated by a Filamentous Actin-dependent, Myosin II- and Phospho-YAP-independent Pathway during Extracellular Matrix Mechanosensing. *J. Biol. Chem.* *291*, 6096–6110.

- Davidson, P.M., and Lammerding, J. (2014a). Broken nuclei–lamins, nuclear mechanics, and disease. *Trends Cell Biol.* *24*, 247–256.
- Davidson, P.M., and Lammerding, J. (2014b). Broken nuclei – lamins, nuclear mechanics, and disease. *Trends in Cell Biology* *24*, 247–256.
- Davidson, P.M., Sliz, J., Isermann, P., Denais, C., and Lammerding, J. (2015). Design of a microfluidic device to quantify dynamic intra-nuclear deformation during cell migration through confining environments. *Integr. Biol.* *7*, 1534–1546.
- Davis, R.J. (2000). Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell* *103*, 239–252.
- Dawe, H.R., Adams, M., Wheway, G., Szymanska, K., Logan, C.V., Noegel, A.A., Gull, K., and Johnson, C.A. (2009). Nesprin-2 interacts with meckelin and mediates ciliogenesis via remodelling of the actin cytoskeleton. *J. Cell. Sci.* *122*, 2716–2726.
- De Sandre-Giovannoli, A., Chaouch, M., Kozlov, S., Vallat, J.-M., Tazir, M., Kassouri, N., Szepietowski, P., Hammadouche, T., Vandenberghe, A., Stewart, C.L., et al. (2002). Homozygous defects in LMNA, encoding lamin A/C nuclear-envelope proteins, cause autosomal recessive axonal neuropathy in human (Charcot-Marie-Tooth disorder type 2) and mouse. *Am. J. Hum. Genet.* *70*, 726–736.
- Dedeic, Z., Cetera, M., Cohen, T.V., and Holaska, J.M. (2011). Emerin inhibits Lmo7 binding to the Pax3 and MyoD promoters and expression of myoblast proliferation genes. *J. Cell. Sci.* *124*, 1691–1702.
- Deguchi, S., Maeda, K., Ohashi, T., and Sato, M. (2005). Flow-induced hardening of endothelial nucleus as an intracellular stress-bearing organelle. *J Biomech* *38*, 1751–1759.
- Denais, C.M., Gilbert, R.M., Isermann, P., McGregor, A.L., te Lindert, M., Weigelin, B., Davidson, P.M., Friedl, P., Wolf, K., and Lammerding, J. (2016). Nuclear envelope rupture and repair during cancer cell migration. *Science* *352*, 353–358.
- Depue, R.H., and Rice, R.V. (1965). F-ACTIN IS A RIGHT-HANDED HELIX. *J. Mol. Biol.* *12*, 302–303.
- Devos, D., Dokudovskaya, S., Williams, R., Alber, F., Eswar, N., Chait, B.T., Rout, M.P., and Sali, A. (2006). Simple fold composition and modular architecture of the nuclear pore complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *103*, 2172–2177.
- Dewey, C.F., Bussolari, S.R., Gimbrone, M.A., and Davies, P.F. (1981). The dynamic response of vascular endothelial cells to fluid shear stress. *J Biomech Eng* *103*, 177–185.

- Dhe-Paganon, S., Werner, E.D., Chi, Y.-I., and Shoelson, S.E. (2002). Structure of the globular tail of nuclear lamin. *J. Biol. Chem.* *277*, 17381–17384.
- Diamond, D.A., Berry, S.J., Umbricht, C., Jewett, H.J., and Coffey, D.S. (1982). Computerized image analysis of nuclear shape as a prognostic factor for prostatic cancer. *Prostate* *3*, 321–332.
- Dickhout, J.G., and Lee, R.M. (2000). Increased medial smooth muscle cell length is responsible for vascular hypertrophy in young hypertensive rats. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* *279*, H2085-2094.
- Dickinson, R.B., Guido, S., and Tranquillo, R.T. (1994). Biased cell migration of fibroblasts exhibiting contact guidance in oriented collagen gels. *Ann Biomed Eng* *22*, 342–356.
- Dike, L.E., and Ingber, D.E. (1996). Integrin-dependent induction of early growth response genes in capillary endothelial cells. *J. Cell. Sci.* *109 ( Pt 12)*, 2855–2863.
- Discher, D.E., Janmey, P., and Wang, Y.-L. (2005). Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate. *Science* *310*, 1139–1143.
- Dolega, M.E., Delarue, M., Ingremeau, F., Prost, J., Delon, A., and Cappello, G. (2017). Cell-like pressure sensors reveal increase of mechanical stress towards the core of multicellular spheroids under compression. *Nature Communications* *8*, 14056.
- Dreuillet, C., Tillit, J., Kress, M., and Ernoult-Lange, M. (2002). In vivo and in vitro interaction between human transcription factor MOK2 and nuclear lamin A/C. *Nucleic Acids Res.* *30*, 4634–4642.
- Drin, G., Casella, J.-F., Gautier, R., Boehmer, T., Schwartz, T.U., and Antony, B. (2007). A general amphipathic alpha-helical motif for sensing membrane curvature. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *14*, 138–146.
- Driscoll, T.P., Cosgrove, B.D., Heo, S.-J., Shurden, Z.E., and Mauck, R.L. (2015). Cytoskeletal to Nuclear Strain Transfer Regulates YAP Signaling in Mesenchymal Stem Cells. *Biophys. J.* *108*, 2783–2793.
- Du, J., Chen, X., Liang, X., Zhang, G., Xu, J., He, L., Zhan, Q., Feng, X.-Q., Chien, S., and Yang, C. (2011). Integrin activation and internalization on soft ECM as a mechanism of induction of stem cell differentiation by ECM elasticity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *108*, 9466–9471.
- Ducka, A.M., Joel, P., Popowicz, G.M., Trybus, K.M., Schleicher, M., Noegel, A.A., Huber, R., Holak, T.A., and Sitar, T. (2010). Structures of actin-bound Wiskott-Aldrich syndrome protein homology 2 (WH2) domains of Spire and the implication for filament nucleation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *107*, 11757–11762.

- Dumont, S., and Mitchison, T.J. (2009). Compression regulates mitotic spindle length by a mechanochemical switch at the poles. *Curr. Biol.* *19*, 1086–1095.
- Dundr, M., Hebert, M.D., Karpova, T.S., Stanek, D., Xu, H., Shpargel, K.B., Meier, U.T., Neugebauer, K.M., Matera, A.G., and Misteli, T. (2004). In vivo kinetics of Cajal body components. *J. Cell Biol.* *164*, 831–842.
- Dunn, G.A., and Heath, J.P. (1976). A new hypothesis of contact guidance in tissue cells. *Exp. Cell Res.* *101*, 1–14.
- Dupont, S., Morsut, L., Aragona, M., Enzo, E., Giulitti, S., Cordenonsi, M., Zanconato, F., Le Digabel, J., Forcato, M., Bicciato, S., et al. (2011). Role of YAP/TAZ in mechanotransduction. *Nature* *474*, 179–183.
- Eibauer, M., Pellanda, M., Turgay, Y., Dubrovsky, A., Wild, A., and Medalia, O. (2015). Structure and gating of the nuclear pore complex. *Nat Commun* *6*, 7532.
- Elosegui-Artola, A., Oria, R., Chen, Y., Kosmalka, A., Pérez-González, C., Castro, N., Zhu, C., Trepats, X., and Roca-Cusachs, P. (2016). Mechanical regulation of a molecular clutch defines force transmission and transduction in response to matrix rigidity. *Nature Cell Biology* *18*, 540–548.
- Elosegui-Artola, A., Andreu, I., Beedle, A.E.M., Lezamiz, A., Uroz, M., Kosmalka, A.J., Oria, R., Kechagia, J.Z., Rico-Lastres, P., Le Roux, A.-L., et al. (2017). Force Triggers YAP Nuclear Entry by Regulating Transport across Nuclear Pores. *Cell* *171*, 1397–1410.e14.
- Engler, A.J., Sen, S., Sweeney, H.L., and Discher, D.E. (2006). Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell* *126*, 677–689.
- Enyedi, B., Kala, S., Nikolich-Zugich, T., and Niethammer, P. (2013). Tissue damage detection by osmotic surveillance. *Nat. Cell Biol.* *15*, 1123–1130.
- Enyedi, B., Jelcic, M., and Niethammer, P. (2016a). The Cell Nucleus Serves as a Mechanotransducer of Tissue Damage-Induced Inflammation. *Cell* *165*, 1160–1170.
- Enyedi, B., Jelcic, M., and Niethammer, P. (2016b). The Cell Nucleus Serves as a Mechanotransducer of Tissue Damage-Induced Inflammation. *Cell* *165*, 1160–1170.
- Epstein, J.I., Berry, S.J., and Eggleston, J.C. (1984). Nuclear roundness factor. A predictor of progression in untreated Stage A2 prostate cancer. *Cancer* *54*, 1666–1671.
- Evans, E.A., and Calderwood, D.A. (2007). Forces and Bond Dynamics in Cell Adhesion. *Science* *316*, 1148–1153.

- Evans, R.E., Mott, R.E., and Helmke, B.P. (2010). Flow-induced mechanotransmission from the endothelial cytoskeleton to extracellular matrix. *The FASEB Journal* *24*, 600.3-600.3.
- Fang, J.S., Coon, B.G., Gillis, N., Chen, Z., Qiu, J., Chittenden, T.W., Burt, J.M., Schwartz, M.A., and Hirschi, K.K. (2017). Shear-induced Notch-Cx37-p27 axis arrests endothelial cell cycle to enable arterial specification. *Nature Communications* *8*, 2149.
- Fanjul-Fernández, M., Folgueras, A.R., Cabrera, S., and López-Otín, C. (2010). Matrix metalloproteinases: evolution, gene regulation and functional analysis in mouse models. *Biochim. Biophys. Acta* *1803*, 3–19.
- Fatkin, D., MacRae, C., Sasaki, T., Wolff, M.R., Porcu, M., Frenneaux, M., Atherton, J., Vidaillet, H.J., Spudich, S., De Girolami, U., et al. (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.
- Fernández, B.G., Gaspar, P., Brás-Pereira, C., Jezowska, B., Rebelo, S.R., and Janody, F. (2011). Actin-Capping Protein and the Hippo pathway regulate F-actin and tissue growth in *Drosophila*. *Development* *138*, 2337–2346.
- Finan, J.D., and Guilak, F. (2010). The effects of osmotic stress on the structure and function of the cell nucleus. *Journal of Cellular Biochemistry* *109*, 460–467.
- Flaherty, J.T., Pierce, J.E., Ferrans, V.J., Patel, D.J., Tucker, W.K., and Fry, D.L. (1972). Endothelial nuclear patterns in the canine arterial tree with particular reference to hemodynamic events. *Circ. Res.* *30*, 23–33.
- Foisner, R., and Gerace, L. (1993). Integral membrane proteins of the nuclear envelope interact with lamins and chromosomes, and binding is modulated by mitotic phosphorylation. *Cell* *73*, 1267–1279.
- Folkman, J., and Moscona, A. (1978). Role of cell shape in growth control. *Nature* *273*, 345–349.
- Frantz, C., Stewart, K.M., and Weaver, V.M. (2010). The extracellular matrix at a glance. *J. Cell. Sci.* *123*, 4195–4200.
- Friedland, J.C., Lee, M.H., and Boettiger, D. (2009). Mechanically activated integrin switch controls alpha5beta1 function. *Science* *323*, 642–644.
- Frost, H.M. (1988). Vital biomechanics: Proposed general concepts for skeletal adaptations to mechanical usage. *Calcif Tissue Int* *42*, 145–156.



- Fu, J., Wang, Y.-K., Yang, M.T., Desai, R.A., Yu, X., Liu, Z., and Chen, C.S. (2010). Mechanical regulation of cell function with geometrically modulated elastomeric substrates. *Nat. Methods* *7*, 733–736.
- Furukawa, K., and Hotta, Y. (1993). cDNA cloning of a germ cell specific lamin B3 from mouse spermatocytes and analysis of its function by ectopic expression in somatic cells. *EMBO J.* *12*, 97–106.
- 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.
- Galbraith, C.G., Skalak, R., and Chien, S. Shear stress induces spatial reorganization of the endothelial cell cytoskeleton. *Cell Motility* *40*, 317–330.
- Geiger, B. (1979). A 130K protein from chicken gizzard: its localization at the termini of microfilament bundles in cultured chicken cells. *Cell* *18*, 193–205.
- Geiger, B., Tokuyasu, K.T., Dutton, A.H., and Singer, S.J. (1980). Vinculin, an intracellular protein localized at specialized sites where microfilament bundles terminate at cell membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* *77*, 4127–4131.
- Geiger, B., Spatz, J.P., and Bershadsky, A.D. (2009). Environmental sensing through focal adhesions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *10*, 21–33.
- Gerace, L., and Blobel, G. (1980). The nuclear envelope lamina is reversibly depolymerized during mitosis. *Cell* *19*, 277–287.
- Gilbert, P.M., Havenstrite, K.L., Magnusson, K.E.G., Sacco, A., Leonardi, N.A., Kraft, P., Nguyen, N.K., Thrun, S., Lutolf, M.P., and Blau, H.M. (2010). Substrate elasticity regulates skeletal muscle stem cell self-renewal in culture. *Science* *329*, 1078–1081.
- Gilmore, A.P., and Burridge, K. (1996). Regulation of vinculin binding to talin and actin by phosphatidylinositol-4-5-bisphosphate. *Nature* *381*, 531–535.
- Göb, E., Schmitt, J., Benavente, R., and Alsheimer, M. (2010). Mammalian sperm head formation involves different polarization of two novel LINC complexes. *PLoS ONE* *5*, e12072.
- González, J.M., Navarro-Puche, A., Casar, B., Crespo, P., and Andrés, V. (2008). Fast regulation of AP-1 activity through interaction of lamin A/C, ERK1/2, and c-Fos at the nuclear envelope. *J. Cell Biol.* *183*, 653–666.
- Gonzalez-Sandoval, A., and Gasser, S.M. (2016). On TADs and LADs: Spatial Control Over Gene Expression. *Trends Genet.* *32*, 485–495.

