



HAL
open science

**Etude des mécanismes physiopathologiques dans un
modèle murin de dystrophie musculaire
d'Emery-Dreifuss, la souris hétérozygote Lmna
deltaK32/+**

Marie-Elodie Cattin

► **To cite this version:**

Marie-Elodie Cattin. Etude des mécanismes physiopathologiques dans un modèle murin de dystrophie musculaire d'Emery-Dreifuss, la souris hétérozygote Lmna deltaK32/+. Médecine humaine et pathologie. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2012. Français. NNT : 2012PAO66160 . tel-00828327

HAL Id: tel-00828327

<https://theses.hal.science/tel-00828327>

Submitted on 30 May 2013

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.

Université Pierre et Marie Curie
UFR des Sciences de la Vie
9, quai Saint Bernard
75005 Paris

U974 Inserm
UM76 - UPMC
UMR7215 - CNRS
Institut de Myologie

Thèse de Doctorat de l'Université Paris 6 – Pierre et Marie Curie

Ecole Doctorale : Complexité du Vivant

Présentée par

Marie-Elodie CATTIN

Pour l'obtention du titre de Docteur de l'Université Paris VI

Etude des mécanismes physiopathologiques dans un modèle murin de dystrophie musculaire d'Emery-Dreifuss, la souris hétérozygote *Lmna*^{ΔK32/+}

Soutenue le 27 juin 2012, devant le jury composé de :

Pr Bertrand Friguet
Dr Jane-Lise Samuel
Pr Nicolas Lévy
Dr Onnik Agbulut
Dr Philippe Charron
Dr Gisèle Bonne
Dr Lucie Carrier

Président
Rapporteur
Rapporteur
Examinateur
Examinateur
Directrice de thèse
Co-encadrante

Remerciements

Je souhaite tout d'abord remercier les membres du jury qui ont accepté de juger mon travail de thèse, le professeur Bertrand Friguet, président du jury, le docteur Jane-Lise Samuel et le professeur Nicolas Lévy, en qualité de rapporteurs et les docteurs Onnik Agbulut et Philippe Charron, en qualité d'examineurs.

Je remercie très chaleureusement Gisèle Bonne, ma directrice de thèse, qui m'a accueillie dans son équipe avec bienveillance et m'a formée avec douceur et respect. J'ai appris à ses côtés à mener un projet de recherche, à toujours me recentrer sur la « question posée » et à rebondir lorsque les résultats n'étaient pas ceux espérés. Elle m'a aussi enseignée « l'art » de la communication orale et écrite dans la rigueur et le souci du détail esthétique. Elle m'a toujours soutenue et encouragée, je l'en remercie beaucoup.

Je remercie aussi chaleureusement Lucie Carrier qui a co-encadré une partie de ce travail et qui m'a, elle aussi, accueillie avec beaucoup de gentillesse au sein de son équipe à Hambourg. Merci aussi à tous les membres de son équipe pour l'accueil qu'ils m'ont fait lors de mes deux courts séjours avec eux. Nous avons bien travaillé mais aussi bien rigolé !

Je remercie Marie-Catherine Le Bihan et Søren Skov Jensen pour leur expertise en spectrométrie de masse, leur clarté d'explication et leur grand travail.

Je remercie tous les membres de la petite équipe des « Aiment rire Dreifuss » puis la plus grande équipe 1 pour les bons moments que nous avons passés tous ensemble et les passions que nous avons partagées : au premier rang desquelles on trouve bien sur les lames, puis le chocolat et le punch maison pour certaines !!

Merci à Anne Bertrand pour son oreille attentive et son soutien. Ses conseils scientifiques et techniques ont été très précieux. Merci à Isabelle Nelson pour son franc-

parler, son aide en ce qui concerne le « monde mystérieux » de la biologie moléculaire et un grand merci pour sa bienveillance à mon égard. Merci à Khadija pour son grain de folie et son rire communicatif !

Plus généralement, un grand merci à toutes les filles du groupe « lamine », Anne, Isabelle, Khadija, Esma pour leur bonne humeur et pour les potins et autres petites histoires (pas toujours fondées...) qui ont soudé le groupe et rendu les journées plus agréables !

Mon amitié va aussi aux membres de l'équipe qui sont partis vers d'autres aventures : Valérie, Nawal, Aurélie, Carole, Lucie...

Merci aussi à tous les membres de l'U974 et à mes « co-lunchers » : Bernard, Cyril, Martine, Stéphanie...

Je remercie mes amis « co-thésards » Stéphane, Madeleine et Ratiba, on est plus fort à plusieurs !

Je remercie mon père, Jean-Philippe, pour son soutien sans faille et son investissement dans mes projets futurs.

Un immense merci à Smail qui m'a soutenue et supportée toutes ces années difficiles sur bien des plans. Merci pour sa patience, sa bienveillance et son amour. Merci d'être là.

Enfin, toute ma gratitude et ma reconnaissance vont à ma mère, Elisabeth Debroise, sans qui je ne serai pas celle que je suis aujourd'hui. Je me suis construite sur son modèle. Elle m'a tout donné, son soutien sans faille ni condition dans tous les choix que j'ai faits, son amour, sa fierté. Je l'en remercie chaque jour. Elle est partie bien trop tôt et laisse un vide immense. Elle m'a portée durant tout mon parcours universitaire et la douleur de son absence au moment de l'aboutissement de tout ça est cruelle. Cette thèse lui est entièrement dédiée.

Table des matières

Table des Figures.....	7
Table des Tableaux.....	9
Liste des abréviations.....	10
Préambule.....	12
INTRODUCTION.....	14
I- L'enveloppe nucléaire.....	14
II- Les lamines de type A ou lamines A/C.....	15
1-Structure du gène et des protéines.....	15
1-1 Le gène LMNA.....	15
1-2 Maturation de la prélamine A.....	16
1-3 Expression des lamines A/C.....	17
1-4 Structure des lamines A/C.....	18
1-5 Localisation des lamines A/C.....	20
2-Assemblage, Dynamique.....	21
2-1 Assemblage des lamines au sein de la lamina.....	21
2-2 Dynamique des lamines.....	22
3-Redondance des lamines ?.....	23
4-Fonctions des lamines A/C.....	25
4-1 Maintien de la structure, de la rigidité de l'enveloppe nucléaire et connexions cytoplasmiques.....	25
4-2 Organisation et expression du génome.....	27
4-3 Régulation de voies de signalisation.....	30
III- Pathologies liées aux mutations du gène LMNA : les laminopathies.....	31
1-Différents types d'atteintes.....	32
1-1 Laminopathies du muscle strié.....	32
1-2 Laminopathies du tissu adipeux.....	34
1-3 Laminopathies du tissu nerveux.....	34
1-4 Les syndromes de vieillissement prématurés.....	35
1-5 Variabilité et chevauchement phénotypique des laminopathies.....	37
2-Physiopathologie des laminopathies.....	38
2-1 Type de mutations.....	38
2-2 Corrélations génotype-phénotype pour les FPLD et les syndromes progéroïdes.....	40
2-3 Physiopathologie des laminopathies du muscle strié.....	42
2-4 Résumé des hypothèses à l'origine des laminopathies.....	44
IV- Les cardiomyopathies dilatées.....	46
1-Phénotype clinique.....	46
2-Etiologie.....	46
3-Les cardiomyopathies dilatées familiales.....	47
4-Les cardiomyopathies dilatées liées au gène LMNA.....	51
4-1 La cardiolaminopathie « classique ».....	51
4-2 Autres atteintes cardiaques liées à des mutations du gène LMNA.....	53
4-3 Physiopathologie des cardiolaminopathies.....	54
4-4 Prise en charge thérapeutique des patients.....	57
4-5 Nouvelles voies thérapeutiques ?.....	58
4-5-1 Améliorer les défauts contractiles ? Traitement au SCH0013.....	58
4-5-2 Contrecarrer les mécanismes primaires ? Les voies MAPK.....	58
4-5-2-1 Mitogen-Activated Protein Kinases.....	58

4-5-2-2 MAPK, fonction et dysfonction cardiaque.....	60
4-5-2-3 MAPK et cardiolaminopathie.....	61
4-5-3 Réparer le cœur ? La thérapie cellulaire.....	62
V- Système ubiquitine-protéasome	64
1-Structure et fonction	64
1-1 Polyubiquitination des substrats	64
1-2 Structure du protéasome.....	67
1-3 Régulation de la fonction du protéasome.....	68
2-Inhibition biochimique de l'UPS.....	69
3-Méthodes d'étude de la fonction de l'UPS.....	69
4-UPS et cardiopathies	70
Objectifs de la thèse.....	75
Résultats : Partie I-Characterisation du phénotype des souris <i>Lmna</i>^{AK32/+} et implication du système ubiquitine-protéasome	79
Problématique et résumé du travail	80
Manuscrit.....	85
Résultats supplémentaires Partie I	124
Etude du complexe LINC dans le cœur des animaux Het et Wt.....	124
Etude complémentaire du protéasome : Inhibition in vivo du protéasome	125
Etude de l'autophagie dans le cœur des animaux Het et Wt.....	128
Résultats : Partie II-Réponse du myocarde et des muscles squelettiques des souris Het face à un stress induit par l'exercice.....	130
Problématique.....	131
Méthodes d'étude utilisées.....	131
Résultats	133
Aptitude à l'exercice	133
Tolérance à l'exercice.....	133
Evaluation du temps de course.....	133
Analyses fonctionnelles	134
Fonction cardiaque.....	134
Propriétés contractiles du muscle soleus.....	135
Remodelage cardiaque	136
Taille des cardiomyocytes.....	137
Longueur des noyaux	138
Expression de marqueurs de remodelage myocardique	139
Remodelage matriciel.....	141
Discussion	143
Résultats : Partie III-Recherche de mécanismes physiopathologiques précoces.147	
Profil d'expression génique	148
Problématique.....	148
Méthodes d'étude utilisées.....	148
Résultats	150
Analyse supervisée	150
Analyse <i>in silico</i> des résultats	154
Stratégie d'analyse différente des deux listes obtenues	154
Analyse de la liste « All ».....	154
Analyse de la liste « P50 ».....	157
Validation technique de la puce	160
Discussion	162
Implication des voies MAP kinases	166
Problématique.....	166
Méthodes d'étude utilisées.....	166

Résultats	167
Activation des MAP kinases	167
Transcription des gènes cibles.....	170
Discussion	172
Discussion générale	178
Histoire naturelle de la cardiomyopathie chez les souris Het	178
Première phase : la fonction cardiaque est normale chez les souris Het âgées de 10 semaines.....	178
Deuxième phase : l'apparition d'altérations fonctionnelles cardiaques chez les souris Het âgées de 22 à 30 semaines.....	179
Troisième phase : l'aggravation de la dysfonction cardiaque, dilatation ventriculaire gauche et insuffisance cardiaque chez les souris Het âgées de 57 semaines.....	180
Comment expliquer la différence de sensibilité du muscle squelettique et du cœur dans les LMS ?	181
Le cœur des souris Het est-il sénescence ?	184
Les laminopathies sont-elles des pathologies de la mécanosensation ?	188
Comment expliquer la dysfonction du système ubiquitine-protéasome dans le cœur des souris Het ?	192
Quels facteurs spécifiques interagissent avec le domaine N-terminal des lamines A/C?	196
Conclusion et perspectives	198
COMPLEMENTS DE MATERIELS ET METHODES	200
ANNEXES	247

Table des Figures

Figure 1. Structure du gène <i>LMNA</i> codant les lamines A et C.....	16
Figure 2. Maturation de la prélamine A.....	17
Figure 3. Structure moléculaire des lamines A/C.....	19
Figure 4. La lamina nucléaire d'un ovocyte de <i>Xenopus Laevis</i> en microscopie électronique.....	20
Figure 5. Représentation schématique des différents rôles et interactions des lamines A/C au sein de la cellule.....	31
Figure 6. Représentation schématique des différentes formes de laminopathies.....	37
Figure 7. Répartition des mutations des lamines A/C aboutissant aux différents phénotypes cliniques des laminopathies.....	40
Figure 8. Défaut de maturation de la progérine.....	42
Figure 9. Chronologie d'apparition des symptômes cardiaques dans la cardiolaminopathie.....	52
Figure 10. Courbe de survie des patients souffrant de CMD causée par une mutation du gène <i>LMNA</i> ou d'autres CMD.....	53
Figure 11. Répartition des mutations faux-sens par domaine protéique en fonction des phénotypes cliniques musculaires.....	55
Figure 12. Cascade d'activation des différentes voies MAP kinases.....	59
Figure 13. Réaction de polyubiquitination.....	65
Figure 14. Structure des différents protéasomes.....	68
Figure 15. Localisation des protéines Nesprine 1, SUN1 et SUN2 dans le cœur des souris Het et Wt âgées de 10, 30 et 57 semaines.....	125
Figure 16. Effet de l'inhibition du protéasome par l'époxomicine sur le niveau des lamines A/C dans le cœur des souris Het âgées de 10 et 30 semaines.....	127
Figure 17. Evaluation du niveau d'activation de la voie lysosomale-autophagique dans le cœur des souris Het âgées de 10, 30 et 57 semaines.....	129
Figure 18. Représentation schématique du protocole suivi.....	132
Figure 19. Aptitude à la course des souris Wt et Het.....	133
Figure 20. Morphologie musculaire des souris Wt et Het exercées et sédentaires.....	136