- Grashoff, C., Hoffman, B.D., Brenner, M.D., Zhou, R., Parsons, M., Yang, M.T., McLean, M.A., Sligar, S.G., Chen, C.S., Ha, T., et al. (2010). Measuring mechanical tension across vinculin reveals regulation of focal adhesion dynamics. *Nature* *466*, 263–266.
- Green, E.M., Mansfield, J.C., Bell, J.S., and Winlove, C.P. (2014). The structure and micromechanics of elastic tissue. *Interface Focus* *4*.
- Grimaldi, P.A. (2001). The roles of PPARs in adipocyte differentiation. *Progress in Lipid Research* *40*, 269–281.
- Guan, J.L., Trevithick, J.E., and Hynes, R.O. (1991). Fibronectin/integrin interaction induces tyrosine phosphorylation of a 120-kDa protein. *Cell Regul.* *2*, 951–964.
- Guelen, L., Pagie, L., Brassat, E., Meuleman, W., Faza, M.B., Talhout, W., Eussen, B.H., de Klein, A., Wessels, L., de Laat, W., et al. (2008). Domain organization of human chromosomes revealed by mapping of nuclear lamina interactions. *Nature* *453*, 948–951.
- Guilak, F. (1995). Compression-induced changes in the shape and volume of the chondrocyte nucleus. *J Biomech* *28*, 1529–1541.
- Guilak, F., Tedrow, J.R., and Burgkart, R. (2000). Viscoelastic properties of the cell nucleus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *269*, 781–786.
- Guilluy, C., and Burrridge, K. (2015). Nuclear mechanotransduction: forcing the nucleus to respond. *Nucleus* *6*, 19–22.
- Guilluy, C., Swaminathan, V., Garcia-Mata, R., O’Brien, E.T., Superfine, R., and Burrridge, K. (2011). The Rho GEFs LARG and GEF-H1 regulate the mechanical response to force on integrins. *Nat Cell Biol* *13*, 722–727.
- Guilluy, C., Osborne, L.D., Van Landeghem, L., Sharek, L., Superfine, R., Garcia-Mata, R., and Burrridge, K. (2014). Isolated nuclei adapt to force and reveal a mechanotransduction pathway in the nucleus. *Nat. Cell Biol.* *16*, 376–381.
- Gully, M.N., Kolb, J.P., Gosti, F., Godeau, F., and Courvalin, J.C. (1990). Lamins A and C are not expressed at early stages of human lymphocyte differentiation. *Exp. Cell Res.* *189*, 145–147.
- Guo, B., and Guilford, W.H. (2006). Mechanics of actomyosin bonds in different nucleotide states are tuned to muscle contraction. *Proc Natl Acad Sci U S A* *103*, 9844–9849.
- Guo, M., Pegoraro, A.F., Mao, A., Zhou, E.H., Arany, P.R., Han, Y., Burnette, D.T., Jensen, M.H., Kasza, K.E., Moore, J.R., et al. (2017). Cell volume change through

water efflux impacts cell stiffness and stem cell fate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *114*, E8618–E8627.

Halder, G., Dupont, S., and Piccolo, S. (2012). Transduction of mechanical and cytoskeletal cues by YAP and TAZ. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *13*, 591–600.

Hall, A. (1990). The cellular functions of small GTP-binding proteins. *Science* *249*, 635–640.

Hanson, J., and Lowy, J. (1963). The structure of F-actin and of actin filaments isolated from muscle. *Journal of Molecular Biology* *6*, 46-IN5.

Haque, F., Lloyd, D.J., Smallwood, D.T., Dent, C.L., Shanahan, C.M., Fry, A.M., Trembath, R.C., and Shackleton, S. (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.

Haque, F., Mazzeo, D., Patel, J.T., Smallwood, D.T., Ellis, J.A., Shanahan, C.M., and Shackleton, S. (2010). Mammalian SUN protein interaction networks at the inner nuclear membrane and their role in laminopathy disease processes. *J. Biol. Chem.* *285*, 3487–3498.

Harada, T., Swift, J., Irianto, J., Shin, J.-W., Spinler, K.R., Athirasala, A., Diegmiller, R., Dingal, P.C.D.P., Ivanovska, I.L., and Discher, D.E. (2014). Nuclear lamin stiffness is a barrier to 3D migration, but softness can limit survival. *J. Cell Biol.* *204*, 669–682.

Harborth, J., Elbashir, S.M., Bechert, K., Tuschl, T., and Weber, K. (2001). Identification of essential genes in cultured mammalian cells using small interfering RNAs. *J. Cell. Sci.* *114*, 4557–4565.

Harris, A.K., Wild, P., and Stopak, D. (1980). Silicone rubber substrata: a new wrinkle in the study of cell locomotion. *Science* *208*, 177–179.

Harris, R.C., Haralson, M.A., and Badr, K.F. (1992). Continuous stretch-relaxation in culture alters rat mesangial cell morphology, growth characteristics, and metabolic activity. *Lab. Invest.* *66*, 548–554.

Hase, M.E., Kuznetsov, N.V., and Cordes, V.C. (2001). Amino acid substitutions of coiled-coil protein Tpr abrogate anchorage to the nuclear pore complex but not parallel, in-register homodimerization. *Mol. Biol. Cell* *12*, 2433–2452.

Hatch, E.M., and Hetzer, M.W. (2016). Nuclear envelope rupture is induced by actin-based nucleus confinement. *J Cell Biol* jcb.201603053.

Hay, E.D. (1981). Extracellular matrix. *J. Cell Biol.* *91*, 205s-223s.

- Heald, R., and McKeon, F. (1990). Mutations of phosphorylation sites in lamin A that prevent nuclear lamina disassembly in mitosis. *Cell* *61*, 579–589.
- Heasman, S.J., and Ridley, A.J. (2008). Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *9*, 690–701.
- Heath, J.P. (1983). Behaviour and structure of the leading lamella in moving fibroblasts. I. Occurrence and centripetal movement of arc-shaped microfilament bundles beneath the dorsal cell surface. *J. Cell. Sci.* *60*, 331–354.
- Heath, J.P., and Dunn, G.A. (1978). Cell to substratum contacts of chick fibroblasts and their relation to the microfilament system. A correlated interference-reflexion and high-voltage electron-microscope study. *Journal of Cell Science* *29*, 197–212.
- Hegele, R.A., Cao, H., Huff, M.W., and Anderson, C.M. (2000). LMNA R482Q mutation in partial lipodystrophy associated with reduced plasma leptin concentration. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *85*, 3089–3093.
- Helmlinger, G., Netti, P.A., Lichtenbeld, H.C., Melder, R.J., and Jain, R.K. (1997). Solid stress inhibits the growth of multicellular tumor spheroids. *Nat. Biotechnol.* *15*, 778–783.
- Hennen, J., Saunders, C.A., Mueller, J.D., and Luxton, G.W.G. (2018). Fluorescence fluctuation spectroscopy reveals differential SUN protein oligomerization in living cells. *Mol. Biol. Cell* *29*, 1003–1011.
- Hernandez, M., Patzig, J., Mayoral, S.R., Costa, K.D., Chan, J.R., and Casaccia, P. (2016). Mechanostimulation Promotes Nuclear and Epigenetic Changes in Oligodendrocytes. *J. Neurosci.* *36*, 806–813.
- Herrmann, H., and Aebi, U. (2004). Intermediate filaments: molecular structure, assembly mechanism, and integration into functionally distinct intracellular Scaffolds. *Annu. Rev. Biochem.* *73*, 749–789.
- Higashida, C., Kiuchi, T., Akiba, Y., Mizuno, H., Maruoka, M., Narumiya, S., Mizuno, K., and Watanabe, N. (2013). F- and G-actin homeostasis regulates mechanosensitive actin nucleation by formins. *Nat. Cell Biol.* *15*, 395–405.
- Higuchi, H., and Takemori, S. (1989). Butanedione monoxime suppresses contraction and ATPase activity of rabbit skeletal muscle. *J. Biochem.* *105*, 638–643.
- Hirakawa, K., Hashizume, K., and Hayashi, T. (1981). [Viscoelastic property of human brain -for the analysis of impact injury (author's transl)]. *No To Shinkei* *33*, 1057–1065.

- Ho, C.Y., Jaalouk, D.E., Vartiainen, M.K., and Lammerding, J. (2013a). Lamin A/C and emerin regulate MKL1–SRF activity by modulating actin dynamics. *Nature* *497*, 507–511.
- Ho, C.Y., Jaalouk, D.E., Vartiainen, M.K., and Lammerding, J. (2013b). Lamin A/C and emerin regulate MKL1–SRF activity by modulating actin dynamics. *Nature* *497*, 507–511.
- Ho, C.Y., Jaalouk, D.E., Vartiainen, M.K., and Lammerding, J. (2013c). Lamin A/C and emerin regulate MKL1–SRF activity by modulating actin dynamics. *Nature* *497*, 507–511.
- Hoffman, B.D., Grashoff, C., and Schwartz, M.A. (2011). Dynamic molecular processes mediate cellular mechanotransduction. *Nature* *475*, 316–323.
- Hoffmann, K., Dreger, C.K., Olins, A.L., Olins, D.E., Shultz, L.D., Lucke, B., Karl, H., Kaps, R., Müller, D., Vayá, A., et al. (2002). Mutations in the gene encoding the lamin B receptor produce an altered nuclear morphology in granulocytes (Pelger-Huët anomaly). *Nat. Genet.* *31*, 410–414.
- Hogg, N., Patzak, I., and Willenbrock, F. (2011). The insider’s guide to leukocyte integrin signalling and function. *Nat. Rev. Immunol.* *11*, 416–426.
- Höner, B., Citi, S., Kendrick-Jones, J., and Jockusch, B.M. (1988). Modulation of cellular morphology and locomotory activity by antibodies against myosin. *J. Cell Biol.* *107*, 2181–2189.
- Hotulainen, P., and Lappalainen, P. (2006). Stress fibers are generated by two distinct actin assembly mechanisms in motile cells. *J. Cell Biol.* *173*, 383–394.
- Huang, S., Chen, C.S., and Ingber, D.E. (1998). Control of cyclin D1, p27(Kip1), and cell cycle progression in human capillary endothelial cells by cell shape and cytoskeletal tension. *Mol. Biol. Cell* *9*, 3179–3193.
- Huebsch, N., Arany, P.R., Mao, A.S., Shvartsman, D., Ali, O.A., Bencherif, S.A., Rivera-Feliciano, J., and Mooney, D.J. (2010). Harnessing traction-mediated manipulation of the cell/matrix interface to control stem-cell fate. *Nature Materials* *9*, 518–526.
- Hülsmann, B.B., Labokha, A.A., and Görlich, D. (2012). The permeability of reconstituted nuclear pores provides direct evidence for the selective phase model. *Cell* *150*, 738–751.
- Huxley, H.E. (1963). ELECTRON MICROSCOPE STUDIES ON THE STRUCTURE OF NATURAL AND SYNTHETIC PROTEIN FILAMENTS FROM STRIATED MUSCLE. *J. Mol. Biol.* *7*, 281–308.

- Hynes, R.O., and Naba, A. (2012). Overview of the matrisome--an inventory of extracellular matrix constituents and functions. *Cold Spring Harb Perspect Biol* *4*, a004903.
- Ihalainen, T.O., Aires, L., Herzog, F.A., Schwartlander, R., Moeller, J., and Vogel, V. (2015a). Differential basal-to-apical accessibility of lamin A/C epitopes in the nuclear lamina regulated by changes in cytoskeletal tension. *Nat Mater*.
- Ihalainen, T.O., Aires, L., Herzog, F.A., Schwartlander, R., Moeller, J., and Vogel, V. (2015b). Differential basal-to-apical accessibility of lamin A/C epitopes in the nuclear lamina regulated by changes in cytoskeletal tension. *Nat Mater*.
- Ingber, D.E. (2003). Mechanosensation through integrins: cells act locally but think globally. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *100*, 1472–1474.
- Ingber, D.E., Prusty, D., Sun, Z., Betensky, H., and Wang, N. (1995). Cell shape, cytoskeletal mechanics, and cell cycle control in angiogenesis. *J Biomech* *28*, 1471–1484.
- Ip, Y.T., and Davis, R.J. (1998). Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase (JNK) — from inflammation to development. *Current Opinion in Cell Biology* *10*, 205–219.
- Iskratsch, T., Yu, C.-H., Mathur, A., Liu, S., Stévenin, V., Dwyer, J., Hone, J., Ehler, E., and Sheetz, M. (2013). FHOD1 Is Needed for Directed Forces and Adhesion Maturation during Cell Spreading and Migration. *Developmental Cell* *27*, 545–559.
- Ivanova, N., Dobrin, R., Lu, R., Kotenko, I., Levorse, J., DeCoste, C., Schafer, X., Lun, Y., and Lemischka, I.R. (2006). Dissecting self-renewal in stem cells with RNA interference. *Nature* *442*, 533–538.
- Ivorra, C., Kubicek, M., González, J.M., Sanz-González, S.M., Alvarez-Barrientos, A., O'Connor, J.-E., Burke, B., and Andrés, V. (2006). A mechanism of AP-1 suppression through interaction of c-Fos with lamin A/C. *Genes Dev.* *20*, 307–320.
- Iwig, M., Czeslick, E., Müller, A., Gruner, M., Spindler, M., and Glaesser, D. (1995). Growth regulation by cell shape alteration and organization of the cytoskeleton. *Eur. J. Cell Biol.* *67*, 145–157.
- Iyer, K.V., Pulford, S., Mogilner, A., and Shivashankar, G.V. (2012). Mechanical activation of cells induces chromatin remodeling preceding MKL nuclear transport. *Biophys. J.* *103*, 1416–1428.
- Izard, T., and Vornrhein, C. (2004). Structural basis for amplifying vinculin activation by talin. *J. Biol. Chem.* *279*, 27667–27678.

- Izzard, C.S., and Lochner, L.R. (1976). Cell-to-substrate contacts in living fibroblasts: an interference reflexion study with an evaluation of the technique. *J. Cell. Sci.* *21*, 129–159.
- Jahed, Z., Shams, H., and Mofrad, M.R.K. (2015). A Disulfide Bond Is Required for the Transmission of Forces through SUN-KASH Complexes. *Biophys. J.* *109*, 501–509.
- Jalali, S., del Pozo, M.A., Chen, K., Miao, H., Li, Y., Schwartz, M.A., Shyy, J.Y., and Chien, S. (2001). Integrin-mediated mechanotransduction requires its dynamic interaction with specific extracellular matrix (ECM) ligands. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *98*, 1042–1046.
- Janmey, P.A., and Miller, R.T. (2011). Mechanisms of mechanical signaling in development and disease. *J. Cell. Sci.* *124*, 9–18.
- Janmey, P.A., Wells, R.G., Assoian, R.K., and McCulloch, C.A. (2013). From tissue mechanics to transcription factors. *Differentiation* *86*, 112–120.
- Janna K. Mouw, Guanqing Ou & Valerie M. Weaver (2014). Extracellular matrix assembly: a multiscale deconstruction. *Nat Rev Mol Cell Biol.*
- Jégou, A., Carlier, M.-F., and Romet-Lemonne, G. (2013). Formin mDia1 senses and generates mechanical forces on actin filaments. *Nat Commun* *4*, 1883.
- Jensen, A.S., Baandrup, U., Hasenkam, J.M., Kundu, T., and Jørgensen, C.S. (2006). Distribution of the microelastic properties within the human anterior mitral leaflet. *Ultrasound Med Biol* *32*, 1943–1948.
- Jiang, X.-Z., Yang, M.-G., Huang, L.-H., Li, C.-Q., and Xing, X.-W. (2011). SPAG4L, a novel nuclear envelope protein involved in the meiotic stage of spermatogenesis. *DNA Cell Biol.* *30*, 875–882.
- Johnson, R.P., and Craig, S.W. (1994). An intramolecular association between the head and tail domains of vinculin modulates talin binding. *J. Biol. Chem.* *269*, 12611–12619.
- Kadonaga, J.T., Carner, K.R., Masiarz, F.R., and Tjian, R. (1987). Isolation of cDNA encoding transcription factor Sp1 and functional analysis of the DNA binding domain. *Cell* *51*, 1079–1090.
- Kaiser, T.E., Intine, R.V., and Dundr, M. (2008). De novo formation of a subnuclear body. *Science* *322*, 1713–1717.
- Kanchanawong, P., Shtengel, G., Pasapera, A.M., Ramko, E.B., Davidson, M.W., Hess, H.F., and Waterman, C.M. (2010). Nanoscale architecture of integrin-based cell adhesions. *Nature* *468*, 580–584.

- Kaunas, R., Nguyen, P., Usami, S., and Chien, S. (2005). Cooperative effects of Rho and mechanical stretch on stress fiber organization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *102*, 15895–15900.
- Kaunas, R., Usami, S., and Chien, S. (2006). Regulation of stretch-induced JNK activation by stress fiber orientation. *Cell. Signal.* *18*, 1924–1931.
- Ketema, M., Wilhelmsen, 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.
- 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.
- Khatau, S.B., Hale, C.M., Stewart-Hutchinson, P.J., Patel, M.S., Stewart, C.L., Searson, P.C., Hodzic, D., and Wirtz, D. (2009). A perinuclear actin cap regulates nuclear shape. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *106*, 19017–19022.
- Khatau, S.B., Bloom, R.J., Bajpai, S., Razafsky, D., Zang, S., Giri, A., Wu, P.-H., Marchand, J., Celedon, A., Hale, C.M., et al. (2012). The distinct roles of the nucleus and nucleus-cytoskeleton connections in three-dimensional cell migration. *Scientific Reports* *2*, 488.
- Khetan, S., Guvendiren, M., Legant, W.R., Cohen, D.M., Chen, C.S., and Burdick, J.A. (2013). Degradation-mediated cellular traction directs stem cell fate in covalently crosslinked three-dimensional hydrogels. *Nature Materials* *12*, 458–465.
- Kim, D.-H., and Wirtz, D. (2015a). Cytoskeletal tension induces the polarized architecture of the nucleus. *Biomaterials* *48*, 161–172.
- Kim, D.-H., and Wirtz, D. (2015b). Cytoskeletal tension induces the polarized architecture of the nucleus. *Biomaterials* *48*, 161–172.
- Kim, J.-H., and Asthagiri, A.R. (2011). Matrix stiffening sensitizes epithelial cells to EGF and enables the loss of contact inhibition of proliferation. *J. Cell. Sci.* *124*, 1280–1287.
- Kim, D.-H., Khatau, S.B., Feng, Y., Walcott, S., Sun, S.X., Longmore, G.D., and Wirtz, D. (2012a). Actin cap associated focal adhesions and their distinct role in cellular mechanosensing. *Sci Rep* *2*, 555.
- Kim, D.-H., Khatau, S.B., Feng, Y., Walcott, S., Sun, S.X., Longmore, G.D., and Wirtz, D. (2012b). Actin cap associated focal adhesions and their distinct role in cellular mechanosensing. *Sci Rep* *2*, 555.



- Kim, D.-H., Cho, S., and Wirtz, D. (2014). Tight coupling between nucleus and cell migration through the perinuclear actin cap. *J. Cell. Sci.* *127*, 2528–2541.
- Kim, J.-K., Louhghalam, A., Lee, G., Schafer, B.W., Wirtz, D., and Kim, D.-H. (2017). Nuclear lamin A/C harnesses the perinuclear apical actin cables to protect nuclear morphology. *Nat Commun* *8*, 2123.
- Kim, J.-M., Liu, H., Tazaki, M., Nagata, M., and Aoki, F. (2003). Changes in histone acetylation during mouse oocyte meiosis. *J. Cell Biol.* *162*, 37–46.
- Kirby, T.J., and Lammerding, J. (2018). Emerging views of the nucleus as a cellular mechanosensor. *Nat. Cell Biol.* *20*, 373–381.
- Kiseleva, E., Drummond, S.P., Goldberg, M.W., Rutherford, S.A., Allen, T.D., and Wilson, K.L. (2004). Actin- and protein-4.1-containing filaments link nuclear pore complexes to subnuclear organelles in *Xenopus* oocyte nuclei. *J. Cell. Sci.* *117*, 2481–2490.
- Kito, H., Chen, E.L., Wang, X., Ikeda, M., Azuma, N., Nakajima, N., Gahtan, V., and Sumpio, B.E. (2000). Role of mitogen-activated protein kinases in pulmonary endothelial cells exposed to cyclic strain. *J. Appl. Physiol.* *89*, 2391–2400.
- Klein, E.A., Yin, L., Kothapalli, D., Castagnino, P., Byfield, F.J., Xu, T., Levental, I., Hawthorne, E., Janmey, P.A., and Assoian, R.K. (2009). Cell-cycle control by physiological matrix elasticity and in vivo tissue stiffening. *Curr. Biol.* *19*, 1511–1518.
- Ko, D., and Kim, S. (2018). Cooperation between ZEB2 and Sp1 promotes cancer cell survival and angiogenesis during metastasis through induction of survivin and VEGF. *Oncotarget* *9*, 726–742.
- Kong, F., García, A.J., Mould, A.P., Humphries, M.J., and Zhu, C. (2009). Demonstration of catch bonds between an integrin and its ligand. *The Journal of Cell Biology* *185*, 1275–1284.
- Köppen, M., Fernández, B.G., Carvalho, L., Jacinto, A., and Heisenberg, C.-P. (2006). Coordinated cell-shape changes control epithelial movement in zebrafish and *Drosophila*. *Development* *133*, 2671–2681.
- Kovacic, J.C., Moreno, P., Nabel, E.G., Hachinski, V., and Fuster, V. (2011). Cellular senescence, vascular disease, and aging: part 2 of a 2-part review: clinical vascular disease in the elderly. *Circulation* *123*, 1900–1910.
- Kozma, R., Ahmed, S., Best, A., and Lim, L. (1995). The Ras-related protein Cdc42Hs and bradykinin promote formation of peripheral actin microspikes and filopodia in Swiss 3T3 fibroblasts. *Mol. Cell. Biol.* *15*, 1942–1952.

- Krohne, G., Waizenegger, I., and Höger, T.H. (1989). The conserved carboxy-terminal cysteine of nuclear lamins is essential for lamin association with the nuclear envelope. *J. Cell Biol.* *109*, 2003–2011.
- Kruhlak, M.J., Hendzel, M.J., Fischle, W., Bertos, N.R., Hameed, S., Yang, X.J., Verdin, E., and Bazett-Jones, D.P. (2001). Regulation of global acetylation in mitosis through loss of histone acetyltransferases and deacetylases from chromatin. *J. Biol. Chem.* *276*, 38307–38319.
- Kumar, A., Mazzanti, M., Mistrik, M., Kosar, M., Beznoussenko, G.V., Mironov, A.A., Garrè, M., Parazzoli, D., Shivashankar, G.V., Scita, G., et al. (2014). ATR mediates a checkpoint at the nuclear envelope in response to mechanical stress. *Cell* *158*, 633–646.
- Kuo, J.-C., Han, X., Hsiao, C.-T., Yates, J.R., and Waterman, C.M. (2011a). Analysis of the myosin-II-responsive focal adhesion proteome reveals a role for  $\beta$ -Pix in negative regulation of focal adhesion maturation. *Nat. Cell Biol.* *13*, 383–393.
- Kuo, J.-C., Han, X., Hsiao, C.-T., Yates, J.R., and Waterman, C.M. (2011b). Analysis of the myosin-II-responsive focal adhesion proteome reveals a role for  $\beta$ -Pix in negative regulation of focal adhesion maturation. *Nat. Cell Biol.* *13*, 383–393.
- Kuroda, M., Wada, H., Kimura, Y., Ueda, K., and Kioka, N. (2017). Vinculin promotes nuclear localization of TAZ to inhibit ECM stiffness-dependent differentiation into adipocytes. *J. Cell. Sci.* *130*, 989–1002.
- Kutscheidt, S., Zhu, R., Antoku, S., Luxton, G.W.G., Stagljar, I., Fackler, O.T., and Gundersen, G.G. (2014). FHOD1 interaction with nesprin-2G mediates TAN line formation and nuclear movement. *Nat. Cell Biol.* *16*, 708–715.
- Kwon, H.J., and Yasuda, K. (2013). Chondrogenesis on sulfonate-coated hydrogels is regulated by their mechanical properties. *J Mech Behav Biomed Mater* *17*, 337–346.
- Labat-Robert, J., Bihari-Varga, M., and Robert, L. (1990). Extracellular matrix. *FEBS Lett.* *268*, 386–393.
- Laguri, C., Gilquin, B., Wolff, N., Romi-Lebrun, R., Courchay, K., Callebaut, I., Worman, H.J., and Zinn-Justin, S. (2001). Structural characterization of the LEM motif common to three human inner nuclear membrane proteins. *Structure* *9*, 503–511.
- Lammerding, J., Schulze, P.C., Takahashi, T., Kozlov, S., Sullivan, T., Kamm, R.D., Stewart, C.L., and Lee, R.T. (2004). Lamin A/C deficiency causes defective nuclear mechanics and mechanotransduction. *J. Clin. Invest.* *113*, 370–378.
- Lammerding, J., Fong, L.G., Ji, J.Y., Reue, K., Stewart, C.L., Young, S.G., and Lee, R.T. (2006). Lamins A and C but not lamin B1 regulate nuclear mechanics. *J. Biol. Chem.* *281*, 25768–25780.