Figure 21. Morphologie cardiaque des souris Wt et Het exercées et sédentaires.....	137
Figure 22. Morphologie des noyaux dans le cœur des souris Wt et Het sédentaires et exercées.....	139
Figure 23. Expression de marqueurs de remodelage cardiaque.....	141
Figure 24. Remodelage de la matrice extracellulaire.....	142
Figure 25. Répartition des animaux Wt et Het en fonction de leur profil d'expression génique.....	151
Figure 26. Analyses ontologiques réalisées avec le logiciel <i>Funnet</i>	155
Figure 27. Répartition des transcrits surexprimés et réprimés dans le cœur des souris Het en fonction de leur position chromosomique, comparées à tous les transcrits de la puce.....	157
Figure 28. Réseau d'interactions fonctionnelles des gènes de la liste « P50; FC 1,5 » prédit par le logiciel <i>String Database</i>	158
Figure 29. Niveau d'expression dans le cœur des souris Het des gènes choisis pour la validation technique de la puce.....	160
Figure 30. Niveau d'expression de <i>MIBP</i> dans le cœur des souris Het et Wt âgées de 10 et 57 semaines.....	162
Figure 31. Arbre d'identification et d'annotation des 365 transcrits de la liste « All »...163	
Figure 32. Activation de la voie ERK1 dans le cœur des souris Wt, Het et Hom âgées de 2 semaines.....	168
Figure 33. Activation des voies MAP kinases ERK1/2 et JNK dans le cœur des souris Wt et Het âgées de 10, 30 et 57 semaines.....	169
Figure 34. Analyse de la voie MAP kinases ERK1/2 dans le muscle <i>gastrocnemius</i> des souris Wt et Het âgées de 10, 30 et 57 semaines.....	170
Figure 35. Niveau d'expression de gènes régulés par les voies MAP kinases dans le cœur des souris Wt et Het âgées de 10, 30 et 57 semaines.....	171

Table des Tableaux

Tableau 1. Répartition des mutations publiées du gène <i>LMNA</i> en fonction des phénotypes cliniques.....	39
Tableau 2. Gènes impliqués dans les CMD-F.....	48
Tableau 3. Modèles murins reproduisant des mutations associées aux laminopathies du muscle strié.....	56
Tableau 4. Ubiquitine ligases E3 spécifiques du muscle et leurs cibles.....	66
Tableau 5. Altérations de l'UPS dans les pathologies cardiaques.....	71
Tableau 6. Phénotypes associés aux mutations de la lysine 32 des lamines A/C.....	75
Tableau 7. Paramètres échocardiographiques des souris Wt et Het avant et après 5 semaines d'exercice.....	134
Tableau 8. Propriétés contractiles du muscle Soleus des souris Wt et Het après le protocole d'exercice.....	135
Tableau 9. Liste « P50 » des gènes différentiellement exprimés dans le cœur des souris Het.....	152
Tableau 10. Anticorps utilisés et conditions d'utilisation en western blot et immunomarquage.....	205
Tableau 11. Séquences des amorces et conditions d'utilisation utilisées pour l'analyse en q-PCR.....	206

Liste des abréviations

AD-EDMD : Dystrophie musculaire d'Emery-Dreifuss de transmission autosomique dominante
BAV : Bloc auriculoventriculaire
BW: poids du corps (body weight)
CMD : Cardiomyopathie dilatée
CMD-F : Cardiomyopathie dilatée familiale
CMT : Neuropathie axonale de Charcot-Marie-Tooth
CT-like : Enzyme à activité Chymotrypsine-like
Da : Dalton
DCM-CD : Cardiomyopathie dilatée avec défauts de conduction (Dilated cardiomyopathy with conduction disease)
ECG : Electrocardiogramme
EDMD : Dystrophie musculaire d'Emery-Dreifuss
EHT : Tissu cardiaque reconstitué (Engineered Heart Tissue)
FLIP : Perte de fluorescence dans la région adjacente à la zone photoblanchie (fluorescence loss in photobleaching).
FPLD : Lipodystrophie partielle familiale de type Dunnigan
FRAP : Récupération de fluorescence après photoblanchiment (fluorescence recovery after photobleaching)
FS: fraction de raccourcissement (Fractional shortening)
GFP : Protéine fluorescente verte (Green Fluorescent Protein)
Het : hétérozygote
HGPS : Progéria de Hutchinson-Gilford
Hom : homozygote
HR: rythme cardiaque (Heart rate)
IR : Résistance à l'insuline
IVSd: épaisseur du septum interventriculaire en diastole (Interventricular septum thickness in diastole)
IVSs: épaisseur du septum interventriculaire en systole (Interventricular septum thickness in systole)
L0: Longueur du muscle au repos
L1, L12, L2 : Linkers
LC3 : Microtubule-associated protein 1 light chain 3
L-CMD : Dystrophie musculaire congénitale liée au gène *LMNA*
LGMD : Dystrophie musculaire des ceintures
LINC: Complexe de liaison entre le nucléosquelette et le cytosquelette (Linker of Nucleus and Cytoskeletal complex)
LIRLLC: Syndrome de lipoatrophie, résistance à l'insuline, stéatose hépatique et cardiomyopathie (Lipoatrophy, Insulin-Resistance, Liver steatosis and Cardiomyopathy)
LMS : laminopathies du muscle strié
LVEDD: diamètre ventriculaire gauche en fin de diastole (Left ventricular end-diastolic diameter)
LVES D: diamètre ventriculaire gauche en fin de diastole (Left ventricular end-systolic diameter)

LVM: masse du ventricule gauche (Left ventricular mass)
MAD : Dysplasie acromandibulaire
MEF : Fibroblaste embryonnaire murin (Mouse embryonic fibroblast)
NLS : Séquence de localisation nucléaire
NMD : *Nonsense mediated RNA decay*
PWd: Epaisseur de la paroi postérieure en diastole (Posterior wall thickness in diastole)
PWs: Epaisseur de la paroi postérieure en systole (Posterior wall thickness in systole)
q-PCR : Réaction de polymérisation en chaîne quantitative (Quantitative Polymerase chain reaction)
RD : Dermopathie restrictive
SD : Ecartype (standard deviation)
SEM : Erreur standard à la moyenne (standard error mean)
SFAk : Akinésie fœtale sévère
sP0: Force maximale spécifique
UA : Unité arbitraire
Ub-GFP: Protéine GFP fusionnée avec une molécule d'ubiquitine
ULFs : Sous-unités minimales des filaments (Unit Length Filaments)
UMD-*LMNA* : Base de données regroupant les mutations publiées du gène *LMNA* (Universal mutation database *LMNA*)
UPS : Système ubiquitine-protéasome
Wt : Sauvage (Wild-type)

Préambule

La question que je me suis le plus souvent posée dans ma vie et qui m'a toujours paru essentielle est de savoir « comment marchent les choses ? ». Etant attirée par la biologie, j'ai donc tout naturellement choisi la physiologie pour répondre à cette question, et la physiologie cardiaque en particulier.

Après avoir étudié (un petit peu) le système Rénine-Angiotensine-Aldostérone dans un modèle de cardiopathie lors de stages, l'étude d'une cardiomyopathie liée à la mutation des protéines lamines A/C, m'a paru plus « simple » au départ... Je connaissais à l'évidence bien mal ces protéines et leurs rôles éminemment multiples et complexes ! Maintenant que j'ai découvert la biologie du noyau et des lamines, la question du « comment ça marche » est bien loin d'être satisfaite, tant les choses à explorer sont nombreuses...

Dans cet esprit de décortiquer les mécanismes, j'ai choisi de rédiger l'introduction de ce mémoire en suivant le cheminement des questions que je me suis posées sur la structure, les rôles et les dysfonctionnements des lamines A/C. Pour la partie des résultats de mes travaux, j'ai choisi de les présenter sous forme de trois « chapitres » comportant une section problématique établissant la question de base, une section méthodes d'étude présentant globalement les approches que nous avons adoptées pour répondre à la question posée, une section résultats et enfin une section discussion analysant les données recueillies. Enfin, dans la partie « discussion générale », l'ensemble des résultats que j'ai acquis pendant ma thèse sont remis en perspective avec les connaissances actuelles de la littérature.

J'ai volontairement choisi de ne pas surcharger chaque « chapitre » avec une section Méthodes trop approfondie, les méthodes sont donc détaillées à la fin du mémoire.

INTRODUCTION

INTRODUCTION

L'existence d'un compartiment nucléaire isolant le matériel génétique est le propre des cellules eucaryotes. Bien plus qu'un « sac » contenant et protégeant le génome, le noyau est composé de très nombreux acteurs protéiques et ribonucléiques qui remplissent des fonctions complexes telles que l'organisation et la régulation de l'expression de ce génome, la transmission de signaux mécaniques et chimiques de tous les compartiments cellulaires pour adapter la réponse de la cellule à son environnement. Dans ce contexte, l'enveloppe nucléaire constitue une interface active et primordiale.

I- L'enveloppe nucléaire

L'enveloppe nucléaire est composée de trois « compartiments » principaux :

- 1) une double membrane, la membrane externe est en continuité avec celle du réticulum endoplasmique et la membrane interne est en contact avec le nucléoplasme. Elles définissent l'espace intermembranaire d'environ 30-50 nm de largeur et se rejoignent au niveau des pores nucléaires, où elles fusionnent. Dans ces deux membranes sont enchâssées de nombreuses protéines intégrales (50 à 100 protéines ont été identifiées (Schirmer et al, 2003)) qui jouent notamment des rôles importants dans les liens entre nucléosquelette et cytosquelette. Certaines de ces protéines font partie du complexe LINC (Linker of Nucleus and Cytoskeletal complex).
- 2) les complexes des pores nucléaires, formés d'un complexe macromoléculaire d'environ 112 MDa enchâssés dans les membranes internes et externes, constituent la seule communication entre le nucléoplasme et le cytoplasme des cellules eucaryotes (Hoelz et al, 2011). Ils sont répartis de façon homogène dans l'enveloppe et régulent notamment le trafic des protéines et des ARN entre les deux compartiments.
- 3) la lamina nucléaire tapisse la membrane nucléaire interne. Elle est constituée d'un réseau fibreux de protéines de la famille des filaments intermédiaires de

type V : les lamines. Il existe deux types de lamines, les lamines de type A et celles de type B.

Bien loin d'être « inerte », l'enveloppe nucléaire est une interface fonctionnelle essentielle, siège de nombreux processus biologiques.

II- Les lamines de type A ou lamines A/C

1-Structure du gène et des protéines

1-1 Le gène LMNA

Les études phylogéniques montrent que les filaments intermédiaires sont présents chez tous les métazoaires. Les lamines appartiennent à la famille des filaments intermédiaires nucléaires, ou type V (Aebi et al, 1986).

Dans les cellules de mammifères, il existe deux types de lamines : les Lamines de type A et les lamines de type B. Les lamines de type B sont codées par deux gènes distincts *LMNB1* (Lin & Worman, 1995) et *LMNB2* (Hoger et al, 1990) situés respectivement en 5q.23.3-q.31.1 et en 19p13.3. Elles sont exprimées à tous les stades du développement et sont indispensables à la vie (Kim et al, 2011).

Les lamines de type A, elles, sont codées par le gène *LMNA* et sont exprimées plus tardivement dans le développement (voir plus loin). Le gène *LMNA*, composé de 12 exons, est localisé en position 1q21.2-q21.3 (Lin & Worman, 1993). Par épissage alternatif, il produit quatre transcrits. Les lamines A et C sont les deux isoformes majeures (Lin & Worman, 1993), tandis que la lamine A Δ 10 (Machiels et al, 1996) et la lamine C2 (Alzheimer & Benavente, 1996 ; Furukawa et al, 1994) sont minoritaires et spécifiquement exprimées dans une lignée tumorale et dans la lignée germinale mâle, respectivement. Le site d'épissage alternatif différenciant la lamine C de la lamine A se situe dans l'exon 10. La partie du gène codant spécifiquement pour la lamine A correspond aux 90 premières paires de bases de l'exon 10, suivies des exons 11 et 12. La lamine C contient, elle, toute la séquence de l'exon 10 (Lin & Worman, 1993) (Figure 1). La lamine A et C sont composées de 646 et 572 acides aminés, respectivement.

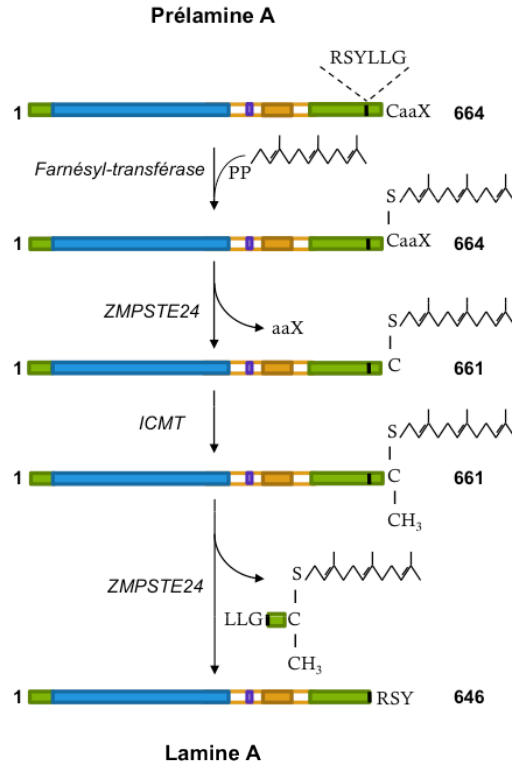


Figure 2. Maturation de la prélamine A.

La prélamine A est farnésylée au niveau de la cystéine du motif CaaX par la farnésyl-transférase. L'enzyme ZMPSTE24 clive les 3 derniers résidus de la prélamine A farnésylée. L'isoprénylcystéine-carboxyméthyl-transférase (ou ICMT) transfère un groupement méthyl (CH_3) sur la cystéine farnésylée. Enfin, la ZMPSTE24 clive les 15 derniers acides aminés de la prélamine A farnésylée et méthylée pour donner la lamine A mature.