- Lämmermann, T., Bader, B.L., Monkley, S.J., Worbs, T., Wedlich-Söldner, R., Hirsch, K., Keller, M., Förster, R., Critchley, D.R., Fässler, R., et al. (2008). Rapid leukocyte migration by integrin-independent flowing and squeezing. *Nature* *453*, 51–55.
- Lamouille, S., Xu, J., and Derynck, R. (2014). Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *15*, 178–196.
- Lancaster, O.M., Le Berre, M., Dimitracopoulos, A., Bonazzi, D., Zlotek-Zlotkiewicz, E., Picone, R., Duke, T., Piel, M., and Baum, B. (2013). Mitotic Rounding Alters Cell Geometry to Ensure Efficient Bipolar Spindle Formation. *Developmental Cell* *25*, 270–283.
- Lanctôt, C., Cheutin, T., Cremer, M., Cavalli, G., and Cremer, T. (2007). Dynamic genome architecture in the nuclear space: regulation of gene expression in three dimensions. *Nature Reviews Genetics* *8*, 104–115.
- Langevin, H.M., Bouffard, N.A., Badger, G.J., Iatridis, J.C., and Howe, A.K. (2005). Dynamic fibroblast cytoskeletal response to subcutaneous tissue stretch ex vivo and in vivo. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* *288*, C747-756.
- Langevin, H.M., Storch, K.N., Snapp, R.R., Bouffard, N.A., Badger, G.J., Howe, A.K., and Taatjes, D.J. (2010). Tissue stretch induces nuclear remodeling in connective tissue fibroblasts. *Histochem. Cell Biol.* *133*, 405–415.
- Lattanzi, G., Benedetti, S., D’Apice, M.R., Maggi, L., Carboni, N., Scarano, E., and Politano, L. (2016). Emerging perspectives on laminopathies.
- Lauffenburger, D.A., and Horwitz, A.F. (1996). Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell* *84*, 359–369.
- Le, H.Q., Ghatak, S., Yeung, C.-Y.C., Tellkamp, F., Günschmann, C., Dieterich, C., Yeroslaviz, A., Habermann, B., Pombo, A., Niessen, C.M., et al. (2016). Mechanical regulation of transcription controls Polycomb-mediated gene silencing during lineage commitment. *Nat. Cell Biol.* *18*, 864–875.
- Le Berre, M., Aubertin, J., and Piel, M. (2012). Fine control of nuclear confinement identifies a threshold deformation leading to lamina rupture and induction of specific genes. *Integr Biol (Camb)* *4*, 1406–1414.
- Lee, H.J., Ewere, A., Diaz, M.F., and Wenzel, P.L. (2018). TAZ responds to fluid shear stress to regulate the cell cycle. *Cell Cycle* *17*, 147–153.
- Lei, K., Zhu, X., Xu, R., Shao, C., Xu, T., Zhuang, Y., and Han, M. (2012). Inner nuclear envelope proteins SUN1 and SUN2 play a prominent role in the DNA damage response. *Curr. Biol.* *22*, 1609–1615.

- Lele, T.P., Dickinson, R.B., and Gundersen, G.G. (2018). Mechanical principles of nuclear shaping and positioning. *The Journal of Cell Biology* *217*, 3330–3342.
- Lessey, E.C., Guilluy, C., and Burridge, K. (2012a). From Mechanical Force to RhoA Activation. *Biochemistry* *51*, 7420–7432.
- Lessey, E.C., Guilluy, C., and Burridge, K. (2012b). From Mechanical Force to RhoA Activation. *Biochemistry* *51*, 7420–7432.
- Letsou, G.V., Rosales, O., Maitz, S., Vogt, A., and Sumpio, B.E. (1990). Stimulation of adenylate cyclase activity in cultured endothelial cells subjected to cyclic stretch. *J Cardiovasc Surg (Torino)* *31*, 634–639.
- Leung, T., Chen, X.Q., Manser, E., and Lim, L. (1996). The p160 RhoA-binding kinase ROK alpha is a member of a kinase family and is involved in the reorganization of the cytoskeleton. *Mol. Cell. Biol.* *16*, 5313–5327.
- Li, G., and Reinberg, D. (2011). Chromatin higher-order structures and gene regulation. *Curr. Opin. Genet. Dev.* *21*, 175–186.
- Li, Y., Lovett, D., Zhang, Q., Neelam, S., Kuchibhotla, R.A., Zhu, R., Gundersen, G.G., Lele, T.P., and Dickinson, R.B. (2015). Moving Cell Boundaries Drive Nuclear Shaping during Cell Spreading. *Biophys. J.* *109*, 670–686.
- Libotte, T., Zaim, H., Abraham, S., Padmakumar, V.C., Schneider, M., Lu, W., Munck, M., Hutchison, C., Wehnert, M., Fahrenkrog, B., et al. (2005). Lamin A/C-dependent localization of Nesprin-2, a giant scaffold at the nuclear envelope. *Mol. Biol. Cell* *16*, 3411–3424.
- Lin, F., and Worman, H.J. (1993). Structural organization of the human gene encoding nuclear lamin A and nuclear lamin C. *J. Biol. Chem.* *268*, 16321–16326.
- Lin, F., and Worman, H.J. (1995). Structural organization of the human gene (LMNB1) encoding nuclear lamin B1. *Genomics* *27*, 230–236.
- Liu, J., Rolef Ben-Shahar, T., Riemer, D., Treinin, M., Spann, P., Weber, K., Fire, A., and Gruenbaum, Y. (2000). Essential roles for *Caenorhabditis elegans* lamin gene in nuclear organization, cell cycle progression, and spatial organization of nuclear pore complexes. *Mol. Biol. Cell* *11*, 3937–3947.
- Liu, J., Lee, K.K., Segura-Totten, M., Neufeld, E., Wilson, K.L., and Gruenbaum, Y. (2003). MAN1 and emerin have overlapping function(s) essential for chromosome segregation and cell division in *Caenorhabditis elegans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *100*, 4598–4603.

- Liu, W.F., Nelson, C.M., Tan, J.L., and Chen, C.S. (2007). Cadherins, RhoA, and Rac1 are differentially required for stretch-mediated proliferation in endothelial versus smooth muscle cells. *Circ. Res.* *101*, e44-52.
- Lo, C.M., Wang, H.B., Dembo, M., and Wang, Y.L. (2000). Cell movement is guided by the rigidity of the substrate. *Biophys. J.* *79*, 144–152.
- Lottersberger, F., Karssemeijer, R.A., Dimitrova, N., and de Lange, T. (2015). 53BP1 and the LINC Complex Promote Microtubule-Dependent DSB Mobility and DNA Repair. *Cell* *163*, 880–893.
- Lovett, D.B., Shekhar, N., Nickerson, J.A., Roux, K.J., and Lele, T.P. (2013). Modulation of Nuclear Shape by Substrate Rigidity. *Cell Mol Bioeng* *6*, 230–238.
- Lucero, H.A., and Kagan, H.M. (2006). Lysyl oxidase: an oxidative enzyme and effector of cell function. *Cell. Mol. Life Sci.* *63*, 2304–2316.
- Lui, C., Lee, K., and Nelson, C.M. (2012). Matrix compliance and RhoA direct the differentiation of mammary progenitor cells. *Biomech Model Mechanobiol* *11*, 1241–1249.
- Luo, B.-H., Carman, C.V., and Springer, T.A. (2007). Structural Basis of Integrin Regulation and Signaling. *Annual Review of Immunology* *25*, 619–647.
- Lupas, A., Van Dyke, M., and Stock, J. (1991). Predicting coiled coils from protein sequences. *Science* *252*, 1162–1164.
- Luxton, G.W.G., Gomes, E.R., Folker, E.S., Vintinner, E., and Gundersen, G.G. (2010). Linear arrays of nuclear envelope proteins harness retrograde actin flow for nuclear movement. *Science* *329*, 956–959.
- Luxton, G.W.G., Gomes, E.R., Folker, E.S., Worman, H.J., and Gundersen, G.G. (2011). TAN lines: a novel nuclear envelope structure involved in nuclear positioning. *Nucleus* *2*, 173–181.
- Lyman, S.K., Guan, T., Bednenko, J., Wodrich, H., and Gerace, L. (2002). Influence of cargo size on Ran and energy requirements for nuclear protein import. *J. Cell Biol.* *159*, 55–67.
- Ma, L., Tsai, M.-Y., Wang, S., Lu, B., Chen, R., Yates, J.R., Zhu, X., and Zheng, Y. (2009). Requirement for Nudel and dynein for assembly of the lamin B spindle matrix. *Nat. Cell Biol.* *11*, 247–256.
- MacKenna, D.A., Dolfi, F., Vuori, K., and Ruoslahti, E. (1998). Extracellular signal-regulated kinase and c-Jun NH2-terminal kinase activation by mechanical stretch is

integrin-dependent and matrix-specific in rat cardiac fibroblasts. *J. Clin. Invest.* *101*, 301–310.

Madrid, A.S., Mancuso, J., Cande, W.Z., and Weis, K. (2006). The role of the integral membrane nucleoporins Ndc1p and Pom152p in nuclear pore complex assembly and function. *J. Cell Biol.* *173*, 361–371.

Maganaris, C.N. (2001). Force–length characteristics of in vivo human skeletal muscle. *Acta Physiologica Scandinavica* *172*, 279–285.

Majno, G., and Joris, I. (1995). Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol* *146*, 3–15.

Malone, C.J., Misner, L., Le Bot, N., Tsai, M.-C., Campbell, J.M., Ahringer, J., and White, J.G. (2003). The *C. elegans* hook protein, ZYG-12, mediates the essential attachment between the centrosome and nucleus. *Cell* *115*, 825–836.

Mammoto, A., Huang, S., Moore, K., Oh, P., and Ingber, D.E. (2004). Role of RhoA, mDia, and ROCK in cell shape-dependent control of the Skp2-p27kip1 pathway and the G1/S transition. *J. Biol. Chem.* *279*, 26323–26330.

Maniotis, A.J., Chen, C.S., and Ingber, D.E. (1997a). Demonstration of mechanical connections between integrins, cytoskeletal filaments, and nucleoplasm that stabilize nuclear structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *94*, 849–854.

Maniotis, A.J., Chen, C.S., and Ingber, D.E. (1997b). Demonstration of mechanical connections between integrins, cytoskeletal filaments, and nucleoplasm that stabilize nuclear structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *94*, 849–854.

Marchand, M., Monnot, C., Muller, L., and Germain, S. (2018). Extracellular matrix scaffolding in angiogenesis and capillary homeostasis. *Semin. Cell Dev. Biol.*

Margalit, A., Segura-Totten, M., Gruenbaum, Y., and Wilson, K.L. (2005). Barrier-to-autointegration factor is required to segregate and enclose chromosomes within the nuclear envelope and assemble the nuclear lamina. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *102*, 3290–3295.

Marinissen, M.J., Chiariello, M., Tanos, T., Bernard, O., Narumiya, S., and Gutkind, J.S. (2004). The small GTP-binding protein RhoA regulates c-jun by a ROCK-JNK signaling axis. *Mol. Cell* *14*, 29–41.

Markiewicz, E., Tilgner, K., Barker, N., van de Wetering, M., Clevers, H., Dorobek, M., Hausmanowa-Petrusewicz, I., Ramaekers, F.C.S., Broers, J.L.V., Blankesteyjn, W.M., et al. (2006). The inner nuclear membrane protein emerin regulates beta-catenin activity by restricting its accumulation in the nucleus. *EMBO J.* *25*, 3275–3285.

- Martinac, B. (2004). Mechanosensitive ion channels: molecules of mechanotransduction. *J. Cell. Sci.* *117*, 2449–2460.
- Mathur, A.B., Reichert, W.M., and Truskey, G.A. (2007). Flow and High Affinity Binding Affect the Elastic Modulus of the Nucleus, Cell Body and the Stress Fibers of Endothelial Cells. *Ann Biomed Eng* *35*, 1120–1130.
- Matsumoto, A., Hieda, M., Yokoyama, Y., Nishioka, Y., Yoshidome, K., Tsujimoto, M., and Matsuura, N. (2015). Global loss of a nuclear lamina component, lamin A/C, and LINC complex components SUN1, SUN2, and nesprin-2 in breast cancer. *Cancer Medicine* *4*, 1547–1557.
- Matthews, H.K., Delabre, U., Rohn, J.L., Guck, J., Kunda, P., and Baum, B. (2012). Changes in Ect2 localization couple actomyosin-dependent cell shape changes to mitotic progression. *Dev. Cell* *23*, 371–383.
- McGee, K.M., Vartiainen, M.K., Khaw, P.T., Treisman, R., and Bailly, M. (2011). Nuclear transport of the serum response factor coactivator MRTF-A is downregulated at tensional homeostasis. *EMBO Reports* *12*, 963–970.
- McKillop, D.F., Fortune, N.S., Ranatunga, K.W., and Geeves, M.A. (1994). The influence of 2,3-butanedione 2-monoxime (BDM) on the interaction between actin and myosin in solution and in skinned muscle fibres. *J. Muscle Res. Cell. Motil.* *15*, 309–318.
- McNamee, H.P., Liley, H.G., and Ingber, D.E. (1996). Integrin-dependent control of inositol lipid synthesis in vascular endothelial cells and smooth muscle cells. *Exp. Cell Res.* *224*, 116–122.
- Meier, J., and Georgatos, S.D. (1994). Type B lamins remain associated with the integral nuclear envelope protein p58 during mitosis: implications for nuclear reassembly. *The EMBO Journal* *13*, 1888–1898.
- Meng, Z., Moroishi, T., and Guan, K.-L. (2016). Mechanisms of Hippo pathway regulation. *Genes Dev.* *30*, 1–17.
- Meng, Z., Qiu, Y., Lin, K.C., Kumar, A., Placone, J.K., Fang, C., Wang, K.-C., Lu, S., Pan, M., Hong, A.W., et al. (2018). RAP2 mediates mechanoresponses of the Hippo pathway. *Nature* *560*, 655–660.
- Meshel, A.S., Wei, Q., Adelstein, R.S., and Sheetz, M.P. (2005). Basic mechanism of three-dimensional collagen fibre transport by fibroblasts. *Nat. Cell Biol.* *7*, 157–164.
- Mewborn, S.K., Puckelwartz, M.J., Abuisneineh, F., Fahrenbach, J.P., Zhang, Y., MacLeod, H., Dellefave, L., Pytel, P., Selig, S., Labno, C.M., et al. (2010). Altered

chromosomal positioning, compaction, and gene expression with a lamin A/C gene mutation. *PLoS ONE* *5*, e14342.