La localisation cellulaire de ce processus est encore très discutée. L'ensemble de ces modifications aurait lieu dans le cytoplasme, les enzymes protéolytiques étant ancrées au réticulum endoplasmique (Firmbach-Kraft & Stick, 1995; Schmidt et al, 1998) mais pourrait aussi avoir lieu au niveau de la membrane nucléaire interne (Barrowman et al, 2008; Kilic et al, 1999 ; Zhang & Casey, 1996).

1-3 Expression des lamines A/C

Alors que les lamines de type B sont exprimées dans tous les types cellulaires, l'expression des lamines de type A est régulée au cours du développement. En général, elles sont absentes des cellules embryonnaires, incluant notamment les cellules souches embryonnaires et les carcinomes embryonnaires indifférenciés (Constantinescu et al, 2006; Rober et al, 1989 ; Stewart & Burke, 1987). Chez la souris, l'expression spatio-

temporelle des lamines A/C a été précisément documentée. Elles apparaissent aux alentours du 12^{ème} jour embryonnaire, d'abord dans les cellules de l'endoderme viscéral et dans le trophoctoderme. L'expression asynchrone du gène *Lmna* dans divers autres tissus commence alors, et, dans certains types cellulaires, l'expression du gène *Lmna* n'est effective qu'après la naissance (Rober et al, 1989).

Chez les animaux adultes, les cellules souches du système immunitaire et hématopoïétique (Rober et al, 1990), ainsi que les cellules souches épithéliales des villosités intestinales, continuent de n'exprimer que les lamines de type B. C'est seulement après leur différenciation que les lamines A et C peuvent être détectées dans la descendance de ces cellules. Les implications de cette évolution du patron d'expression des lamines A/C dans les tissus en cours de différenciation sont encore mal connues. Ces observations suggèrent une fonction importante des lamines A/C dans la régulation de l'organisation de la chromatine, nécessaire au lignage des cellules et au maintien de leur état différencié (Rober et al, 1989). Toutefois, l'invalidation du gène *Lmna* chez la souris n'induit pas de changements évidents dans le développement embryonnaire (Sullivan et al, 1999), les souris *Lmna*^{-/-} étant indiscernables des souris sauvages à la naissance.

1-4 Structure des lamines A/C

La structure générale des lamines est celle des filaments intermédiaires. De façon schématique, la structure de tous les filaments intermédiaires de type I à VI comprend trois parties : un domaine central formé d'heptades en hélice- α flanqué de deux extrémités non hélicoïdales (Herrmann et al, 2009) (Figure 3). C'est la présence de ce long domaine central en hélice- α qui donne aux filaments intermédiaires leur capacité à se dimériser. L'hélice- α est interrompue par trois petits domaines de liaisons ou *Linkers* (L1, L12, L2), qui subdivisent l'hélice en 4 domaines structuraux appelés coil1A, coil1B, coil2A et coil2B. Le domaine coil2A n'est long que de 19 acides aminés et forme une hélice avec le domaine L2. Les domaines coil2A, L2 et coil2B sont donc fréquemment considérés comme ne formant qu'un seul domaine : le coil2. Outre ces domaines de liaison interrompant la structure de l'hélice- α , une autre discontinuité appelée « stutter » (ou bégaiement) est présente dans le coil2B de tous les filaments intermédiaires. Le rôle de cette structure spécifique n'est pas très bien connu mais en

déformant localement la structure de l'hélice, en particulier lorsque celle-ci est étirée, il pourrait jouer un rôle dans la signalisation en réponse à l'étirement (Arslan et al, 2011). Le nombre d'acides aminés du domaine central est strictement conservé dans tous les filaments intermédiaires à l'exception des lamines où une insertion d'un groupe de 42 acides aminés a été décrite dans le coil1B (Herrmann et al, 2009). Une autre particularité des lamines est la présence d'une séquence de localisation nucléaire (NLS) et d'un domaine homologue des immunoglobulines (Ig-like), vraisemblablement impliqué dans des interactions protéine-protéine ou protéine-ADN.

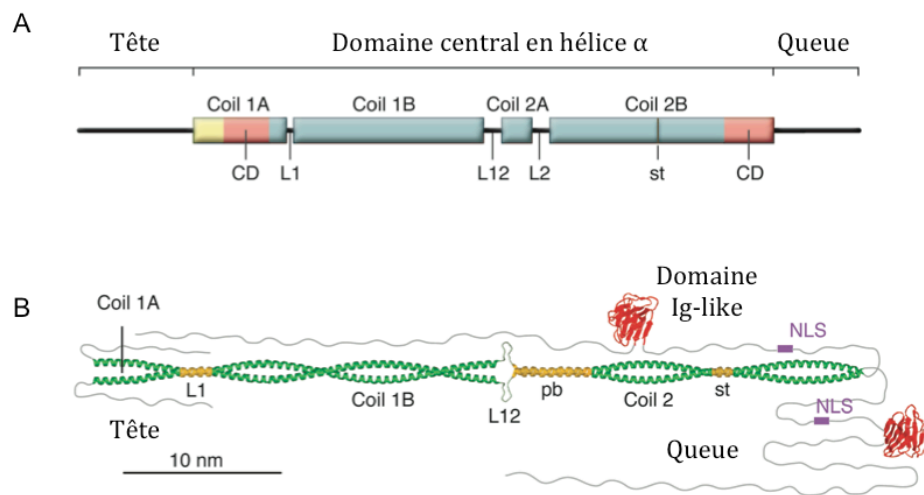


Figure 3. Structure moléculaire des lamines A/C.

(A) Représentation schématique de la structure des lamines A/C. CD représente les domaines conservés des filaments intermédiaires. L1, L12 et L2 représentent les domaines de liaison (linker) entre les différents domaines coil. St = stutter.

(B) Représentation de la structure d'un dimère de lamines A/C. La structure des domaines « tête » et « queue » est de type non-hélicoïdal. La structure prédite du domaine L2 est de type hélice α , les domaines L2 et coil 2A sont donc représentés comme une seule structure hélicoïdale appelée pb (paired bundle = fuseau jumelé).

(Adapté de Herrmann *et al.* 2009)

La conservation de leur séquence et donc de leur structure est primordiale pour l'assemblage des filaments intermédiaires (voir plus loin), ainsi que pour assurer les fonctions mécaniques de structure et d'élasticité qui les caractérisent.

1-5 Localisation des lamines A/C

Après leur synthèse et la maturation de la prélamine A, les lamines A et C sont importées dans le noyau. Elles contiennent une séquence de localisation nucléaire ou NLS et sont transportées dans le noyau via le système des importines- α/β et leur internalisation à travers les pores nucléaires. L'import des lamines semble être régulé par l'intermédiaire de phosphorylations de résidus Sérine et Thréonine proches de la séquence NLS (Hennekes et al, 1993 ; Leukel & Jost, 1995).

La majorité des lamines A/C forment un réseau fibreux dense et très organisé au sein de la lamina nucléaire, sous la membrane nucléaire interne (Aebi et al, 1986) (Figure 4). Il est à noter qu'elles sont aussi présentes dans le nucléoplasme sous une forme stable (Dechat et al, 2010).

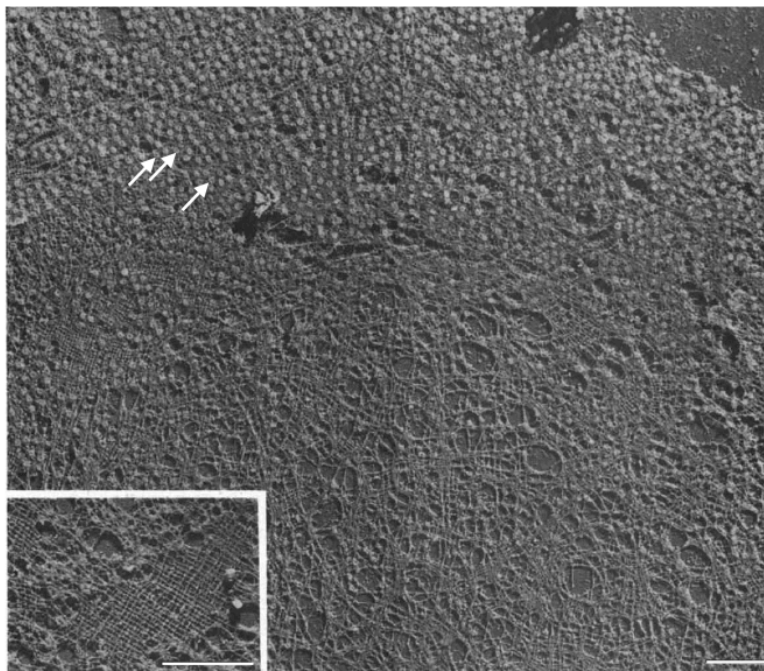


Figure 4. La lamina nucléaire d'un ovocyte de *Xenopus Laevis* en microscopie électronique

La membrane nucléaire a été solubilisée par un traitement au Triton X-100. La lamina insoluble et les pores nucléaires sont visibles (pour exemple, trois pores sont identifiés par les flèches). Dans les zones préservées de la préparation, la lamina est organisée en réseau orthogonal de filaments de $10,5 \pm 1,5$ nm de diamètre avec un espacement d'environ 52 nm. Ce réseau régulier est bien visible dans les zones où les pores nucléaires ont été enlevés mécaniquement (agrandissement).

Barre d'échelle = 1 μ m. (D'après Aebi et al. 1986)

L'expression et la bonne localisation sous membranaire des lamines A/C conditionnent la localisation de plusieurs protéines associées à l'enveloppe nucléaire telles que

l'émerine, les nesprines, SUN1 et SUN2 (Stewart-Hutchinson et al, 2008) (voir plus loin).

2-Assemblage, Dynamique

2-1 Assemblage des lamines au sein de la lamina

Qu'elles soient de type A ou de type B, les lamines n'existent pas de façon isolée mais forment des dimères. Il a été montré récemment qu'à l'intérieur même d'un type de lamines, les dimères s'assemblent de façon indépendante, les lamines A et C ne forment en effet que des homodimères A-A et C-C (Kolb et al, 2011). Au sein de la lamina nucléaire, les lamines sont organisées en réseau filamenteux. Bien que les lamines de type A et B puissent interagir *in vitro*, elles forment des réseaux structuraux et fonctionnels distincts dans les noyaux (Goldberg et al, 2008 ; Lammerding & Lee, 2005; Shimi et al, 2008).

L'assemblage des lamines en filaments suit les mêmes processus que celui de tous les filaments intermédiaires. Il a été bien caractérisé *in vitro* par l'étude de la desmine et de la vimentine (Herrmann et al, 1996 ; Kirmse et al, 2007; Mucke et al, 2004). Après l'assemblage en dimères de deux domaines hélicoïdaux appartenant à deux sous-unités parallèles, une super hélice gauche se forme. Le processus d'assemblage peut ensuite être disséqué en trois étapes majeures. La première phase consiste en l'association latérale de 8 tétramères tête-bêche pour former des ensembles en anneaux appelés ULFs (*Unit Length Filaments*), « sous-unités » minimales des filaments. Ces ULFs s'emboîtent ensuite de manière longitudinale pour former des filaments courts, qui s'associent à leur tour en série pour constituer des filaments longs. Cette étape serait conditionnée par « l'ouverture » de la partie N-terminale (tête globulaire et coil 1A) des dimères composant les ULFs, indiquant bien l'importance de ce domaine pour la formation et la stabilisation des filaments. Au cours de la troisième phase, se produit une compaction radiale des filaments d'un diamètre d'environ 16 nm pour former les filaments intermédiaires « matures » d'environ 11 nm de diamètre (Herrmann & Aebi, 1998).

Les interactions mises en jeu pour former les filaments intermédiaires et le réseau fibreux qui en découle sont des liaisons ioniques et hydrophobes, nécessitant bien souvent un respect scrupuleux de la séquence protéique. Ceci explique en partie les

effets drastiques des mutations conduisant à une modification de la charge ou de l'hydrophobicité des acides aminés des lamines A/C (voir plus loin).

2-2 Dynamique des lamines

Les filaments intermédiaires sont connus pour leur grande stabilité, contrairement aux microtubules et aux filaments d'actine, autres composants du cytosquelette très dynamiques.

Les propriétés dynamiques des lamines dans le noyau en interphase ont été étudiées grâce aux techniques d'extinction de fluorescence dans des cellules exprimant des protéines de fusion lamines-GFP. Ces techniques consistent à « éteindre » la fluorescence de la protéine d'intérêt puis à mesurer l'évolution de la fluorescence dans la zone blanchie ou à proximité. On distingue la « récupération de fluorescence après photoblanchiment » ou FRAP (fluorescence recovery after photobleaching) et la « perte de fluorescence » dans la région adjacente à la zone photoblanchie ou FLIP (fluorescence loss in photobleaching), les deux techniques étant complémentaires. Ceci permet d'évaluer la dynamique de la protéine étudiée : plus la récupération (FRAP) ou la perte (FLIP) de fluorescence est rapide, plus la protéine considérée est mobile et dynamique.

L'utilisation de ces techniques a mis en évidence la faible dynamique des lamines organisées au sein de la lamina. En effet, la lamine A et la lamine B1 couplées à la GFP sont quasi complètement immobile dans la lamina, comme le montre l'absence de récupération de la fluorescence plusieurs heures après photoblanchiment (Broers et al, 1999), allant jusqu'à 45 heures après pour la lamine B1 (Daigle et al, 2001).

En revanche, après photoblanchiment de la lamine C couplée à la GFP, une très forte diminution de la fluorescence au sein de la lamina voisine a été observée (Broers et al, 1999), indiquant que la lamine C serait bien plus mobile que les lamines A ou B1.

Ces résultats soulignent la grande stabilité et le rôle structural majeur des lamines A et B1. L'implication fonctionnelle du comportement plus dynamique de la lamine C au sein de la lamina nucléaire n'est pas très claire à l'heure actuelle. Elle pourrait agir comme un « cargo » pour ancrer différentes régions de la chromatine (ou de l'hétérochromatine) à la membrane nucléaire, inactivant ainsi l'expression des gènes de cette région. La lamine C pourrait ainsi « faire la navette » entre la lamina et le pool de lamines

nucléoplasmiques et jouer sur la régulation de la réplication et/ou de la transcription (Broers et al, 2006).

Les filaments intermédiaires sont des structures très stables et leur désassemblage est régulé essentiellement par phosphorylation. Le désassemblage des lamines est observé au cours de la mitose. Ce processus complexe, intervenant au début de la prophase, fait intervenir des phosphorylations des lamines A/C par la protéine kinase cdk1 et un effet de « traction » des microtubules sur l'enveloppe nucléaire. Les lamines A/C deviennent alors solubles et se dispersent dans le cytoplasme. Les lamines B, en revanche, ne se dissocient que plus tardivement et restent sous forme de particules aidant à la mise en place du fuseau mitotique de microtubules.

Ce n'est qu'après la cytokinèse et la reformation de l'enveloppe nucléaire que les lamines A/C sont transloquées via les pores nucléaires dans le noyau nouvellement formé. Elles se réassemblent alors rapidement au sein de la lamina.

3-Redondance des lamines ?

La question s'est posée quant à la redondance des lamines de type A et de type B d'une part, et des lamines A et C d'autre part. L'étude des pathologies humaines associées à des mutations de ces protéines ainsi que l'analyse de différents modèles animaux ont permis d'y répondre.

Aucune mutation du gène *LMNB1*, codant la lamine B1, n'a jamais été associée à une pathologie humaine, suggérant que l'absolu respect de la séquence de ce gène est nécessaire à la vie. Seuls des cas de duplication du gène ont été rapportés et conduisent à une leucodystrophie, pathologie neurodégénérative causée par une perte de myéline dans le système nerveux central (Padiath et al, 2006). Pour étudier la fonction de la lamine B1 *in vivo*, Vergnes et al (Vergnes et al, 2004) ont invalidé le gène *Lmnb1* chez la souris (*Lmnb1^{Δ/Δ}*). Les souris *Lmnb1^{Δ/Δ}* naissent avec un ratio mendélien normal mais ne survivent que quelques minutes après la naissance, indiquant que la lamine B1 est indispensable à la vie post-natale. Ce décès à la naissance est dû à des anomalies de développement des poumons et des défauts d'ossification chez ces animaux.

Comme pour le gène *LMNB1*, très peu de mutations du gène *LMNB2*, codant la lamine B2, ont été rapportées. Seules 3 variants ponctuels faux-sens ont été décrits comme facteur de risque chez des patients présentant une lipodystrophie partielle acquise (Hegele et al, 2006). Les souris invalidées pour le gène *Lmnb2* (*Lmnb2*^{-/-}) décèdent aussi quelques minutes après la naissance (Coffinier et al, 2010a). En revanche, contrairement aux souris *Lmnb1*^{Δ/Δ}, ce décès périnatal n'est pas du à des défauts pulmonaires mais cérébraux. Ces anomalies cérébrales résultent d'un défaut de migration des neurones chez ces souris *Lmnb2*^{-/-}. Il apparaît donc que les lamines B1 et B2 ne sont pas redondantes entre elles, ni redondantes avec les lamines A/C et qu'elles assurent des fonctions spécifiques primordiales dans le développement.

Contrairement aux lamines B, les lamines A/C ne sont pas indispensables au développement embryonnaire. En effet, les souris invalidées pour le gène *Lmna* n'exprimant ni lamine A ni lamine C (*Lmna*^{-/-}) naissent avec un ratio mendélien préservé et ne décèdent pas immédiatement à la naissance. En revanche, elles développent rapidement des défauts de croissance importants et une dystrophie musculaire associée à une cardiomyopathie dilatée, une diminution très importante du tissu adipeux notamment et des signes de neuropathie axonale (Cutler et al, 2002 ; De Sandre-Giovannoli et al, 2002 ; Nikolova et al, 2004; Sullivan et al, 1999).

Pour étudier les fonctions spécifiques des lamines A et C, des modèles murins n'exprimant que la lamine A (Coffinier et al, 2010b ; Davies et al, 2010) ou que la lamine C ont été créés (Fong et al, 2006).

Deux stratégies différentes ont été utilisées pour générer les souris n'exprimant que de la lamine A. Dans une première lignée, l'élimination des introns 10 et 11 du gène *Lmna*, abolissant l'expression de lamine C, a permis d'obtenir des souris n'exprimant que de la prélamine A (souris « prélamine A »). Cette prélamine A est ensuite maturée normalement et conduit à la production de lamine A (Davies et al, 2010). Le deuxième modèle a été obtenu par délétion de l'intron 10, empêchant la synthèse de la lamine C, et délétion de la fin de l'exon 11, de l'intron 11 et du début de l'intron 12, conduisant à la l'élimination des 18 acides aminés normalement clivés de la prélamine A. Les souris ainsi générées n'expriment donc plus que de la lamine A mature, sans expression de prélamine A (souris « lamine A mature ») (Coffinier et al, 2010b). Les souris « prélamine A », tout comme les souris « lamine A mature », ne présentent aucun phénotype

pathologique observable, bien que l'expression directe de la lamine A mature génère des anomalies nucléaires dans les fibroblastes embryonnaires issus de ces animaux.

Les souris n'exprimant que la lamine C ont été obtenues par « hasard » en reproduisant la délétion de 50 acides aminés observée chez les patients souffrant de progéria d'Hutchinson-Gilford (voir plus loin). Cette modification avait pour but premier de générer des souris produisant une prélamine A mutée. Ces animaux ne présentent aucune pathologie notable, hormis de rares anomalies de forme des noyaux et une légère augmentation de leur déformabilité (Fong et al, 2006).

Ces études montrent que la lamine A et la lamine C sont cruciales chez les mammifères mais que, contrairement aux lamines B1 et B2, elles semblent jouer des rôles largement redondants, et que l'une ou l'autre de ces isoformes est suffisante pour prévenir l'apparition de pathologie, chez la souris en tout cas. En revanche, le niveau d'expression des lamines A/C joue un rôle très important dans la physiologie cardiaque, notamment. Les souris *Lmna*^{+/-}, qui expriment des lamines A/C de structure normale mais à un niveau diminué, développent une cardiomyopathie.

4-Fonctions des lamines A/C

4-1 Maintien de la structure, de la rigidité de l'enveloppe nucléaire et connexions cytoplasmiques

Dans les cellules vivantes, le noyau et son contenu, tout comme le reste de la cellule, sont en permanence soumis à des contraintes mécaniques, qui se traduisent par des déformations et des réarrangements nucléaires. Ces forces peuvent provenir de l'intérieur du noyau, par exemple, à travers des processus transcriptionnels et la synthèse d'ADN, des remaniements du cytosquelette, ou de l'environnement cellulaire (cellules voisines ou matrice extracellulaire). Des expériences menées sur différents types cellulaires et utilisant diverses techniques pour appliquer des contraintes mécaniques, comme des aspirations par micropipette, de la microscopie à force atomique, de la compression par microplaques, de la mobilisation de particules, ou de l'application de tension sur la cellule, ont démontré que le noyau interphasique est environ 2 à 10 fois plus rigide que le cytoplasme environnant (Caille et al, 2002 ; Guilak

et al, 2000 ; Kha et al, 2004 ; Vaziri & Mofrad, 2007). Ces propriétés mécaniques sont principalement déterminées par la lamina nucléaire. Elle agit comme un élastique qui préserve l'intégrité du noyau, en particulier lorsque des forces de traction lui sont appliquées (Dahl et al, 2005 ; Dahl et al, 2004 ; Schape et al, 2009). Dans les cellules de mammifères, les lamines A et, dans un moindre mesure, les lamines C sont les principaux contributeurs de cette rigidité nucléaire. De nombreuses études réalisées sur des cellules provenant de souris *Lmna*^{-/-} ont démontré que les lamines A/C contribuent en effet de façon majeure à la structure et à la rigidité mécanique du noyau (Lammerding & Lee, 2005 ; Lammerding et al, 2004). Les fibroblastes embryonnaires (MEF) et les myoblastes de souris *Lmna*^{-/-} ont des noyaux beaucoup plus déformables que ceux des souris sauvages ou Wt (Wild-type). Les cellules n'exprimant que la lamine C ont un phénotype intermédiaire (Lammerding et al, 2006). En revanche, les noyaux de cellules dépourvues de lamines B1 fonctionnelles ont des propriétés mécaniques normales (Lammerding et al, 2006). En accord avec ces résultats, seule l'expression de lamine A restaure la rigidité nucléaire des MEF *Lmna*^{-/-} (Lammerding et al, 2006). Ces observations de différentes fonctions mécaniques des lamines de type A et B sont en accord avec le fait qu'elles forment des structures et des réseaux distincts (Goldberg et al, 2008; Shimi et al, 2008). En revanche, de manière symétrique, lorsque la lamine A est surexprimée dans des cellules Wt, la rigidité du noyau est augmentée (Friedl et al, 2011).

La lamina est en lien avec le cytosquelette et la membrane plasmique via un réseau d'interactions protéiques (Maniotis et al, 1997). Les nesprines appartiennent à une famille de protéines dites à répétition de domaine spectrine. Elles sont enchâssées dans la membrane nucléaire externe et se lient d'une part aux filaments du cytosquelette (actine par liaison directe (Padmakumar et al, 2004; Zhen et al, 2002), filaments intermédiaires via la plectine (Wilhelmsen et al, 2005), microtubules via les dynéines et kinésine 1 (Roux et al, 2009)) et via leur domaine KASH (Klarsicht/ANC-1/SYNE Homology) aux protéines SUN1 et 2 dans l'espace intermembranaire nucléaire d'autre part (Padmakumar et al, 2005). Les protéines SUN se lient aux lamines, à la chromatine et à d'autres protéines de l'enveloppe, créant ainsi une connexion physique entre l'intérieur du noyau et le cytoplasme (Haque et al, 2006 ; Starr & Fridolfsson, 2010). Ce lien physique est appelé complexe LINC (Linker of Nucleoskeleton and Cytoskeleton)

(Crisp et al, 2006). Toutes ces interactions, et en particulier la liaison SUN-lamines, sont nécessaires à la bonne localisation de ces protéines (Stewart-Hutchinson et al, 2008). Elles jouent un rôle crucial dans le positionnement du noyau lors de la migration cellulaire (Friedl et al, 2011), lors de la différenciation des fibres musculaire où le noyau migre sous la jonction neuromusculaire (Grady et al, 2005 ; Lei et al, 2009 ; Mejat et al, 2009; Zhang et al, 2007c) et permettent l'ancrage du noyau au sein des cellules (Luxton et al, 2011).

Le complexe LINC est aussi nécessaire à la transmission des forces intracellulaires (appliquées via une micro-aiguille se déplaçant dans le cytoplasme) et extracellulaires (générées par étirement du substrat d'adhésion des cellules) (Lombardi et al, 2011).

Il a en effet été montré que les cellules déficientes en lamines A/C ou en émerine sont incapables d'exprimer des gènes mécanosensibles *Iex-1* et *Egr-1* en réponse à un étirement cyclique, démontrant par là le rôle crucial des lamines A/C et, plus généralement, du complexe LINC dans la réponse des cellules aux contraintes physiques (Broers et al, 2004 ; Lammerding et al, 2005; Lammerding et al, 2004).

4-2 Organisation et expression du génome

Bien au delà de leur rôle « passif » de structuration de l'enveloppe, les lamines participent et sont nécessaires à la réplication, à l'organisation et à l'expression du génome.

Leur implication dans la réplication de l'ADN a été mise en évidence par l'étude d'extrait nucléaire d'œuf de Xénope. Dans ce type d'expérience, lorsque les extraits sont déplétés en lamines, la réplication de l'ADN est abolie, soulignant la nécessité des lamines dans ce processus (Meier et al, 1991). En 1993, Hozak *et al.*, ont décrit des « usines » de polymérisation de l'ADN fixées au nucléosquelette (Hozak et al, 1993). Cette observation a été confirmée par la présence de lamine B dans des foci répliatifs marqués avec du BrDU (Bromodeoxyuridine) et PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen), un facteur d'élongation impliqué dans la synthèse d'ADN (Moir et al, 1994).

Les lamines A/C jouent un rôle important dans le contrôle de l'expression génique en modulant l'organisation de la chromatine. Il a été montré *in vitro* que les lamines A/C se lient à l'ADN, soit directement via leur domaine en hélice α (Glass et al, 1993) et/ou leur domaine globulaire C-terminal (Taniura et al, 1995), soit indirectement par l'intermédiaire des histones nucléosomiques, de la protéine BAF (Barrier to Autointegration Factor) et des protéines à domaines LEM (telles que l'émerine, MAN1, LAP2...) (Dechat et al, 2009; Vlcek & Foisner, 2007b). Des analyses de microscopie ont démontré qu'une association de l'hétérochromatine périphérique avec les lamines et LAP2- α permet l'ancrage de zones chromatiniennes à l'enveloppe nucléaire, les rendant ainsi inactives. Ces complexes sont aussi impliqués dans le positionnement chromosomique (Dechat et al, 2009; Lee et al, 2009; Reddy et al, 2008; Verstraeten et al, 2007). Les lamines se lient aux MARs (Matrix Attachment Regions) (Zhao et al, 1996). Il a de plus été montré un rôle des lamines A/C dans la transcription et l'épissage des ARNm. Elles sont, en effet, retrouvées dans les zones de transcription et d'épissage actifs (Kumaran et al, 2002), et l'expression de lamines non fonctionnelles inhibe la transcription via l'ARN polymérase-II (Spann et al, 2002).