Michel, J.-B., Li, Z., and Lacolley, P. (2012). Smooth muscle cells and vascular diseases. *Cardiovasc. Res.* *95*, 135–137.

Miller, K., Chinzei, K., Orssengo, G., and Bednarz, P. (2000). Mechanical properties of brain tissue in-vivo: experiment and computer simulation. *J Biomech* *33*, 1369–1376.

Miralles, F., Posern, G., Zaromytidou, A.-I., and Treisman, R. (2003a). Actin dynamics control SRF activity by regulation of its coactivator MAL. *Cell* *113*, 329–342.

Miralles, F., Posern, G., Zaromytidou, A.-I., and Treisman, R. (2003b). Actin dynamics control SRF activity by regulation of its coactivator MAL. *Cell* *113*, 329–342.

Mislow, J.M.K., Holaska, J.M., Kim, M.S., Lee, K.K., Segura-Totten, M., Wilson, K.L., and McNally, E.M. (2002). Nesprin-1alpha self-associates and binds directly to emerin and lamin A in vitro. *FEBS Lett.* *525*, 135–140.

Mitchison, T., and Kirschner, M. (1988). Cytoskeletal dynamics and nerve growth. *Neuron* *1*, 761–772.

Mohr, D., Frey, S., Fischer, T., Güttler, T., and Görlich, D. (2009). Characterisation of the passive permeability barrier of nuclear pore complexes. *EMBO J.* *28*, 2541–2553.

Moon, J.J., Matsumoto, M., Patel, S., Lee, L., Guan, J.-L., and Li, S. (2005). Role of cell surface heparan sulfate proteoglycans in endothelial cell migration and mechanotransduction. *Journal of Cellular Physiology* *203*, 166–176.

Morimoto, A., Shibuya, H., Zhu, X., Kim, J., Ishiguro, K., Han, M., and Watanabe, Y. (2012). A conserved KASH domain protein associates with telomeres, SUN1, and dynactin during mammalian meiosis. *J Cell Biol* *198*, 165–172.

Mosher, D.F., and Schad, P.E. (1979). Cross-linking of fibronectin to collagen by blood coagulation Factor XIIIa. *J Clin Invest* *64*, 781–787.

Mott, J.D., and Werb, Z. (2004). Regulation of matrix biology by matrix metalloproteinases. *Curr. Opin. Cell Biol.* *16*, 558–564.

Mow, V.C. (1977). Biphasic rheological properties of cartilage [proceedings]. *Bull Hosp Joint Dis* *38*, 121–124.

Mullins, R.D., Heuser, J.A., and Pollard, T.D. (1998). The interaction of Arp2/3 complex with actin: nucleation, high affinity pointed end capping, and formation of branching networks of filaments. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *95*, 6181–6186.



- Nakajima, H., Yamamoto, K., Agarwala, S., Terai, K., Fukui, H., Fukuhara, S., Ando, K., Miyazaki, T., Yokota, Y., Schmelzer, E., et al. (2017). Flow-Dependent Endothelial YAP Regulation Contributes to Vessel Maintenance. *Dev. Cell* *40*, 523–536.e6.
- Nam, E.-H., Lee, Y., Park, Y.-K., Lee, J.W., and Kim, S. (2012). ZEB2 upregulates integrin  $\alpha 5$  expression through cooperation with Sp1 to induce invasion during epithelial-mesenchymal transition of human cancer cells. *Carcinogenesis* *33*, 563–571.
- Nam, E.-H., Lee, Y., Zhao, X.-F., Park, Y.-K., Lee, J.W., and Kim, S. (2014). ZEB2-Sp1 cooperation induces invasion by upregulating cadherin-11 and integrin  $\alpha 5$  expression. *Carcinogenesis* *35*, 302–314.
- Neelam, S., Hayes, P.R., Zhang, Q., Dickinson, R.B., and Lele, T.P. (2016). Vertical uniformity of cells and nuclei in epithelial monolayers. *Sci Rep* *6*, 19689.
- Nie, S., Ke, H., Gao, F., Ren, J., Wang, M., Huo, L., Gong, W., and Feng, W. (2016). Coiled-Coil Domains of SUN Proteins as Intrinsic Dynamic Regulators. *Structure* *24*, 80–91.
- Nobes, C.D., and Hall, A. (1995). Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell* *81*, 53–62.
- Oakes, P.W., Beckham, Y., Stricker, J., and Gardel, M.L. (2012). Tension is required but not sufficient for focal adhesion maturation without a stress fiber template. *J Cell Biol* *196*, 363–374.
- O’Halloran, T., and Burridge, K. (1986). Purification of a 190 kDa protein from smooth muscle: relationship to talin. *Biochim. Biophys. Acta* *869*, 337–349.
- Olmos, Y., Hodgson, L., Mantell, J., Verkade, P., and Carlton, J.G. (2015). ESCRT-III controls nuclear envelope reformation. *Nature* *522*, 236–239.
- Osada, S.-I., Ohmori, S., and Taira, M. (2003). XMAN1, an inner nuclear membrane protein, antagonizes BMP signaling by interacting with Smad1 in *Xenopus* embryos. *Development* *130*, 1783–1794.
- Padmakumar, V.C., Abraham, S., Braune, S., Noegel, A.A., Tunggal, B., Karakesisoglou, I., and Korenbaum, E. (2004). Enaptin, a giant actin-binding protein, is an element of the nuclear membrane and the actin cytoskeleton. *Exp. Cell Res.* *295*, 330–339.
- Padmakumar, V.C., Libotte, T., Lu, W., Zaim, H., Abraham, S., Noegel, A.A., Gotzmann, J., Foisner, R., and Karakesisoglou, I. (2005). The inner nuclear membrane protein Sun1 mediates the anchorage of Nesprin-2 to the nuclear envelope. *J. Cell. Sci.* *118*, 3419–3430.

- Pajerowski, J.D., Dahl, K.N., Zhong, F.L., Sammak, P.J., and Discher, D.E. (2007). Physical plasticity of the nucleus in stem cell differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *104*, 15619–15624.
- Pan, D. (2010). The hippo signaling pathway in development and cancer. *Dev. Cell* *19*, 491–505.
- Papagrigoriou, E., Gingras, A.R., Barsukov, I.L., Bate, N., Fillingham, I.J., Patel, B., Frank, R., Ziegler, W.H., Roberts, G.C.K., Critchley, D.R., et al. (2004). Activation of a vinculin-binding site in the talin rod involves rearrangement of a five-helix bundle. *EMBO J.* *23*, 2942–2951.
- Pappas, G.D. (1956). The fine structure of the nuclear envelope of *Amoeba proteus*. *J Biophys Biochem Cytol* *2*, 431–434.
- Parise, P., Finocchiaro, G., Masciadri, B., Quarto, M., Francois, S., Mancuso, F., and Muller, H. (2006). Lap2alpha expression is controlled by E2F and deregulated in various human tumors. *Cell Cycle* *5*, 1331–1341.
- Pasch, E., Link, J., Beck, C., Scheuerle, S., and Alsheimer, M. (2015). The LINC complex component Sun4 plays a crucial role in sperm head formation and fertility. *Biol Open* *4*, 1792–1802.
- Patel, B., Gingras, A.R., Bobkov, A.A., Fujimoto, L.M., Zhang, M., Liddington, R.C., Mazzeo, D., Emsley, J., Roberts, G.C.K., Barsukov, I.L., et al. (2006). The activity of the vinculin binding sites in talin is influenced by the stability of the helical bundles that make up the talin rod. *J. Biol. Chem.* *281*, 7458–7467.
- Pathak, M.M., Nourse, J.L., Tran, T., Hwe, J., Arulmoli, J., Le, D.T.T., Bernardis, E., Flanagan, L.A., and Tombola, F. (2014). Stretch-activated ion channel Piezo1 directs lineage choice in human neural stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *111*, 16148–16153.
- Patterson, K., Molofsky, A.B., Robinson, C., Acosta, S., Cater, C., and Fischer, J.A. (2004). The functions of Klarsicht and nuclear lamin in developmentally regulated nuclear migrations of photoreceptor cells in the *Drosophila* eye. *Mol. Biol. Cell* *15*, 600–610.
- Pelham, R.J., and Wang, Y. (1997). Cell locomotion and focal adhesions are regulated by substrate flexibility. *PNAS* *94*, 13661–13665.
- Perovanovic, J., Dell’Orso, S., Gnoch, V.F., Jaiswal, J.K., Sartorelli, V., Vigouroux, C., Mamchaoui, K., Mouly, V., Bonne, G., and Hoffman, E.P. (2016). Laminopathies disrupt epigenomic developmental programs and cell fate. *Sci Transl Med* *8*, 335ra58.

- Peter, M., Kitten, G.T., Lehner, C.F., Vorburger, K., Bailer, S.M., Maridor, G., and Nigg, E.A. (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.
- Peterson, L.J., Rajfur, Z., Maddox, A.S., Freel, C.D., Chen, Y., Edlund, M., Otey, C., and Burridge, K. (2004). Simultaneous Stretching and Contraction of Stress Fibers In Vivo. *Mol. Biol. Cell* *15*, 3497–3508.
- Petrie, R.J., and Yamada, K.M. (2015). Fibroblasts Lead the Way: A Unified View of 3D Cell Motility. *Trends in Cell Biology* *25*, 666–674.
- Petrie, R.J., Koo, H., and Yamada, K.M. (2014). Generation of compartmentalized pressure by a nuclear piston governs cell motility in a 3D matrix. *Science* *345*, 1062–1065.
- Peyton, S.R., and Putnam, A.J. (2005). Extracellular matrix rigidity governs smooth muscle cell motility in a biphasic fashion. *J. Cell. Physiol.* *204*, 198–209.
- Peyton, S.R., Raub, C.B., Keschrumrus, V.P., and Putnam, A.J. (2006). The use of poly(ethylene glycol) hydrogels to investigate the impact of ECM chemistry and mechanics on smooth muscle cells. *Biomaterials* *27*, 4881–4893.
- Pflicke, H., and Sixt, M. (2009). Preformed portals facilitate dendritic cell entry into afferent lymphatic vessels. *J. Exp. Med.* *206*, 2925–2935.
- Philip, J.T., and Dahl, K.N. (2008). Nuclear mechanotransduction: response of the lamina to extracellular stress with implications in aging. *J Biomech* *41*, 3164–3170.
- Philippar, U., Schrott, G., Dieterich, C., Müller, J.M., Galgóczy, P., Engel, F.B., Keating, M.T., Gertler, F., Schüle, R., Vingron, M., et al. (2004). The SRF target gene *Fhl2* antagonizes RhoA/MAL-dependent activation of SRF. *Mol. Cell* *16*, 867–880.
- Piccolo, S., Dupont, S., and Cordenonsi, M. (2014). The biology of YAP/TAZ: hippo signaling and beyond. *Physiol. Rev.* *94*, 1287–1312.
- Platani, M., Goldberg, I., Lamond, A.I., and Swedlow, J.R. (2002). Cajal body dynamics and association with chromatin are ATP-dependent. *Nat. Cell Biol.* *4*, 502–508.
- Plessner, M., Melak, M., Chinchilla, P., Baarlink, C., and Grosse, R. (2015). Nuclear F-actin formation and reorganization upon cell spreading. *J. Biol. Chem.* *290*, 11209–11216.
- Plopper, G., and Ingber, D.E. (1993). Rapid induction and isolation of focal adhesion complexes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *193*, 571–578.

- Plotnikov, S.V., Pasapera, A.M., Sabass, B., and Waterman, C.M. (2012). Force fluctuations within focal adhesions mediate ECM-rigidity sensing to guide directed cell migration. *Cell* *151*, 1513–1527.
- Pober, B.R., Johnson, M., and Urban, Z. (2008). Mechanisms and treatment of cardiovascular disease in Williams-Beuren syndrome. *J. Clin. Invest.* *118*, 1606–1615.
- Poh, Y.-C., Shevtsov, S.P., Chowdhury, F., Wu, D.C., Na, S., Dunder, M., and Wang, N. (2012). Dynamic force-induced direct dissociation of protein complexes in a nuclear body in living cells. *Nat Commun* *3*, 866.
- Polioudaki, H., Kourmouli, N., Drosou, V., Bakou, A., Theodoropoulos, P.A., Singh, P.B., Giannakouros, T., and Georgatos, S.D. (2001). Histones H3/H4 form a tight complex with the inner nuclear membrane protein LBR and heterochromatin protein 1. *EMBO Rep.* *2*, 920–925.
- Pollard, T.D. (2007). Regulation of actin filament assembly by Arp2/3 complex and formins. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* *36*, 451–477.
- Pollard, T.D., and Korn, E.D. (1973). Acanthamoeba myosin. I. Isolation from Acanthamoeba castellanii of an enzyme similar to muscle myosin. *J. Biol. Chem.* *248*, 4682–4690.
- Posern, G., and Treisman, R. (2006). Actin' together: serum response factor, its cofactors and the link to signal transduction. *Trends in Cell Biology* *16*, 588–596.
- Posern, G., Miralles, F., Guettler, S., and Treisman, R. (2004). Mutant actins that stabilise F-actin use distinct mechanisms to activate the SRF coactivator MAL. *EMBO J.* *23*, 3973–3983.
- Postel, R., Ketema, M., Kuikman, I., de Pereda, J.M., and Sonnenberg, A. (2011). Nesprin-3 augments peripheral nuclear localization of intermediate filaments in zebrafish. *J. Cell. Sci.* *124*, 755–764.
- Prager-Khoutorsky, M., Lichtenstein, A., Krishnan, R., Rajendran, K., Mayo, A., Kam, Z., Geiger, B., and Bershadsky, A.D. (2011). Fibroblast polarization is a matrix-rigidity-dependent process controlled by focal adhesion mechanosensing. *Nat. Cell Biol.* *13*, 1457–1465.
- Price, G.J., Jones, P., Davison, M.D., Patel, B., Bendori, R., Geiger, B., and Critchley, D.R. (1989). Primary sequence and domain structure of chicken vinculin. *Biochem. J.* *259*, 453–461.
- Provenzano, P.P., Inman, D.R., Eliceiri, K.W., Trier, S.M., and Keely, P.J. (2008). Contact guidance mediated three-dimensional cell migration is regulated by Rho/ROCK-dependent matrix reorganization. *Biophys. J.* *95*, 5374–5384.

Raab, M., Gentili, M., de Belly, H., Thiam, H.R., Vargas, P., Jimenez, A.J., Lautenschlaeger, F., Voituriez, R., Lennon-Duménil, A.M., Manel, N., et al. (2016a). ESCRT III repairs nuclear envelope ruptures during cell migration to limit DNA damage and cell death. *Science* *352*, 359–362.

Raab, M., Gentili, M., de Belly, H., Thiam, H.R., Vargas, P., Jimenez, A.J., Lautenschlaeger, F., Voituriez, R., Lennon-Duménil, A.M., Manel, N., et al. (2016b). ESCRT III repairs nuclear envelope ruptures during cell migration to limit DNA damage and cell death. *Science* *352*, 359–362.

Raharjo, W.H., Enarson, P., Sullivan, T., Stewart, C.L., and Burke, B. (2001). Nuclear envelope defects associated with LMNA mutations cause dilated cardiomyopathy and Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *J. Cell. Sci.* *114*, 4447–4457.

Raju, G.P., Dimova, N., Klein, P.S., and Huang, H.-C. (2003). SANE, a novel LEM domain protein, regulates bone morphogenetic protein signaling through interaction with Smad1. *J. Biol. Chem.* *278*, 428–437.

Reddy, K.L., Zullo, J.M., Bertolino, E., and Singh, H. (2008). Transcriptional repression mediated by repositioning of genes to the nuclear lamina. *Nature* *452*, 243–247.

Reinsch, S., and Karsenti, E. (1997). Movement of nuclei along microtubules in *Xenopus* egg extracts. *Curr. Biol.* *7*, 211–214.

Rho, J.Y., Roy, M.E., Tsui, T.Y., and Pharr, G.M. (1999). Elastic properties of microstructural components of human bone tissue as measured by nanoindentation. *J. Biomed. Mater. Res.* *45*, 48–54.

Ribeiro, A.J.S., Khanna, P., Sukumar, A., Dong, C., and Dahl, K.N. (2014). Nuclear stiffening inhibits migration of invasive melanoma cells. *Cell Mol Bioeng* *7*, 544–551.

Ridley, A.J., and Hall, A. (1992a). The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell* *70*, 389–399.

Ridley, A.J., and Hall, A. (1992b). Distinct patterns of actin organization regulated by the small GTP-binding proteins Rac and Rho. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* *57*, 661–671.

Ringer, P., Weißl, A., Cost, A.-L., Freikamp, A., Sabass, B., Mehlich, A., Tramier, M., Rief, M., and Grashoff, C. (2017). Multiplexing molecular tension sensors reveals piconewton force gradient across talin-1. *Nat. Methods* *14*, 1090–1096.

- del Rio, A., Perez-Jimenez, R., Liu, R., Roca-Cusachs, P., Fernandez, J.M., and Sheetz, M.P. (2009). Stretching single talin rod molecules activates vinculin binding. *Science* *323*, 638–641.
- Riveline, D., Zamir, E., Balaban, N.Q., Schwarz, U.S., Ishizaki, T., Narumiya, S., Kam, Z., Geiger, B., and Bershadsky, A.D. (2001a). Focal contacts as mechanosensors: externally applied local mechanical force induces growth of focal contacts by an mDia1-dependent and ROCK-independent mechanism. *J. Cell Biol.* *153*, 1175–1186.
- Riveline, D., Zamir, E., Balaban, N.Q., Schwarz, U.S., Ishizaki, T., Narumiya, S., Kam, Z., Geiger, B., and Bershadsky, A.D. (2001b). Focal contacts as mechanosensors: externally applied local mechanical force induces growth of focal contacts by an mDia1-dependent and ROCK-independent mechanism. *J. Cell Biol.* *153*, 1175–1186.
- Röber, R.A., Weber, K., and Osborn, M. (1989). Differential timing of nuclear lamin A/C expression in the various organs of the mouse embryo and the young animal: a developmental study. *Development* *105*, 365–378.
- Röber, R.A., Sauter, H., Weber, K., and Osborn, M. (1990). Cells of the cellular immune and hemopoietic system of the mouse lack lamins A/C: distinction versus other somatic cells. *J. Cell. Sci.* *95 ( Pt 4)*, 587–598.
- Roman, W., Martins, J.P., and Gomes, E.R. (2018). Local Arrangement of Fibronectin by Myofibroblasts Governs Peripheral Nuclear Positioning in Muscle Cells. *Dev. Cell* *46*, 102-111.e6.
- Romanauska, A., and Köhler, A. (2018). The Inner Nuclear Membrane Is a Metabolically Active Territory that Generates Nuclear Lipid Droplets. *Cell* *174*, 700-715.e18.
- Romet-Lemonne, G., and Jégou, A. (2013). Mechanotransduction down to individual actin filaments. *Eur. J. Cell Biol.* *92*, 333–338.
- Rothballer, A., Schwartz, T.U., and Kutay, U. (2013). LINCing complex functions at the nuclear envelope: what the molecular architecture of the LINC complex can reveal about its function. *Nucleus* *4*, 29–36.
- Rottner, K., Hall, A., and Small, J.V. (1999). Interplay between Rac and Rho in the control of substrate contact dynamics. *Curr. Biol.* *9*, 640–648.
- Roux, K.J., Crisp, M.L., Liu, Q., Kim, D., Kozlov, S., Stewart, C.L., and Burke, B. (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.

- Roux, K.J., Kim, D.I., Raida, M., and Burke, B. (2012). A promiscuous biotin ligase fusion protein identifies proximal and interacting proteins in mammalian cells. *J Cell Biol* *196*, 801–810.
- Rowat, A.C., Jaalouk, D.E., Zwirger, M., Ung, W.L., Eydelnant, I.A., Olins, D.E., Olins, A.L., Herrmann, H., Weitz, D.A., and Lammerding, J. (2013). Nuclear envelope composition determines the ability of neutrophil-type cells to passage through micron-scale constrictions. *J. Biol. Chem.* *288*, 8610–8618.
- Saez, A., Buguin, A., Silberzan, P., and Ladoux, B. (2005). Is the Mechanical Activity of Epithelial Cells Controlled by Deformations or Forces? *Biophysical Journal* *89*, L52–L54.
- Saez, A., Ghibaudo, M., Buguin, A., Silberzan, P., and Ladoux, B. (2007). Rigidity-driven growth and migration of epithelial cells on microstructured anisotropic substrates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *104*, 8281–8286.
- Sansores-Garcia, L., Bossuyt, W., Wada, K.-I., Yonemura, S., Tao, C., Sasaki, H., and Halder, G. (2011). Modulating F-actin organization induces organ growth by affecting the Hippo pathway. *EMBO J.* *30*, 2325–2335.
- Sawada, Y., Tamada, M., Dubin-Thaler, B.J., Cherniavskaya, O., Sakai, R., Tanaka, S., and Sheetz, M.P. (2006). Force sensing by mechanical extension of the Src family kinase substrate p130Cas. *Cell* *127*, 1015–1026.
- Scarpa, E., Szabó, A., Bibonne, A., Theveneau, E., Parsons, M., and Mayor, R. (2015). Cadherin Switch during EMT in Neural Crest Cells Leads to Contact Inhibition of Locomotion via Repolarization of Forces. *Developmental Cell* *34*, 421–434.
- Schedin, P., and Keely, P.J. (2011). Mammary gland ECM remodeling, stiffness, and mechanosignaling in normal development and tumor progression. *Cold Spring Harb Perspect Biol* *3*, a003228.
- Schiller, H.B., Friedel, C.C., Boulegue, C., and Fässler, R. (2011). Quantitative proteomics of the integrin adhesome show a myosin II-dependent recruitment of LIM domain proteins. *EMBO Rep.* *12*, 259–266.
- Schiller, H.B., Hermann, M.-R., Polleux, J., Vignaud, T., Zanivan, S., Friedel, C.C., Sun, Z., Raducanu, A., Gottschalk, K.-E., Théry, M., et al. (2013a).  $\beta$ 1- and  $\alpha$ v-class integrins cooperate to regulate myosin II during rigidity sensing of fibronectin-based microenvironments. *Nat. Cell Biol.* *15*, 625–636.
- Schiller, H.B., Hermann, M.-R., Polleux, J., Vignaud, T., Zanivan, S., Friedel, C.C., Sun, Z., Raducanu, A., Gottschalk, K.-E., Théry, M., et al. (2013b).  $\beta$ 1- and  $\alpha$ v-class integrins cooperate to regulate myosin II during rigidity sensing of fibronectin-based microenvironments. *Nat. Cell Biol.* *15*, 625–636.

- Schlaepfer, D.D., Hanks, S.K., Hunter, T., and van der Geer, P. (1994). Integrin-mediated signal transduction linked to Ras pathway by GRB2 binding to focal adhesion kinase. *Nature* *372*, 786–791.
- Schmitt, J., Benavente, R., Hodzic, D., Höög, C., Stewart, C.L., and Alsheimer, M. (2007). Transmembrane protein Sun2 is involved in tethering mammalian meiotic telomeres to the nuclear envelope. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *104*, 7426–7431.
- Schnider, S.L., and Kohn, R.R. (1980). Glucosylation of human collagen in aging and diabetes mellitus. *J Clin Invest* *66*, 1179–1181.
- Schönichen, A., and Geyer, M. (2010). Fifteen formins for an actin filament: a molecular view on the regulation of human formins. *Biochim. Biophys. Acta* *1803*, 152–163.
- Schwartz, M.A., Lechene, C., and Ingber, D.E. (1991). Insoluble fibronectin activates the Na/H antiporter by clustering and immobilizing integrin alpha 5 beta 1, independent of cell shape. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *88*, 7849–7853.
- Senior, A., and Gerace, L. (1988). Integral membrane proteins specific to the inner nuclear membrane and associated with the nuclear lamina. *J. Cell Biol.* *107*, 2029–2036.
- Shen, Z.L., Kahn, H., Ballarini, R., and Eppell, S.J. (2011). Viscoelastic Properties of Isolated Collagen Fibrils. *Biophys J* *100*, 3008–3015.
- Shevtsov, S.P., and Dundr, M. (2011). Nucleation of nuclear bodies by RNA. *Nat. Cell Biol.* *13*, 167–173.
- Shih, Y.-R.V., Tseng, K.-F., Lai, H.-Y., Lin, C.-H., and Lee, O.K. (2011). Matrix stiffness regulation of integrin-mediated mechanotransduction during osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *J. Bone Miner. Res.* *26*, 730–738.
- Shin, J.-Y., Méndez-López, I., Wang, Y., Hays, A.P., Tanji, K., Lefkowitz, J.H., Schulze, P.C., Worman, H.J., and Dauer, W.T. (2013). Lamina-associated polypeptide-1 interacts with the muscular dystrophy protein emerin and is essential for skeletal muscle maintenance. *Dev. Cell* *26*, 591–603.
- Shiu, J.-Y., Aires, L., Lin, Z., and Vogel, V. (2018). Nanopillar force measurements reveal actin-cap-mediated YAP mechanotransduction. *Nat. Cell Biol.* *20*, 262–271.
- Shumaker, D.K., Lee, K.K., Tanhehco, Y.C., Craigie, R., and Wilson, K.L. (2001). LAP2 binds to BAF.DNA complexes: requirement for the LEM domain and modulation by variable regions. *EMBO J.* *20*, 1754–1764.