En plus des protéines nucléaires classiques que sont les lamines, l'émerine, MAN1 et LAP2, une nouvelle classe de protéines a émergé dans ce contrôle de l'expression génique. En effet, il a été décrit un rôle de la myosine I et de l'actine nucléaires dans la régulation spatiale de l'ARN polymérase-II (Hofmann et al, 2004; Pestic-Dragovich et al, 2000; Zhu et al, 2004), via leurs interactions avec l'émerine (Holaska et al, 2004; Holaska & Wilson, 2007). De la même manière, une forme nucléaire de titine, interagissant avec les lamines de type A et B, participerait à la dynamique des chromosomes et à la régulation de la prolifération (Machado & Andrew, 2000; Qi et al, 2008; Zastrow et al, 2006).

Les lamines A/C participent donc à la régulation de l'expression génique via des interactions directes avec l'ADN et les histones mais aussi via de nombreux facteurs de transcription tels que c-fos (Gonzalez et al, 2008; Ivorra et al, 2006), MOK2 (Dreuillet et al, 2002), SREBP-1 (Sterol Regulatory Element-Binding Protein 1) (Lloyd et al, 2002), pRb (RetinoBlastoma protein) (Ozaki et al, 1994), polycomb group ring finger protein 2 (Zhong et al, 2005). Tous ces facteurs jouent un rôle dans la balance prolifération/différenciation cellulaire.

L'interaction directe des lamines A/C et de protéines associées avec des facteurs de transcription constitue un mécanisme de « séquestration » de ces facteurs à l'enveloppe nucléaire, participant ainsi à la régulation de l'expression génique de plusieurs façons. Elles permettent de former des complexes où ces facteurs de transcription sont maintenus sous forme inactive. En revanche, ces complexes permettent aussi une activation rapide des facteurs de transcription qui les composent, en facilitant leurs modifications post-traductionnelles, comme des phosphorylations par exemple. Ce type de régulation a été bien mis en évidence pour le facteur de transcription c-fos, activé par ERK1/2 (Gonzalez et al, 2008; Ivorra et al, 2006).

Le facteur de transcription SREBP-1 joue un rôle clé dans l'homéostasie énergétique en régulant la lipogenèse via l'expression d'enzymes impliquées dans l'utilisation du glucose et la synthèse des acides gras, comme l'acétyl-CoA carboxylase ou la fatty-acid synthase (Ferre & Foufelle, 2007 ; Shimano, 2009). C'est aussi un déterminant majeur de la détermination et de la différenciation adipocytaires en régulant l'expression de PPAR γ (Kim & Spiegelman, 1996).

La protéine de rétinoblastome pRb est impliquée dans le contrôle de la sortie du cycle cellulaire et participe à la différenciation des myoblastes via son interaction avec des facteurs myogéniques comme MyoD (Frock et al, 2006; Walsh, 1997). Dans les cellules quiescentes, pRb hypophosphorylé se lie et inactive le complexe transcriptionnel E2F-DP, empêchant la progression du cycle cellulaire (Korenjak & Brehm, 2005). Lorsque les cellules prolifèrent, en revanche, pRb est hyperphosphorylé (ppRb) via le complexe cycline/Cdk. Cela a pour conséquence le relargage de E2F-DP et la transcription de ses gènes cibles, nécessaire au déroulement de la phase S. Il a été montré que les lamines A/C et LAP2 α interagissent avec pRb et régulent son niveau de phosphorylation, sa stabilité et sa localisation nucléaire, participant ainsi à la balance prolifération/différenciation cellulaire (Naetar & Foisner, 2009). Il est important de noter que pRb, via ses interactions avec les lamines A/C, l'émerine et LAP2 α , régule aussi la différenciation du tissu adipeux (Chen et al, 1996 ; Hansen et al, 2004), osseux (Thomas et al, 2001) et épidermique (Ruiz et al, 2004).

4-3 Régulation de voies de signalisation

De part leurs interactions avec des protéines de l'enveloppe comme l'émerine, MAN1, LAP2 β , LBR (Lamin B Receptor), les lamines A/C forment des complexes sous membranaires, sortes d'interfaces de régulation de voies de signalisation.

Comme je l'ai indiqué plus haut, ces plateformes sous membranaires sont essentielles dans le maintien sous forme inactive et la libération rapide de pool de molécules activées. On peut notamment décrire un rôle des lamines, de MAN1 et de l'émerine dans la régulation des voies Wnt/ β -caténine (Espada et al, 2008; Markiewicz et al, 2006), TGF β /Smad (Transforming Growth Factor β) (Van Berlo et al, 2005b), Notch (Scaffidi & Misteli, 2008) et MAPK (Mitogen Activated Protein Kinases) (Gonzalez et al, 2008; Ivorra et al, 2006; Muchir et al, 2009b). Là encore, les lamines et leurs partenaires agissent sur ces signalisations en modulant la disponibilité de cofacteurs ou d'inhibiteurs telle que la protéine phosphatase PP2A qui déphosphoryle R-Smad et pRb notamment (Van Berlo et al, 2005b). Ces voies de signalisation canoniques sont particulièrement importantes pour le contrôle de la prolifération/différenciation des cellules souches adultes et des précurseurs mais interviennent aussi dans la réponse adaptative des cellules à leur environnement.

Toutes ces observations démontrent un rôle fondamental des lamines A/C et de leurs partenaires dans toutes les fonctions du noyau (cycle cellulaire, différenciation, transcription, marque épigénétique), faisant des lamines bien plus que des protéines de structure. Il apparait ainsi de façon évidente que toute modification de fonction ou de structure des lamines est susceptible d'entraîner des défauts d'expression génique et est de nature à perturber de nombreuses voies de signalisation (Figure 5).

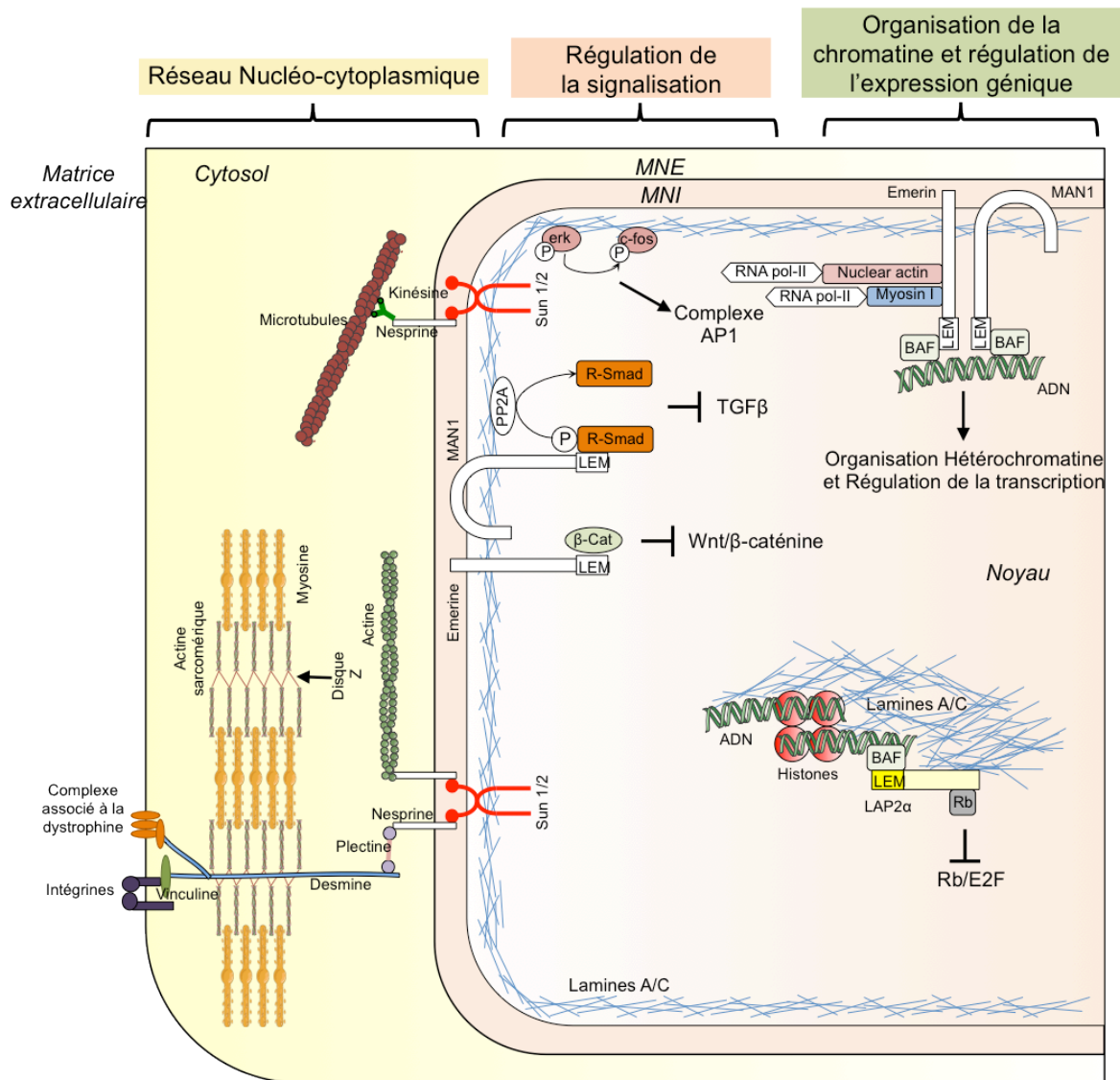


Figure 5. Représentation schématique des différents rôles et interactions des lamines A/C au sein d'une cellule musculaire.

Dans un but de clarté et de simplification toutes les protéines interagissant avec les lamines A/C ne sont pas représentées. La représentation des protéines ne tient pas compte de leur taille ni de leur structure réelles. MNE : membrane nucléaire externe, MNI : membrane nucléaire interne.

III- Pathologies liées aux mutations du gène *LMNA* : les laminopathies

De très nombreuses mutations du gène *LMNA* ont été identifiées. 408 mutations différentes ont été identifiées dont environ une centaine rapportée dans notre équipe restent non publiées (A.T. Bertrand, K. Chikhaoui, R. Ben Yaou and G. Bonne). Parmi les mutations publiées, on compte 301 mutations différentes, identifiées chez 1559 individus au sein de 721 familles (Bertrand et al, 2011b). Toutes ces mutations sont répertoriées dans la base de données UMD-*LMNA* créée par notre équipe

(www.umd.be/LMNA/). Cette base rassemble toutes les mutations publiées et identifiées lors du diagnostic génétique des patients. Les données cliniques associées aux mutations sont aussi renseignées.

1-Différents types d'atteintes

A l'heure actuelle, plus de dix pathologies différentes ont été associées des mutations du gène *LMNA*. Elles sont regroupées sous le terme de laminopathies. Ces pathologies sont extrêmement variées et affectent des tissus de manière sélective (muscles striés, tissu adipeux ou nerveux) ou systémique dans les syndromes de vieillissement prématuré (Worman & Bonne, 2007).

1-1 Laminopathies du muscle strié

Les laminopathies du muscle strié (LMS) représentent la forme majoritaire de laminopathies. Elles affectent les muscles squelettiques et/ou le muscle cardiaque. Il a été décrit quatre formes majeures de LMS affectant différents groupes musculaires avec une sévérité variable et toujours associées à une cardiomyopathie. Je ne présenterai dans cette section que les atteintes musculaires des LMS, la partie suivante de l'introduction traitant en détails la cardiomyopathie associée aux mutations du gène *LMNA*.

C'est en 1999 que la première mutation du gène *LMNA* a été identifiée au sein d'une famille dont les individus présentaient une dystrophie musculaire d'Emery-Dreifuss (EDMD) de transmission autosomique dominante (Bonne et al, 1999). Il a aussi été décrite une forme récessive rare d'EDMD liée à une mutation du gène *LMNA* (Raffaele Di Barletta et al, 2000). L'EDMD, décrite en 1966 (Emery, 2000), est caractérisée par une triade de symptômes : 1) des rétractions tendineuses précoces au niveau des coudes, des tendons d'Achille et de la colonne vertébrale, 2) une atrophie et une faiblesse musculaires lentement progressives des muscles huméro-péroniers dès l'enfance et 3) le développement à l'âge adulte d'une cardiomyopathie, souvent dilatée, associée à des troubles de rythme et/ou de la conduction pouvant conduire à des morts subites (DCM-CD).

La dystrophie musculaire des ceintures de type 1B (LGMD1B), une deuxième forme de LMS moins sévère et d'apparition plus tardive que l'EDMD, est caractérisée par une atrophie et une faiblesse musculaires au niveau des muscles des ceintures pelvienne et scapulaire. Les rétractions sont souvent absentes ou modérées et apparaissent assez tardivement. A l'âge adulte, les patients développent aussi une atteinte cardiaque similaire à celle observée dans l'EDMD (Muchir et al, 2000).

Enfin, des formes congénitales de dystrophie musculaire, liées au gène *LMNA* (L-CMD) ont été mises en évidence plus récemment (Quijano-Roy et al, 2008). Cette pathologie est caractérisée par une faiblesse et une atrophie musculaire apparaissant avant l'âge d'un an, touchant les muscles axiaux, cervico-axiaux, les muscles proximaux des membres supérieurs et distaux des membres inférieurs. Les patients développent une rigidité importante de la colonne vertébrale avec une lordose thoracique. Les rétractions tendineuses se développent plus tardivement au niveau des membres inférieurs, épargnant les coudes. Les patients développent un syndrome de « tête tombante » du à la faiblesse des muscles du cou. Ils acquièrent la marche mais la perdent rapidement, entre l'âge de 2 et 5 ans. Dans les cas les plus sévères, la faiblesse musculaire sévère conduit à une absence totale de développement moteur. L'évolution de la pathologie conduit au développement rapide d'une atteinte respiratoire, facteur mettant en péril la survie de ces patients. En revanche, l'atteinte cardiaque chez les patients souffrant de L-CMD ne semble pas se développer plus précocement que dans les autres LMS. Chez les patients les plus âgés de la cohorte, des troubles rythmiques et conductifs ont été observés.