- Sims, J.R., Karp, S., and Ingber, D.E. (1992a). Altering the cellular mechanical force balance results in integrated changes in cell, cytoskeletal and nuclear shape. *J. Cell. Sci.* *103* ( Pt 4), 1215–1222.
- Sims, J.R., Karp, S., and Ingber, D.E. (1992b). Altering the cellular mechanical force balance results in integrated changes in cell, cytoskeletal and nuclear shape. *J. Cell. Sci.* *103* ( Pt 4), 1215–1222.
- Sims, J.R., Karp, S., and Ingber, D.E. (1992c). Altering the cellular mechanical force balance results in integrated changes in cell, cytoskeletal and nuclear shape. *J Cell Sci* *103*, 1215–1222.
- Sixt, M. (2011). Interstitial locomotion of leukocytes. *Immunol. Lett.* *138*, 32–34.
- Sleeman, J.E., and Lamond, A.I. (1999). Newly assembled snRNPs associate with coiled bodies before speckles, suggesting a nuclear snRNP maturation pathway. *Curr. Biol.* *9*, 1065–1074.
- Smith, L.R., Cho, S., and Discher, D.E. (2018). Stem Cell Differentiation is Regulated by Extracellular Matrix Mechanics. *Physiology* *33*, 16–25.
- Smith, M.A., Blankman, E., Gardel, M.L., Luettjohann, L., Waterman, C.M., and Beckerle, M.C. (2010). A zyxin-mediated mechanism for actin stress fiber maintenance and repair. *Dev. Cell* *19*, 365–376.
- Soattin, L., Fiore, M., Gavazzo, P., Viti, F., Facci, P., Raiteri, R., Difato, F., Pusch, M., and Vassalli, M. (2016). The biophysics of piezo1 and piezo2 mechanosensitive channels. *Biophysical Chemistry* *208*, 26–33.
- Solovei, I., Wang, A.S., Thanisch, K., Schmidt, C.S., Krebs, S., Zwerger, M., Cohen, T.V., Devys, D., Foisner, R., Peichl, L., et al. (2013). LBR and lamin A/C sequentially tether peripheral heterochromatin and inversely regulate differentiation. *Cell* *152*, 584–598.
- Sosa, B.A., Rothballer, A., Kutay, U., and Schwartz, T.U. (2012). LINC complexes form by binding of three KASH peptides to domain interfaces of trimeric SUN proteins. *Cell* *149*, 1035–1047.
- Sosa, B.A., Kutay, U., and Schwartz, T.U. (2013). Structural insights into LINC complexes. *Current Opinion in Structural Biology* *23*, 285–291.
- Sotiropoulos, A., Gineitis, D., Copeland, J., and Treisman, R. (1999). Signal-regulated activation of serum response factor is mediated by changes in actin dynamics. *Cell* *98*, 159–169.

- Stavru, F., Hülsmann, B.B., Spang, A., Hartmann, E., Cordes, V.C., and Görlich, D. (2006). NDC1: a crucial membrane-integral nucleoporin of metazoan nuclear pore complexes. *J. Cell Biol.* *173*, 509–519.
- Steinert, P.M. (1991a). Analysis of the mechanism of assembly of mouse keratin 1/keratin 10 intermediate filaments in vitro suggests that intermediate filaments are built from multiple oligomeric units rather than a unique tetrameric building block. *J. Struct. Biol.* *107*, 175–188.
- Steinert, P.M. (1991b). Organization of coiled-coil molecules in native mouse keratin 1/keratin 10 intermediate filaments: evidence for alternating rows of antiparallel in-register and antiparallel staggered molecules. *J. Struct. Biol.* *107*, 157–174.
- Stephenson, N.L., and Avis, J.M. (2012). Direct observation of proteolytic cleavage at the S2 site upon forced unfolding of the Notch negative regulatory region. *PNAS*.
- Stewart, C., and Burke, B. (1987). Teratocarcinoma stem cells and early mouse embryos contain only a single major lamin polypeptide closely resembling lamin B. *Cell* *51*, 383–392.
- Stewart, M.P., Hodel, A.W., Spielhofer, A., Cattin, C.J., Müller, D.J., and Helenius, J. (2013). Wedged AFM-cantilevers for parallel plate cell mechanics. *Methods* *60*, 186–194.
- Stewart-Hutchinson, P.J., Hale, C.M., Wirtz, D., and Hodzic, D. (2008). Structural requirements for the assembly of LINC complexes and their function in cellular mechanical stiffness. *Exp. Cell Res.* *314*, 1892–1905.
- Stierlé, V., Couprie, J., Ostlund, C., Krimm, I., Zinn-Justin, S., Hossenlopp, P., Worman, H.J., Courvalin, J.-C., and Duband-Goulet, I. (2003). The carboxyl-terminal region common to lamins A and C contains a DNA binding domain. *Biochemistry* *42*, 4819–4828.
- Stoffler, D., Fahrenkrog, B., and Aebi, U. (1999). The nuclear pore complex: from molecular architecture to functional dynamics. *Curr. Opin. Cell Biol.* *11*, 391–401.
- Stopak, D., and Harris, A.K. (1982). Connective tissue morphogenesis by fibroblast traction. I. Tissue culture observations. *Dev. Biol.* *90*, 383–398.
- Straight, A.F., Cheung, A., Limouze, J., Chen, I., Westwood, N.J., Sellers, J.R., and Mitchison, T.J. (2003). Dissecting temporal and spatial control of cytokinesis with a myosin II Inhibitor. *Science* *299*, 1743–1747.
- Sukharev, S., Betanzos, M., Chiang, C.S., and Guy, H.R. (2001). The gating mechanism of the large mechanosensitive channel MscL. *Nature* *409*, 720–724.

- Sun, Q., Chen, G., Streb, J.W., Long, X., Yang, Y., Stoeckert, C.J., and Miano, J.M. (2006). Defining the mammalian CArGome. *Genome Res.* *16*, 197–207.
- Sun, Z., Tseng, H.-Y., Tan, S., Senger, F., Kurzawa, L., Dedden, D., Mizuno, N., Wasik, A.A., Thery, M., Dunn, A.R., et al. (2016a). Kank2 activates talin, reduces force transduction across integrins and induces central adhesion formation. *Nat. Cell Biol.* *18*, 941–953.
- Sun, Z., Guo, S.S., and Fässler, R. (2016b). Integrin-mediated mechanotransduction. *J. Cell Biol.* *215*, 445–456.
- Sutherland, R.M. (1988). Cell and environment interactions in tumor microregions: the multicell spheroid model. *Science* *240*, 177–184.
- Swift, J., and Discher, D.E. (2014). The nuclear lamina is mechano-responsive to ECM elasticity in mature tissue. *J. Cell. Sci.*
- Swift, J., Ivanovska, I.L., Buxboim, A., Harada, T., Dingal, P.C.D.P., Pinter, J., Pajeroski, J.D., Spinler, K.R., Shin, J.-W., Tewari, M., et al. (2013a). Nuclear lamin-A scales with tissue stiffness and enhances matrix-directed differentiation. *Science* *341*, 1240104.
- Swift, J., Ivanovska, I.L., Buxboim, A., Harada, T., Dingal, P.C.D.P., Pinter, J., Pajeroski, J.D., Spinler, K.R., Shin, J.-W., Tewari, M., et al. (2013b). Nuclear lamin-A scales with tissue stiffness and enhances matrix-directed differentiation. *Science* *341*, 1240104.
- Tajik, A., Zhang, Y., Wei, F., Sun, J., Jia, Q., Zhou, W., Singh, R., Khanna, N., Belmont, A.S., and Wang, N. (2016). Transcription upregulation via force-induced direct stretching of chromatin. *Nat Mater* *15*, 1287–1296.
- Takaki, T., Montagner, M., Serres, M.P., Le Berre, M., Russell, M., Collinson, L., Szuhai, K., Howell, M., Boulton, S.J., Sahai, E., et al. (2017). Actomyosin drives cancer cell nuclear dysmorphia and threatens genome stability. *Nat Commun* *8*, 16013.
- Takei, T., Rivas-Gotz, C., Delling, C.A., Koo, J.T., Mills, I., McCarthy, T.L., Centrella, M., and Sumpio, B.E. (1997). Effect of strain on human keratinocytes in vitro. *J. Cell. Physiol.* *173*, 64–72.
- Tee, Y.H., Shemesh, T., Thiagarajan, V., Hariadi, R.F., Anderson, K.L., Page, C., Volkmann, N., Hanein, D., Sivaramakrishnan, S., Kozlov, M.M., et al. (2015). Cellular chirality arising from the self-organization of the actin cytoskeleton. *Nature Cell Biology* *17*, 445–457.

- Thakar, K., May, C.K., Rogers, A., and Carroll, C.W. (2017). Opposing roles for distinct LINC complexes in regulation of the small GTPase RhoA. *Mol Biol Cell* *28*, 182–191.
- Thiam, H.-R., Vargas, P., Carpi, N., Crespo, C.L., Raab, M., Terriac, E., King, M.C., Jacobelli, J., Alberts, A.S., Stradal, T., et al. (2016a). Perinuclear Arp2/3-driven actin polymerization enables nuclear deformation to facilitate cell migration through complex environments. *Nat Commun* *7*, 10997.
- Thiam, H.-R., Vargas, P., Carpi, N., Crespo, C.L., Raab, M., Terriac, E., King, M.C., Jacobelli, J., Alberts, A.S., Stradal, T., et al. (2016b). Perinuclear Arp2/3-driven actin polymerization enables nuclear deformation to facilitate cell migration through complex environments. *Nat Commun* *7*, 10997.
- Thomas, C.H., Collier, J.H., Sfeir, C.S., and Healy, K.E. (2002). Engineering gene expression and protein synthesis by modulation of nuclear shape. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *99*, 1972–1977.
- Thompson, D.W. (1942). On growth and form. *On Growth and Form*.
- Tojkander, S., Gateva, G., Schevzov, G., Hotulainen, P., Naumanen, P., Martin, C., Gunning, P.W., and Lappalainen, P. (2011). A molecular pathway for myosin II recruitment to stress fibers. *Curr. Biol.* *21*, 539–550.
- Tojkander, S., Gateva, G., and Lappalainen, P. (2012). Actin stress fibers--assembly, dynamics and biological roles. *J. Cell. Sci.* *125*, 1855–1864.
- Tollervey, D., Lehtonen, H., Jansen, R., Kern, H., and Hurt, E.C. (1993). Temperature-sensitive mutations demonstrate roles for yeast fibrillarin in pre-rRNA processing, pre-rRNA methylation, and ribosome assembly. *Cell* *72*, 443–457.
- Treisman, R. (1987). Identification and purification of a polypeptide that binds to the c-fos serum response element. *EMBO J.* *6*, 2711–2717.
- Tsai, M.-Y., Wang, S., Heidinger, J.M., Shumaker, D.K., Adam, S.A., Goldman, R.D., and Zheng, Y. (2006). A mitotic lamin B matrix induced by RanGTP required for spindle assembly. *Science* *311*, 1887–1893.
- Tu, K., Yang, W., Li, C., Zheng, X., Lu, Z., Guo, C., Yao, Y., and Liu, Q. (2014). Fbxw7 is an independent prognostic marker and induces apoptosis and growth arrest by regulating YAP abundance in hepatocellular carcinoma. *Mol. Cancer* *13*, 110.
- Turgay, Y., Champion, L., Balazs, C., Held, M., Toso, A., Gerlich, D.W., Meraldi, P., and Kutay, U. (2014). SUN proteins facilitate the removal of membranes from chromatin during nuclear envelope breakdown. *J. Cell Biol.* *204*, 1099–1109.

- Turgay, Y., Eibauer, M., Goldman, A.E., Shimi, T., Khayat, M., Ben-Harush, K., Dubrovsky-Gaup, A., Sapra, K.T., Goldman, R.D., and Medalia, O. (2017). The molecular architecture of lamins in somatic cells. *Nature* *543*, 261–264.
- Uhler, C., and Shivashankar, G.V. (2017). Regulation of genome organization and gene expression by nuclear mechanotransduction. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *18*, 717–727.
- Valon, L., Marín-Llauradó, A., Wyatt, T., Charras, G., and Treppe, X. (2017). Optogenetic control of cellular forces and mechanotransduction. *Nat Commun* *8*, 14396.
- Vartiainen, M.K., Guettler, S., Larijani, B., and Treisman, R. (2007). Nuclear actin regulates dynamic subcellular localization and activity of the SRF cofactor MAL. *Science* *316*, 1749–1752.
- Versaevol, M., Grevesse, T., and Gabriele, S. (2012). Spatial coordination between cell and nuclear shape within micropatterned endothelial cells. *Nat Commun* *3*, 671.
- Versaevol, M., Braquenier, J.-B., Riaz, M., Grevesse, T., Lantoine, J., and Gabriele, S. (2014). Super-resolution microscopy reveals LINC complex recruitment at nuclear indentation sites. *Scientific Reports* *4*, 7362.
- Vianay, B., Senger, F., Alamos, S., Anjur-Dietrich, M., Bearce, E., Cheeseman, B., Lee, L., and Théry, M. (2018). Variation in traction forces during cell cycle progression. *Biol. Cell* *110*, 91–96.
- Vietri, M., Schink, K.O., Campsteijn, C., Wegner, C.S., Schultz, S.W., Christ, L., Thoresen, S.B., Brech, A., Raiborg, C., and Stenmark, H. (2015). Spastin and ESCRT-III coordinate mitotic spindle disassembly and nuclear envelope sealing. *Nature* *522*, 231–235.
- Vogel, V. (2006). Mechanotransduction involving multimodular proteins: converting force into biochemical signals. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* *35*, 459–488.
- Vorburger, K., Kitten, G.T., and Nigg, E.A. (1989). Modification of nuclear lamin proteins by a mevalonic acid derivative occurs in reticulocyte lysates and requires the cysteine residue of the C-terminal CXXM motif. *EMBO J.* *8*, 4007–4013.
- Vuori, K., and Ruoslahti, E. (1993). Activation of protein kinase C precedes alpha 5 beta 1 integrin-mediated cell spreading on fibronectin. *J. Biol. Chem.* *268*, 21459–21462.
- Wada, K.-I., Itoga, K., Okano, T., Yonemura, S., and Sasaki, H. (2011). Hippo pathway regulation by cell morphology and stress fibers. *Development* *138*, 3907–3914.
- Wang, N., Butler, J.P., and Ingber, D.E. (1993). Mechanotransduction across the cell surface and through the cytoskeleton. *Science* *260*, 1124–1127.

Wang, W., Wyckoff, J.B., Frohlich, V.C., Oleynikov, Y., Hüttelmaier, S., Zavadil, J., Cermak, L., Bottinger, E.P., Singer, R.H., White, J.G., et al. (2002). Single cell behavior in metastatic primary mammary tumors correlated with gene expression patterns revealed by molecular profiling. *Cancer Res.* *62*, 6278–6288.

Wang, W., Shi, Z., Jiao, S., Chen, C., Wang, H., Liu, G., Wang, Q., Zhao, Y., Greene, M.I., and Zhou, Z. (2012). Structural insights into SUN-KASH complexes across the nuclear envelope. *Cell Res.* *22*, 1440–1452.

Watanabe, N., Madaule, P., Reid, T., Ishizaki, T., Watanabe, G., Kakizuka, A., Saito, Y., Nakao, K., Jockusch, B.M., and Narumiya, S. (1997). p140mDia, a mammalian homolog of *Drosophila* diaphanous, is a target protein for Rho small GTPase and is a ligand for profilin. *EMBO J.* *16*, 3044–3056.

Watanabe, N., Kato, T., Fujita, A., Ishizaki, T., and Narumiya, S. (1999). Cooperation between mDia1 and ROCK in Rho-induced actin reorganization. *Nat. Cell Biol.* *1*, 136–143.

Webster, B.M., Thaller, D.J., Jäger, J., Ochmann, S.E., Borah, S., and Lusk, C.P. (2016). Chm7 and Heh1 collaborate to link nuclear pore complex quality control with nuclear envelope sealing. *EMBO J.* *35*, 2447–2467.

Wheeler, M.A., Davies, J.D., Zhang, Q., Emerson, L.J., Hunt, J., Shanahan, C.M., and Ellis, J.A. (2007). Distinct functional domains in nesprin-1alpha and nesprin-2beta bind directly to emerin and both interactions are disrupted in X-linked Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Exp. Cell Res.* *313*, 2845–2857.

White, G.E., Gimbrone, M.A., and Fujiwara, K. (1983). Factors influencing the expression of stress fibers in vascular endothelial cells in situ. *J. Cell Biol.* *97*, 416–424.

Wiberg, C., Klatt, A.R., Wagener, R., Paulsson, M., Bateman, J.F., Heinegård, D., and Mörgelin, M. (2003). Complexes of matrilin-1 and biglycan or decorin connect collagen VI microfibrils to both collagen II and aggrecan. *J. Biol. Chem.* *278*, 37698–37704.

Wilhelmsen, K., Litjens, S.H.M., Kuikman, I., Tshimbalanga, N., Janssen, H., van den Bout, I., Raymond, K., and Sonnenberg, A. (2005). Nesprin-3, a novel outer nuclear membrane protein, associates with the cytoskeletal linker protein plectin. *J. Cell Biol.* *171*, 799–810.

Winograd-Katz, S.E., Fässler, R., Geiger, B., and Legate, K.R. (2014). The integrin adhesome: from genes and proteins to human disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* *15*, 273–288.

Wolf, K., Te Lindert, M., Krause, M., Alexander, S., Te Riet, J., Willis, A.L., Hoffman, R.M., Figdor, C.G., Weiss, S.J., and Friedl, P. (2013). Physical limits of cell migration:

control by ECM space and nuclear deformation and tuning by proteolysis and traction force. *J. Cell Biol.* *201*, 1069–1084.

Wolff, J. (2010). The classic: on the inner architecture of bones and its importance for bone growth. 1870. *Clin. Orthop. Relat. Res.* *468*, 1056–1065.

Wong, A.J., Pollard, T.D., and Herman, I.M. (1983). Actin filament stress fibers in vascular endothelial cells in vivo. *Science* *219*, 867–869.

Worman, H.J. (2012). Nuclear lamins and laminopathies. *J. Pathol.* *226*, 316–325.

Wu, J., Kent, I.A., Shekhar, N., Chancellor, T.J., Mendonca, A., Dickinson, R.B., and Lele, T.P. (2014). Actomyosin pulls to advance the nucleus in a migrating tissue cell. *Biophys. J.* *106*, 7–15.

Wydner, K.L., McNeil, J.A., Lin, F., Worman, H.J., and Lawrence, J.B. (1996). Chromosomal assignment of human nuclear envelope protein genes LMNA, LMNB1, and LBR by fluorescence in situ hybridization. *Genomics* *32*, 474–478.

Xue, M., and Jackson, C.J. (2015). Extracellular Matrix Reorganization During Wound Healing and Its Impact on Abnormal Scarring. *Adv Wound Care (New Rochelle)* *4*, 119–136.

Yang, W., Gelles, J., and Musser, S.M. (2004). Imaging of single-molecule translocation through nuclear pore complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *101*, 12887–12892.

Yang, Y., Wang, K., Gu, X., and Leong, K.W. (2017). Biophysical Regulation of Cell Behavior-Cross Talk between Substrate Stiffness and Nanotopography. *Engineering (Beijing)* *3*, 36–54.

Ye, Q., and Worman, H.J. (1996). Interaction between an integral protein of the nuclear envelope inner membrane and human chromodomain proteins homologous to *Drosophila* HP1. *J. Biol. Chem.* *271*, 14653–14656.

Yeh, C.-H., Kuo, P.-L., Wang, Y.-Y., Wu, Y.-Y., Chen, M.-F., Lin, D.-Y., Lai, T.-H., Chiang, H.-S., and Lin, Y.-H. (2015). SEPT12/SPAG4/LAMINB1 complexes are required for maintaining the integrity of the nuclear envelope in postmeiotic male germ cells. *PLoS ONE* *10*, e0120722.

Young, D.A., Choi, Y.S., Engler, A.J., and Christman, K.L. (2013). Stimulation of adipogenesis of adult adipose-derived stem cells using substrates that mimic the stiffness of adipose tissue. *Biomaterials* *34*, 8581–8588.

Yu, C., Rafiq, N.B.M., Cao, F., Zhou, Y., Krishnasamy, A., Biswas, K.H., Ravasio, A., Chen, Z., Wang, Y.-H., Kawauchi, K., et al. (2015). Integrin-beta3 clusters recruit

clathrin-mediated endocytic machinery in the absence of traction force. *Nat Commun* *6*, 8672.

Yu, H., Lui, Y.S., Xiong, S., Leong, W.S., Wen, F., Nurkahfianto, H., Rana, S., Leong, D.T., Ng, K.W., and Tan, L.P. (2013). Insights into the role of focal adhesion modulation in myogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev.* *22*, 136–147.

Yu, J., Lei, K., Zhou, M., Craft, C.M., Xu, G., Xu, T., Zhuang, Y., Xu, R., and Han, M. (2011). KASH protein Syne-2/Nesprin-2 and SUN proteins SUN1/2 mediate nuclear migration during mammalian retinal development. *Hum. Mol. Genet.* *20*, 1061–1073.

Zaidel-Bar, R., Itzkovitz, S., Ma'ayan, A., Iyengar, R., and Geiger, B. (2007). Functional atlas of the integrin adhesome. *Nat. Cell Biol.* *9*, 858–867.

Zamir, E., Katz, B.Z., Aota, S., Yamada, K.M., Geiger, B., and Kam, Z. (1999). Molecular diversity of cell-matrix adhesions. *J. Cell. Sci.* *112* ( Pt 11), 1655–1669.

Zamir, E., Katz, M., Posen, Y., Erez, N., Yamada, K.M., Katz, B.Z., Lin, S., Lin, D.C., Bershadsky, A., Kam, Z., et al. (2000). Dynamics and segregation of cell-matrix adhesions in cultured fibroblasts. *Nat. Cell Biol.* *2*, 191–196.

Zanconato, F., Forcato, M., Battilana, G., Azzolin, L., Quaranta, E., Bodega, B., Rosato, A., Bicciato, S., Cordenonsi, M., and Piccolo, S. (2015). Genome-wide association between YAP/TAZ/TEAD and AP-1 at enhancers drives oncogenic growth. *Nat. Cell Biol.* *17*, 1218–1227.

Zanconato, F., Cordenonsi, M., and Piccolo, S. (2016). YAP/TAZ at the Roots of Cancer. *Cancer Cell* *29*, 783–803.

Zhang, Q., Ragnauth, C.D., Skepper, J.N., Worth, N.F., Warren, D.T., Roberts, R.G., Weissberg, P.L., Ellis, J.A., and Shanahan, C.M. (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.

Zhang, X., Lei, K., Yuan, X., Wu, X., Zhuang, Y., Xu, T., Xu, R., and Han, M. (2009). SUN1/2 and Syne/Nesprin-1/2 complexes connect centrosome to the nucleus during neurogenesis and neuronal migration in mice. *Neuron* *64*, 173–187.

Zhao, B., Wei, X., Li, W., Udan, R.S., Yang, Q., Kim, J., Xie, J., Ikenoue, T., Yu, J., Li, L., et al. (2007a). Inactivation of YAP oncoprotein by the Hippo pathway is involved in cell contact inhibition and tissue growth control. *Genes Dev.* *21*, 2747–2761.

Zhao, B., Li, L., Wang, L., Wang, C.-Y., Yu, J., and Guan, K.-L. (2012). Cell detachment activates the Hippo pathway via cytoskeleton reorganization to induce anoikis. *Genes Dev.* *26*, 54–68.



- Zhao, X.-H., Laschinger, C., Arora, P., Szaszi, K., Kapus, A., and McCulloch, C.A. (2007b). Force activates smooth muscle  $\alpha$ -actin promoter activity through the Rho signaling pathway. *Journal of Cell Science* *120*, 1801–1809.
- Zhen, Y.-Y., Libotte, T., Munck, M., Noegel, A.A., and Korenbaum, E. (2002). NUANCE, a giant protein connecting the nucleus and actin cytoskeleton. *J. Cell. Sci.* *115*, 3207–3222.
- Zhong, C., Chrzanowska-Wodnicka, M., Brown, J., Shaub, A., Belkin, A.M., and Burridge, K. (1998). Rho-mediated contractility exposes a cryptic site in fibronectin and induces fibronectin matrix assembly. *J. Cell Biol.* *141*, 539–551.
- Zhou, Z., Du, X., Cai, Z., Song, X., Zhang, H., Mizuno, T., Suzuki, E., Yee, M.R., Berezov, A., Murali, R., et al. (2012). Structure of Sad1-UNC84 homology (SUN) domain defines features of molecular bridge in nuclear envelope. *J. Biol. Chem.* *287*, 5317–5326.
- Zhu, X., and Assoian, R.K. (1995). Integrin-dependent activation of MAP kinase: a link to shape-dependent cell proliferation. *Mol Biol Cell* *6*, 273–282.
- Zhu, C., Bao, G., and Wang, N. (2000). Cell mechanics: mechanical response, cell adhesion, and molecular deformation. *Annu Rev Biomed Eng* *2*, 189–226.
- Zink, D., Fischer, A.H., and Nickerson, J.A. (2004). Nuclear structure in cancer cells. *Nat. Rev. Cancer* *4*, 677–687.
- Zlotek-Zlotkiewicz, E., Monnier, S., Cappello, G., Le Berre, M., and Piel, M. (2015). Optical volume and mass measurements show that mammalian cells swell during mitosis. *J. Cell Biol.* *211*, 765–774.
- Zouani, O.F., Kalisky, J., Ibarboure, E., and Durrieu, M.-C. (2013). Effect of BMP-2 from matrices of different stiffnesses for the modulation of stem cell fate. *Biomaterials* *34*, 2157–2166.

# Mécanotransduction au cours du cycle cellulaire : Rôle de la déformation de l'enveloppe nucléaire

Mechanotransduction during the cell cycle: role of nuclear envelope deformation

## Résumé :

La forme du noyau peut varier significativement au cours du développement ou lors de processus pathologiques en raison des forces mécaniques émanant du microenvironnement ou générées par le cytosquelette. L'impact de la morphologie nucléaire sur la machinerie transcriptionnelle n'est cependant pas connu. En utilisant plusieurs approches afin de manipuler la morphologie nucléaire, nous avons observé que des changements de forme de l'enveloppe nucléaire régulent l'activité de AP1 et TEAD. Nous avons montré que l'aplatissement du noyau augmente la phosphorylation de c-Jun et la translocation de YAP, conduisant à une augmentation de la transcription des gènes cibles de AP1 et TEAD. Nous avons également observé que l'aplatissement du noyau se produit au cours du cycle cellulaire et favorise la prolifération *via* l'activation de TEAD et AP1 qui stimulent la progression de la phase G1 à la phase S.

**Mots-clés :** Enveloppe nucléaire, mécanotransduction, cycle cellulaire, lamina, cytosquelette

## Abstract :

The shape of the cell nucleus can vary considerably during developmental and pathological processes as a consequence of the mechanical forces emanating from the microenvironment or generated by the cytoskeleton. However the impact of nuclear morphology on the transcriptional machinery is not known. Using a combination of tools to manipulate the nuclear morphology, we observed that changes in nuclear shape regulate the activity of AP1 and TEAD. We showed that nuclear flattening increases c-Jun phosphorylation and YAP nuclear translocation, leading to transcriptional induction of AP1 and TEAD-target genes. Surprisingly, we found that nuclear compression is necessary and sufficient to mediate c-Jun and YAP activation in response to cell-generated contractility or cell spreading. We additionally observed that nuclear flattening occurs during the cell cycle and promotes proliferation *via* TEAD and AP1-dependent G1 to S progression.

**Key Words:** Nuclear envelope, mechanotransduction, cell cycle, lamin A/C, cytoskeleton