La forme la plus sévère de LMS correspond à une forme d'akinésie fœtale sévère (SFAk) (Muchir et al, 2003). La SFAk, extrêmement rare, n'a été décrite qu'une seule fois. Elle est due à une mutation homozygote du gène *LMNA* identifiée dans une famille dans laquelle plusieurs individus étaient atteints de LGMD1B. L'enfant, né prématurément à 30 semaines d'aménorrhée, est décédé d'insuffisance respiratoire très peu de temps après la naissance. Il présentait une immaturité, une dysmorphie faciale, des rétractions tendineuses sévères des doigts et des orteils, des fractures multiples au niveau des os

longs, et une dystrophie musculaire sévère généralisée avec une absence quasi-complète des muscles intercostaux (van Engelen et al, 2005).

Les laminopathies du muscle strié peuvent donc être considérées comme une atteinte cardiaque à l'âge adulte associée ou non à une dystrophie musculaire de début et de sévérité variable. Notons que des phénotypes d'AD-EDMD, de LGMD1B et de DCM-CD associés à une même mutation ont été observés dans la même famille (Becane et al, 2000 ; Brodsky et al, 2000), suggérant que ces trois entités cliniques forment un continuum avec une expressivité variable des symptômes.

1-2 Laminopathies du tissu adipeux

La forme majoritaire des laminopathies du tissu adipeux est la lipodystrophie partielle familiale de type Dunnigan (FPLD) (Shackleton et al, 2000). Cette pathologie qui se développe à la puberté, est caractérisée par une répartition anormale du tissu adipeux sous-cutané. Il disparaît progressivement au niveau des membres et du tronc mais s'accumule au niveau du cou et du visage. La FPLD est aussi associée à des anomalies métaboliques de type insulino-résistance, intolérance au glucose, et au développement fréquent d'un diabète de type 2 (Cao & Hegele, 2000 ; Shackleton et al, 2000).

Des mutations du gène *LMNA* ont aussi été identifiées dans certains cas de syndrome de résistance à l'insuline de type A, associant un syndrome d'ovaires polykystiques avec une hyperandrogénie sévère, un acanthosis nigricans et une résistance marquée à l'insuline (Young et al, 2005).

1-3 Laminopathies du tissu nerveux

Une mutation homozygote du gène *LMNA* (p.R298C) a été associée à des cas de neuropathie axonale de Charcot-Marie-Tooth autosomique récessive (CMT2B1) dans plusieurs familles consanguines originaires d'Afrique du Nord exclusivement (De Sandre-Giovannoli et al, 2002). Cette pathologie est caractérisée par une faiblesse et une fonte musculaire, des déformations au niveau des pieds et une abolition des réflexes ostéotendineux. L'exploration électromyographique révèle des vitesses de conduction nerveuse normales ou modérément diminuées alors que la biopsie nerveuse montre une

dégénérescence des axones (Chaouch et al, 2003 ; Tazir et al, 2004). Pour l'heure, aucune autre mutation du gène *LMNA* n'a été associée à ce type d'atteinte.

1-4 Les syndromes de vieillissement prématurés

Bien que de nombreuses pathologies liées à des mutations du gène *LMNA* touchent de manière spécifique certains tissus, des mutations dans ce gène ont aussi été identifiées dans des pathologies touchant l'organisme de manière systémique et diffuse dans différents syndromes dits de vieillissement prématuré. Ils affectent les tissus osseux, cutané, musculaire et vasculaire avec une sévérité variable, et sont associés à des anomalies métaboliques diverses.

Le premier de ces syndromes à avoir été relié à des mutations du gène *LMNA* est la dysplasie acromandibulaire (ou MAD) (Novelli et al, 2002). Cette pathologie de transmission autosomique récessive est caractérisée par un début précoce, se manifestant par un retard de croissance post-natale, des anomalies crâniocfaciales avec un retard de la fermeture des sutures, une ostéolyse au niveau des clavicules, des orteils et des doigts et des anomalies pigmentaires cutanées. Les patients présentent également des troubles métaboliques relativement similaires à ceux observés dans les FPLD, avec de l'insulinorésistance et une lipoatrophie. Chez certains patients, des anomalies spécifiques des syndromes progéroïdes sont également observés, comme un faciès en « bec d'oiseau », une voie haut-perchée et une alopecie.

Peu de temps après la découverte de mutations dans les MAD, des mutations *LMNA* ont été identifiées dans un autre syndrome de vieillissement prématuré, la progéria de Hutchinson-Gilford (ou HGPS) (De Sandre-Giovannoli et al, 2003 ; Eriksson et al, 2003). Cette maladie, extrêmement rare, apparaît de manière sporadique et est liée à des néomutations hétérozygotes. A la naissance, les enfants ne présentent en général aucun symptôme, mais développent rapidement un retard de croissance sévère avec une insuffisance staturopondérale, une maturation sexuelle incomplète, mais aussi une athérosclérose au niveau de l'aorte, des artères coronaires et cérébrales, de nombreux troubles osseux (ostéoporose généralisée, une atteinte dégénérative des cartilages, ostéolyse claviculaire, phalangienne et de la tête fémorale, retard de fermeture de la fontanelle...) et dentaires ainsi que des rétractions tendineuses. Là aussi, des symptômes

assez proches de ceux rencontrés dans les FPLD sont observés avec une lipoatrophie généralisée et des troubles métaboliques associés. Contrairement à ce qui est observé au cours du vieillissement physiologique, le système nerveux central n'est pas touché. D'autre part, ces enfants ne développent pas de cancers. Le décès précoce survient en moyenne vers l'âge de 13 ans, le plus souvent à cause de l'insuffisance coronarienne.

Il existe d'autres syndromes progéroïdes très similaires entre eux, liés à des mutations du gène *LMNA* (LIRLLC (pour syndrome de « Lipoatrophie, Insulin-Resistance, Leukomelonodermic papules, Liver steatosis and Cardiomyopathy »), syndrome atypique de Werner ou syndromes progéroïdes atypiques) et récemment regroupés sous le terme de syndromes progéroïdes (Caux et al, 2003 ; Chen et al, 2003 ; Garg et al, 2009). Les premiers signes commencent souvent dans la seconde ou la troisième décennie de vie et correspondent à un vieillissement prématuré avec des symptômes relativement proches de ceux observés dans la MAD.

La forme la plus sévère de vieillissement prématuré est la dermopathie restrictive (RD) (Navarro et al, 2004). La RD est caractérisée par un retard de croissance intra-utérin, une peau rigide et épaisse, une arthrogrypose généralisée, une ostéolyse des clavicules et des extrémités. Le décès survient en période néonatale et est lié à une détresse pulmonaire.

Une représentation schématique des différents types de laminopathies est présentée figure 6.

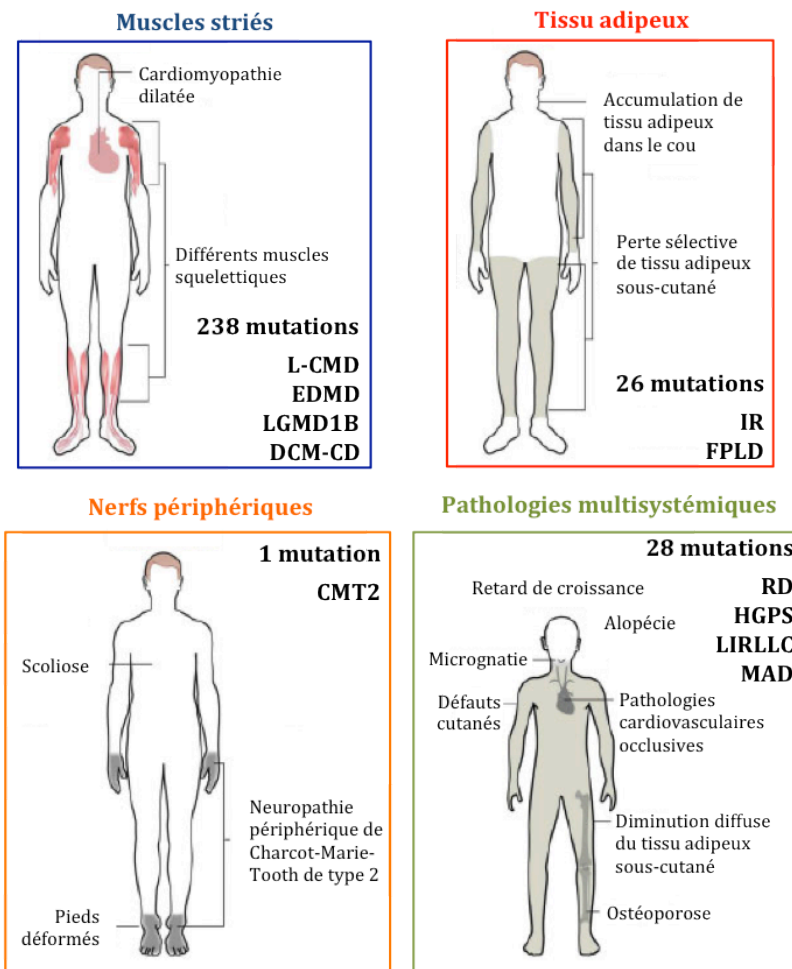


Figure 6. Représentation schématique des différentes formes de laminopathies

Les différentes laminopathies sont classées par type de tissus atteints. Les principaux symptômes, le nombre de mutations différentes et les acronymes des pathologies décrites sont indiqués pour chaque type de laminopathies.

1-5 Variabilité et chevauchement phénotypique des laminopathies

Pour compliquer encore le tableau clinique des laminopathies, des chevauchements phénotypiques sont fréquemment observés chez les patients porteurs de mutations *LMNA*. L'apparition de signes cliniques correspondant à différents sous-groupes de laminopathies décrits ci-dessus est en effet retrouvée dans 11% des mutations *LMNA* (Bertrand et al, 2011a). Des phénotypes musculaires peuvent ainsi être associés à une lipodystrophie partielle (Garg et al, 2002 ; van der Kooi et al, 2002), une atteinte des nerfs périphériques (Goizet et al, 2004) ou encore un syndrome de vieillissement prématuré (Kirschner et al, 2005). On peut donc parler de notion de « continuum » clinique.

Un continuum existe aussi en terme de sévérité des pathologies à l'intérieur d'un groupe défini de laminopathies comme je l'ai indiqué pour les laminopathies du muscle strié ou les syndromes de vieillissement prématuré, allant de formes congénitales (SFAk et L-CMD pour les laminopathies du muscle strié, RD pour les syndromes progéroïdes) à des formes adultes (LGMD1B, DCM-CD isolée ; et MAD, respectivement).

Il existe de plus une grande variabilité inter et intrafamiliale pour une même mutation *LMNA*, en particulier pour les laminopathies du muscle strié. Certains patients porteurs d'une même mutation développent une forme adulte (LGMD1B) ou congénitale (L-CMD) de dystrophie musculaire, c'est le cas pour la mutation p.E358K par exemple (Mercuri et al, 2004). Ce phénomène a aussi été observé au sein d'une même famille comme je l'ai indiqué plus haut (Becane et al, 2000 ; Brodsky et al, 2000). Il a aussi été rapporté des cas de non-pénétrance ou de pénétrance incomplète des mutations *LMNA* associées à des EDMD (Vytopil et al, 2002). Ceci suggère fortement l'existence de facteurs modifiant l'expressivité des phénotypes liés aux mutations du gène *LMNA*, comme par exemple l'existence de gènes modificateurs. Un travail réalisé au sein de notre équipe a mis en évidence l'existence d'un locus modificateur sur le chromosome 2 (Granger et al, 2011). L'exploration de ce locus est en cours actuellement.

2-Physiopathologie des laminopathies

La grande diversité des atteintes et la variabilité de leur sévérité rendent le champ des laminopathies très complexe. La compréhension des mécanismes à l'œuvre pour expliquer le caractère « segmentaire » de ces pathologies est encore loin d'être complète. Cependant, les études de corrélations génotype-phénotype et l'aide des modèles cellulaires et animaux ont permis la progression des connaissances dans ce domaine.

2-1 Type de mutations

Parmi les mutations *LMNA* répertoriées à ce jour, une grande majorité (près de 80%) correspond à des mutations conduisant à des laminopathies des muscles striés et représentent plus de 50% des cas de laminopathies. Les phénotypes chevauchants

constituent la seconde classe de laminopathies avec 11% des mutations *LMNA*, comme je l'ai indiqué plus haut. Enfin les différents syndromes de vieillissement prématuré, les laminopathies du tissu adipeux et celles du nerf périphérique ne représentent que 9,3%, 8,6% et 0,3% des mutations *LMNA*, respectivement (Bertrand et al, 2011a). Tous les types de mutation sont décrits (faux-sens, non-sens, délétions et insertions en phase et hors-phase, ainsi que des mutations introniques affectant les sites d'épissage) mais les mutations faux-sens sont très largement majoritaires avec 72,1% (tableau 1). Les mutations entraînant l'apparition d'un codon STOP prématuré (mutations non-sens et délétion/insertion hors phase) et donc une protéine tronquée représentent 14% des mutations du gène *LMNA*. Enfin, les mutations provoquant des épissages anormaux représentent 7,3% des mutations et les délétions ou insertions en phase 6,6%.

Tableau 1. Répartition des mutations publiées du gène *LMNA* en fonction des phénotypes cliniques.

	Laminopathies du muscle strié	Laminopathies du tissu adipeux	Laminopathies du nerf périphérique	Syndromes progéroïdes	Chevauchements phénotypiques *	Total
Mutations différentes	238 (79,1%)	26 (8,6%)	1 (0,3%)	28 (9,3%)	35 (10,9%) 8	301 (100%)
Faux-sens	161 (67,6%)	24 (92,3%)	1 (100%)	25 (89,3%)	30 (90,9%) 6	217 (72,1%)
Non-sens	14 (5,9%)	-	-	-	1 (3,0%) -	14 (4,7%)
Délétions/insertions en phase	18 (7,6%)	1 (3,8%)	-	-	2 (6,1%) 1	20 (6,6%)
Délétions/insertions hors phase	26 (10,9%)	-	-	1 (3,6%)	2 (6,1%) 1	28 (9,3%)
Mutations d'épissage	19 (8,0%)	1 (3,8%)	-	2 (7,1%)	-	22 (7,3%)

La première ligne indique le nombre total des mutations différentes pour chaque phénotype clinique.

* Pour les chevauchements phénotypiques, les chiffres de haut et les pourcentages indiquent les mutations retrouvées également dans les laminopathies sans chevauchement, les chiffres du bas indiquent les mutations identifiées dans les cas de chevauchements phénotypiques uniquement.

Dans les autres lignes, les pourcentages indiquent la fréquence des différents types de mutations pour chaque groupe phénotypique. (D'après Bertrand *et al.* 2011).

2-2 Corrélations génotype-phénotype pour les FPLD et les syndromes progéroïdes

Les 301 mutations du gène *LMNA* répertoriées sont réparties sur l'ensemble de la séquence du gène (Figure 7). Cependant, il apparaît que certaines mutations sont très fréquemment voire exclusivement liées au développement d'un type de laminopathies particulier, on parle alors de « points chauds » mutationnels. C'est le cas pour les FPLD, MAD et HGPS où 80%, 85% et 77% des mutations touchent l'acide aminé R482, R527 et G608, respectivement.

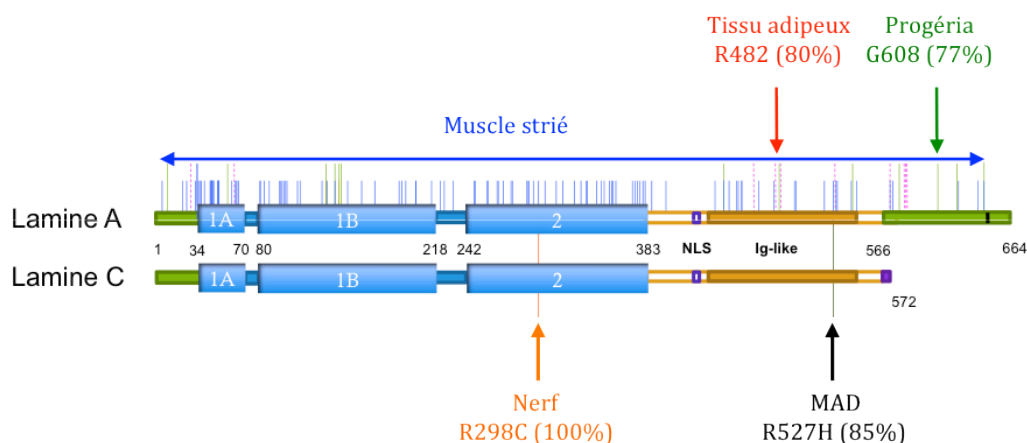


Figure 7. Répartition des mutations des lamines A/C aboutissant aux différents phénotypes cliniques des laminopathies.

Les mutations entraînant des laminopathies des muscles striés (L-CMD, EDMD, LGMD1B, DCM-CD), indiquées par les barres bleues, sont localisées tout au long des protéines. Les mutations entraînant des laminopathies du tissu adipeux, indiquées par des pointillés rouges, sont localisées essentiellement dans les domaines N- et C-terminaux, mais surtout au niveau du domaine Ig-like avec un « point chaud » de mutation au niveau du résidu R482 (80 % des patients). Les mutations entraînant des syndromes de vieillissement prématuré (HGPS, RD, SFAk et MAD), grandes barres verticales vertes, sont retrouvées majoritairement dans le domaine en N- et C-terminaux avec un « point chaud » en position G608 (77 % des patients avec HGPS) et un point chaud en position R527 (85 % des patients avec MAD). La mutation entraînant une laminopathie isolée du nerf périphérique correspond à l'unique mutation p.R298C.

Dans les FPLD, toutes les mutations décrites sont de type hétérozygote. L'acide aminé arginine 482 majoritairement muté dans ces atteintes est un acide aminé chargé positivement et situé dans le domaine Ig-like des lamines A/C, domaine particulièrement impliqué dans les interactions protéiques comme je l'ai indiqué plus haut. La modélisation 3D de ce domaine a montré que ce résidu est situé à l'extérieur de la structure, la modification de la charge de cet acide aminé ne modifie donc pas la structure du domaine Ig-like mais pourrait en revanche altérer ses interactions avec

différents partenaires protéiques (Krimm et al, 2002). Cette hypothèse est appuyée par l'observation que l'interaction entre les lamines A/C et SREBP-1, facteur de transcription impliqué dans la différenciation du tissu adipeux et le métabolisme glucidique, est diminuée lorsque la R482 est mutée (Lloyd et al, 2002). D'autre part, la voie Wnt/ β -catenin, régulée par les lamines et l'émerine, réprime l'adipogénèse en inhibant PPAR γ (Ross et al, 2000). Une dérégulation de cette voie pourrait donc intervenir dans la physiopathologie des FPLD. De la même manière, j'ai introduit plus haut le rôle de la protéine pRb dans l'adipogénèse.

Malgré l'importance que semble avoir l'acide aminé R527 dans la physiopathologie des MAD, aucun mécanisme physiopathologique particulier n'a pour le moment été identifié.

La principale mutation conduisant à HGPS est une néomutation de type hétérozygote et dite « silencieuse » au niveau de la séquence peptidique (p.G608G). Elle active un site cryptique d'épissage, entraînant la production d'un ARN messager délété des 150 derniers nucléotides de l'exon 11. Cette délétion préserve la phase de lecture sur l'exon 12 et aboutit à la production d'une protéine de 614 acides aminés, appelée progérine, plus petite de 50 acides aminés que la lamine A mature (De Sandre-Giovannoli et al, 2003). Ces 50 acides aminés contiennent le deuxième site de clivage protéolytique reconnu par l'endoprotéase *ZMPSTE24*. La délétion de ce site de clivage entraîne donc une accumulation de progérine farnésylée et carboxyméthylée (Figure 8). Cette accumulation est toxique pour la cellule en partie à cause d'une plus grande sensibilité de l'ADN aux dommages et d'un défaut de recrutement de facteurs de réparation de l'ADN, conduisant ainsi une instabilité génomique accrue (Liu et al, 2005). Là encore un rôle de pRb a été décrit dans ce processus de réparation et de sénescence (Campisi, 2005). Dans les cellules de patients HGPS, la signalisation Notch est aussi altérée, suractivée par la présence de progérine (Pereira et al, 2008). Ceci pourrait avoir un impact non négligeable sur le renouvellement et la réponse des cellules souches mésenchymateuses aux défauts vasculaires notamment (Abedin et al, 2004), Notch3 modulant la réponse de ces cellules dans un contexte d'altérations vasculaires (Wang et al, 2008a), majeures chez ces patients.

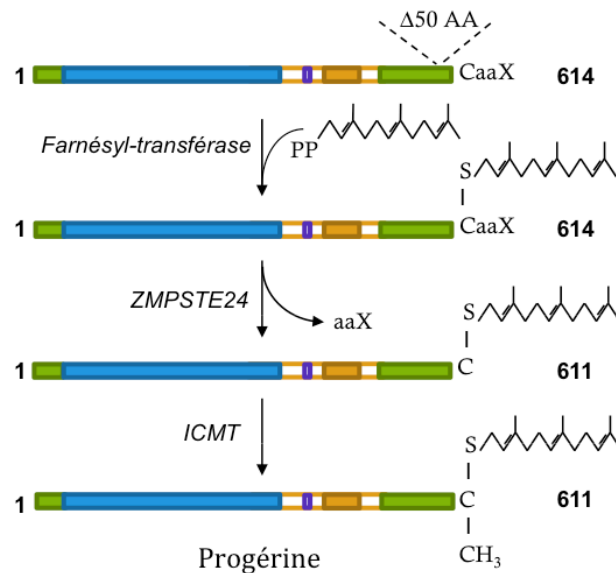


Figure 8. Défaut de maturation de la progérine.

Les prélamines A retrouvées dans les syndromes de vieillissement prématuré ont une délétion de 50 acides aminés (mutations p.G608G ou p.V607V) ou de 90 acides aminés (mutation c.1968+1G>A), abolissant le second site de clivage par ZMPSTE24. L'étape de farnésylation, le premier clivage et la méthylation de la dernière cystéine ont lieu mais le second clivage ne peut être réalisé et la protéine ainsi générée, appelée progérine, reste farnésylée et méthylée.

Encore une fois, de nombreuses exceptions et observations contradictoires compliquent le tableau des relations génotype-phénotype. En effet, différentes mutations *LMNA* ont été observées chez des individus HGPS ou d'autres syndromes progéroïdes, sans accumulation de progérine (Garg et al, 2009 ; Liang et al, 2009; Plasilova et al, 2004 ; Verstraeten et al, 2006). De plus, une accumulation de prélamine A farnésylée a également été observée dans les tissus de patients FPLD (Capanni et al, 2005).

2-3 Physiopathologie des laminopathies du muscle strié

S'il est un type de laminopathies pour lequel les relations génotype-phénotype sont particulièrement complexes, c'est celui des laminopathies du muscle strié. En effet, il n'y a pas de « point chaud » mutationnel contrairement aux autres laminopathies, les 238 mutations recensées sont réparties sur toute la longueur du gène (Figure 7). Tous les types de mutations ont été décrits. Les plus fréquentes restent les faux-sens et petites délétions/insertions en phase comme dans les autres types de laminopathies. Ce qui est

notable et spécifique à ce groupe, en revanche, c'est la proportion non négligeable (16,8%) de mutations non-sens et de délétions/insertions hors phase conduisant à l'apparition de codon stop prématuré. Dans la plupart des cas, la protéine tronquée qui en résulte n'est pas retrouvée dans les tissus et les cellules des patients. Ceci s'explique par la dégradation probable des ARN messagers via le système « nonsense mediated decay » (NMD, système dégradant une partie des ARN messagers présentant un STOP prématuré), et/ou par la dégradation de la protéine tronquée qui perturbe sans doute l'assemblage correct des dimères. Cela conduit donc à une haploinsuffisance des lamines A/C (exemple des mutations p.Q6X ou p.Y259X) (Becane et al, 2000 ; Muchir et al, 2003). Dans le cas des mutations faux-sens ou des délétions/insertions en phase, un grand nombre de mutations sont considérées comme des mutations altérant particulièrement la conformation de la protéine. Parmi les mutations faux-sens dans ce groupe de laminopathies, plus de 22% correspondent à une substitution par une proline (www.umd.be/LMNA/). De par la conformation spécifique de cet acide aminé, ce type de substitution est connu pour altérer la régularité des structures hélicoïdales, comme celles localisées dans le domaine en hélice α , nécessaire à la dimérisation des lamines. Ainsi, ce type de mutation entraîne vraisemblablement des anomalies d'assemblage (Wiesel et al, 2008). De la même manière, les mutations touchant le domaine Ig-like des lamines conduisent à une déstructuration de ce domaine, par opposition aux mutations de ce domaine conduisant aux FPLD (voir plus haut) (Krimm et al, 2002).

Dans la même ligne, l'étude de Benedetti et al., portant sur la corrélation entre le type de mutations, leur localisation et la sévérité de l'atteinte musculaire associée, a montré que les patients ayant une atteinte musculaire précoce ont essentiellement des mutations faux-sens dans les domaines IgG-like et coil 2A, tandis que les patients développant des atteintes musculaires plus tardives portent plutôt des mutations entraînant un décalage du cadre de lecture et donc un codon STOP prématuré, généralement localisé dans le domaine coil 2B (Benedetti et al, 2007).

Il apparaît ainsi que les mutations conduisant aux LMS sont de nature à perturber la structure du réseau de lamines, soit en perturbant l'assemblage des filaments, soit en diminuant la quantité de lamines polymérisées au sein de ce réseau. C'est notamment cette observation qui a conduit à la formulation de l'hypothèse selon laquelle les LMS seraient dues à un défaut de structure et de rigidité de la lamina nucléaire, propriétés

particulièrement importantes pour des cellules constamment soumises à des contraintes mécaniques fortes comme c'est le cas du muscle strié : hypothèse dite « structurale/mécanique ».

Bien que l'hypothèse d'un défaut mécanique soit appuyée par différentes études réalisées sur des cellules déficientes en lamines A/C (Broers et al, 2004 ; Lammerding & Lee, 2005; Lammerding et al, 2004), le défaut d'interaction avec des facteurs de transcription (pRb) ou de voies de signalisation (voir plus haut) impliqués dans l'homéostasie et la différenciation musculaire est aussi à prendre en compte pour expliquer les LMS (Naetar & Foisner, 2009).

Il convient de souligner que d'un point de vue morphologique, la grande majorité des mutations *LMNA* conduisant à des pathologies, quel qu'en soit le type, est associée à des anomalies de structure des noyaux plus ou moins marquées. Ont été observées des herniations de la membrane nucléaire, des ruptures de membranes avec fuite de chromatine dans le cytoplasme, des blebs (bourgeonnement de la membrane nucléaire) et des modifications de la forme des noyaux, souvent allongés. Toutes ces anomalies traduisent les profondes modifications qui ont lieu au sein des noyaux « laminopathes ».

2-4 Résumé des hypothèses à l'origine des laminopathies

Pour faire une synthèse, trois hypothèses sont communément admises pour expliquer les laminopathies (Broers et al, 2006):

- L'hypothèse structurale ou mécanique propose que les lamines mutées pourraient perturber la structure et la résistance de l'enveloppe nucléaire, conduisant à une fragilité accrue des cellules soumises à des contraintes mécaniques importantes comme c'est le cas des cellules musculaires.
- L'hypothèse génique ou signalétique propose que les changements de séquence et de structure des lamines A/C pourraient induire des modifications de l'expression de gènes spécifiques de certains tissus et/ou altérer des voies de signalisation majeures impliquées dans le développement ou le maintien des tissus atteints dans les laminopathies.

- L'hypothèse de toxicité suggère que certaines mutations aboutissent à des lamines ayant un effet toxique sur l'homéostasie cellulaire, comme c'est le cas de la progérine ou la prélamine A.

Ces trois hypothèses ne sont bien sûr pas mutuellement exclusives et c'est probablement leur combinaison qui conduit au développement des pathologies.

IV- Les cardiomyopathies dilatées

1-Phénotype clinique

Le type de cardiomyopathies le plus fréquemment observé à travers le monde est la cardiomyopathie dite dilatée (CMD). Son incidence est de 5 à 8/100 000 individus par an et sa prévalence est évaluée à environ 1/2500 (Richard et al, 2010). Elle est caractérisée principalement par des défauts contractiles du ventricule gauche autrement appelés dysfonction systolique. Outre la dysfonction systolique, une dysfonction diastolique peut parfois être observée mais ne constitue pas une manifestation majeure de la CMD. En revanche, cette pathologie est fréquemment associée à des arythmies ventriculaires, augmentant le risque de mort subite chez les patients souffrant de CMD.

Du point de vue morphologique, la CMD est associée à un remodelage complexe d'un ou des deux ventricules, résultant en une augmentation de la masse et un changement de la géométrie du ventricule gauche principalement, qui devient plus sphérique, en lien avec un changement de l'architecture des fibres myocardiques (Watkins et al, 2011). L'examen microscopique révèle généralement des plages de fibrose interstitielle et périvasculaire avec parfois des zones de nécrose et d'infiltrat cellulaire. La taille des cardiomyocytes est modifiée et hétérogène, certains pouvant être atrophiés alors que d'autres sont hypertrophiés. De façon générale, les cardiomyocytes du cœur dilaté sont plus longs et plus étroits que dans un cœur sain. Ce phénomène correspond à un processus de remodelage cellulaire appelé hypertrophie excentrique qui consiste en l'ajout d'unités contractiles (sarcomères) en série. Ce remodelage est destiné à réduire la contrainte s'appliquant sur les parois ventriculaires au moment de la contraction cardiaque (Gaasch & Zile, 2011).

2-Etiologie

L'étiologie de la CMD est variée et complexe. Elle peut en effet être primaire et acquise, liée à des facteurs génétiques ou mixtes, mais elle peut aussi être secondaire à d'autres affections de type systémique (inflammatoire ou autoimmune par exemple). Les CMD primaires acquises résultent généralement de cardiomyopathies inflammatoires comme les myocardites (Castellano et al, 2008). Elles peuvent aussi être secondaires à la

parturition ou encore être induite par une tachycardie (Bhattacharyya et al, 2012 ; Calo et al, 2007).

3-Les cardiomyopathies dilatées familiales

Dans de nombreux cas, la CMD primaire est d'origine génétique, on parle alors de cardiomyopathie dilatée familiale (CMD-F). La proportion de CMD-F est comprise entre 20 et 48% de l'ensemble des cas de CMD (Petretta et al, 2011; Taylor et al, 2006) et se transmet préférentiellement sur le mode autosomique dominant (Burkett & Hershberger, 2005). La CMD-F est très hétérogène sur le plan génétique. En effet, à ce jour, une quarantaine de gènes ont été rapportés comme associés aux CMD-F (tableau 2). Ces gènes codent des protéines associées à tous les compartiments cellulaires (canaux ioniques, sarcomère, cytosquelette extra-sarcomérique, matrice extracellulaire, noyau...) et impliquées dans de nombreuses fonctions du cardiomyocyte telles que la génération et la transmission de la force, la régulation de l'expression génique et l'homéostasie calcique. Ceci indique que les causes génétiques et les mécanismes physiopathologiques sous-tendant la CMD-F sont multiples et complexes. On note cependant une surreprésentation des gènes codant des protéines du sarcomère et du cytosquelette comme cause de CMD-F (Tableau 2). Certains de ces gènes sont aussi responsables de pathologies musculaires associées à la CMD-F.

Tableau 2. Gènes impliqués dans les CDM-F (Adaptée de Hershberger *et al.*, 2011)

Gène	Protéine	Localisation	Fonction	% CMD-F	Réf	Phénotype musculaire associée
<i>TTN</i>	Titine	Sarcomère	Tension passive ; relaxation élastique	0,25	(Herman et al, 2012)	Dystrophie musculaire tibiale et LGMD2J (Bushby & Beckmann, 2003; Hackman et al, 2002)
<i>LMNA</i>	Lamines A/C	Noyau	Structure/stabilité de la membrane interne ; expression génique ; signalisation	0,06	(Arbustini et al, 2002; Fatkin et al, 1999)	EDMD, LGMD, L-CMD (Quijano-Roy et al, 2008; Worman & Bonne, 2007)
<i>MYH6</i>	Chaîne lourde de myosine, isoforme α	Sarcomère	Protéine contractile	0,043	(Hershberger et al, 2010)	-
<i>MYH7</i>	Chaîne lourde de myosine, isoforme β	Sarcomère	Protéine contractile	0,042	(Villard et al, 2005)	Myopathie scapulo-péronière (Pegoraro et al, 2007)
<i>MYPN</i>	Myopalladin	Disque Z, noyau	Interagit avec CARP, α -actinine, nébuline ; structure du disque Z et signalisation via CARP	0,035	(Duboscq-Bidot et al, 2008)	-
<i>TNNI2</i>	Troponine T cardiaque	Sarcomère	Régulation de la contraction	0,029	(Hershberger et al, 2008)	-
<i>SCN5A</i>	Canal sodium	Sarcolemme	Régulation flux sodique	0,026	(Hershberger et al, 2008)	-
<i>MYBPC3</i>	Protéine interagissant avec la myosine, isoforme cardiaque	Sarcomère	Régulation de la contraction	0,02	(Hershberger et al, 2010)	-
<i>RBM20</i>	Protéine interagissant avec l'ARN, isoforme 20	Noyau	Complexe d'épissage	0,019	(Brauch et al, 2009)	-
<i>TMPO</i>	Thymopoïétine = LAP2	Noyau	Interaction avec les lamines	0,011	(Taylor et al, 2005)	-
<i>LAMA4</i>	Laminine $\alpha 4$	Matrice extracellulaire		0,011	(Knoll et al, 2007)	-
<i>VCL</i>	Métavinculine	Disque intercalaire	Ancrage de l'actine à la membrane	0,01	(Olson et al, 2002)	-
<i>LBD3/ZASP</i>	Protéine liant le domaine LIM, 3	Cytosquelette	Assemblage du cytosquelette et clustering de protéines membranaires	0,01	(Hershberger et al, 2008)	Myopathie myofibrillaire (Selcen & Engel, 2005)

Gène	Protéine	Localisation	Fonction	% CMD-F	Réf	Phénotype musculaire associée
<i>TCAP</i>	Téléthonine	Disque Z	Assemblage sarcomère ; Interaction avec la titine	0,01	(Hershberger et al, 2008)	LGMD (Moreira et al, 2000)
<i>PSEN1/2</i>	Preseniline 1/2	Sarcolemme	Activité γ sécrétase	0,01	(Li et al, 2006)	-
<i>ACTN2</i>	α -actinine 2	Sarcomère	Ancrage de l'actine myofibrillaire	0,009	(Mohapatra et al, 2003)	-
<i>CRYAB</i>	α -B Crystalline	Cytosquelette	Chaperonne	0,007		Myopathie myofibrillaire (Selcen & Engel, 2003)
<i>TPM1</i>	α -tropomyosine	Sarcomère	Régulation de la contraction	0,006	(Hershberger et al, 2010)	-
<i>ABCC9</i>	Sulfonylurée récepteur 2A	Sarcolemme	Régulation de l'activation de canal potassium Kir6.2	0,006	(Bienengraeber et al, 2004)	-
<i>ACTC</i>	Actine cardiaque	Sarcomère	Protéine contractile	0,005	(Olson et al, 1998 ; Tesson et al, 2000)	-
<i>PDLIM3</i>	Protéine à domaine PDZ LIM 3	Cytosquelette	Organisation disque Z	0,005	(Arola et al, 2007)	-
<i>ILK</i>	Kinase liée aux intégrines	Sous sarcolemmale	Sérine-thréonine kinase	0,005	(Knoll et al, 2007)	-
<i>TNNC1</i>	Troponine C cardiaque	Sarcomère	Régulation de la contraction	0,004	(Hershberger et al, 2010)	-
<i>TNNI3</i>	Troponine I cardiaque	Sarcomère	Régulation de la contraction	0,004	(Hershberger et al, 2010)	-
<i>PLN</i>	Phospholamban	Reticulum sarcoplasmique	Régulation de SERCA ; homéostasie calcique	0,004	(Schmitt et al, 2003 ; Villard et al, 2005)	-
<i>DES</i>	Desmine	Cytosquelette	Transmission de le force	0,003	(Goldfarb et al, 1998)	Myopathie (Dalakas et al, 2000 ; Munoz-Marmol et al, 1998)

Gène	Protéine	Localisation	Fonction	% CMD-F	Réf	Phénotype musculaire associée
<i>SGCD / SGCG / SGCB</i>	δ-sarcoglycane / γ-sarcoglycane / β-sarcoglycane	Sous- sarcolemmale	Transmission de la force	0,003	(Barresi et al, 2000; Calvo et al, 2000 ; Fanin et al, 2003)	LGMD (Calvo et al, 2000 ; Fanin et al, 2003; Nigro et al, 1996)
<i>CSRP3/M LP</i>	Protéine LIM musculaire	Disque Z	Senseur d'étiement	0,003	(Hershberger et al, 2008)	-
<i>ANKRD1</i>	Protine à répétition Ankyrine ; CARP	Disque Z, noyau	Interaction avec titine et myopadalline, cofacteur de transcription	-	(Duboscq-Bidot et al, 2009)	-
<i>DMD</i>	Dystrophine	Sous- sarcolemmale	Transmission de la force	-	(Muntoni et al, 1993; Towbin et al, 1993)	Dystrophie musculaire de Duchenne, Dystrophie musculaire de Becker (Muntoni et al, 2003)
<i>FKRP</i>	Fukutin-related protein	Sous- sarcolemmale	Interaction avec la dystrophine	-	(Muller et al, 2005)	LGMD (Boito et al, 2005; Mercuri et al, 2003)
<i>TAZ/ G4.5</i>	Tafazzine	Mitochondrie	Métabolisme de la cardioline	-	(D'Adamo et al, 1997)	Syndrome de Barth (Barth et al, 1983)
<i>EYA4</i>	Eyes absent 4	Noyau	Co-activateur transcriptionnel	-	(Schonberger et al, 2005)	-
<i>EMD</i>	Emerine	Noyau	Structure/stabilité de l'enveloppe nucléaire ; expression génique ; signalisation	-	(Bione et al, 1994)	EDMD (Bione et al, 1994)
<i>SYNE1 / SYNE2</i>	Nesprine 1 / Nesprine 2	Noyau	Structure/stabilité de l'enveloppe nucléaire ; expression génique ; signalisation	-	(Puckelwartz et al, 2010)	EDMD (Zhang et al, 2007b), arthrogrypose (Attali et al, 2009)
<i>BAG3</i>	B-cell lymphoma 2- associated athanogene 3	Disque Z	Co-chaperonne, rôle dans l'autophagie	-	(Villard et al, 2011)	Dystrophie musculaire sévère (Selcen et al, 2009)

4-Les cardiomyopathies dilatées liées au gène *LMNA*

4-1 La *cardiolaminopathie* « classique »

Parmi les gènes couramment analysés en diagnostic génétique des CMD-F, le second le plus souvent identifié comme causal est le gène *LMNA*. Il est retrouvé muté dans environ 6% des cas de CMD-F (Hershberger & Siegfried, 2011). Cette proportion monte à 33% lorsque l'on considère les patients présentant une CMD-F avec défauts de conduction (Arbustini et al, 2002), plaçant le gène *LMNA* comme l'une des premières causes génétiques de ce type d'atteinte. La nomenclature OMIM de la CMD associée à des mutations du gène *LMNA* est CMD1A (OMIM #115200), alternativement représentée par l'acronyme DCM-CD (Cardiomyopathie dilatée avec défaut de conduction) et que j'appellerai « *cardiolaminopathie* » dans la suite de ce mémoire. Elle a été décrite en 1999 (Fatkin et al, 1999). Il existe une grande variabilité dans l'âge d'apparition des premiers symptômes cardiaques, cependant on peut dresser un enchaînement stéréotypé d'événements en trois stades (van Berlo et al, 2005a) (Figure 9).

- 1) Le premier signe apparaît généralement entre 20 et 30 ans sous la forme de troubles conductifs (bloc auriculoventriculaire (BAV) de premier degré, blocs intraventriculaires) et du rythme supraventriculaire.
- 2) Ces troubles conductifs s'aggravent ensuite, avec l'apparition de BAV de deuxième ou troisième degré, et apparaissent des troubles du rythme ventriculaire graves. Cette aggravation des troubles électriques nécessite souvent la pose d'un appareillage (pacemaker, défibrillateur implantable). Parallèlement à cela, la fonction systolique ventriculaire gauche commence à diminuer.
- 3) La troisième « phase » correspond à la détérioration importante de la fonction systolique ventriculaire gauche, associée à la dilatation ventriculaire. Cette dysfonction contractile est associée à un risque thromboembolique accru et peut aboutir à l'insuffisance cardiaque terminale et à la nécessité d'une transplantation cardiaque.

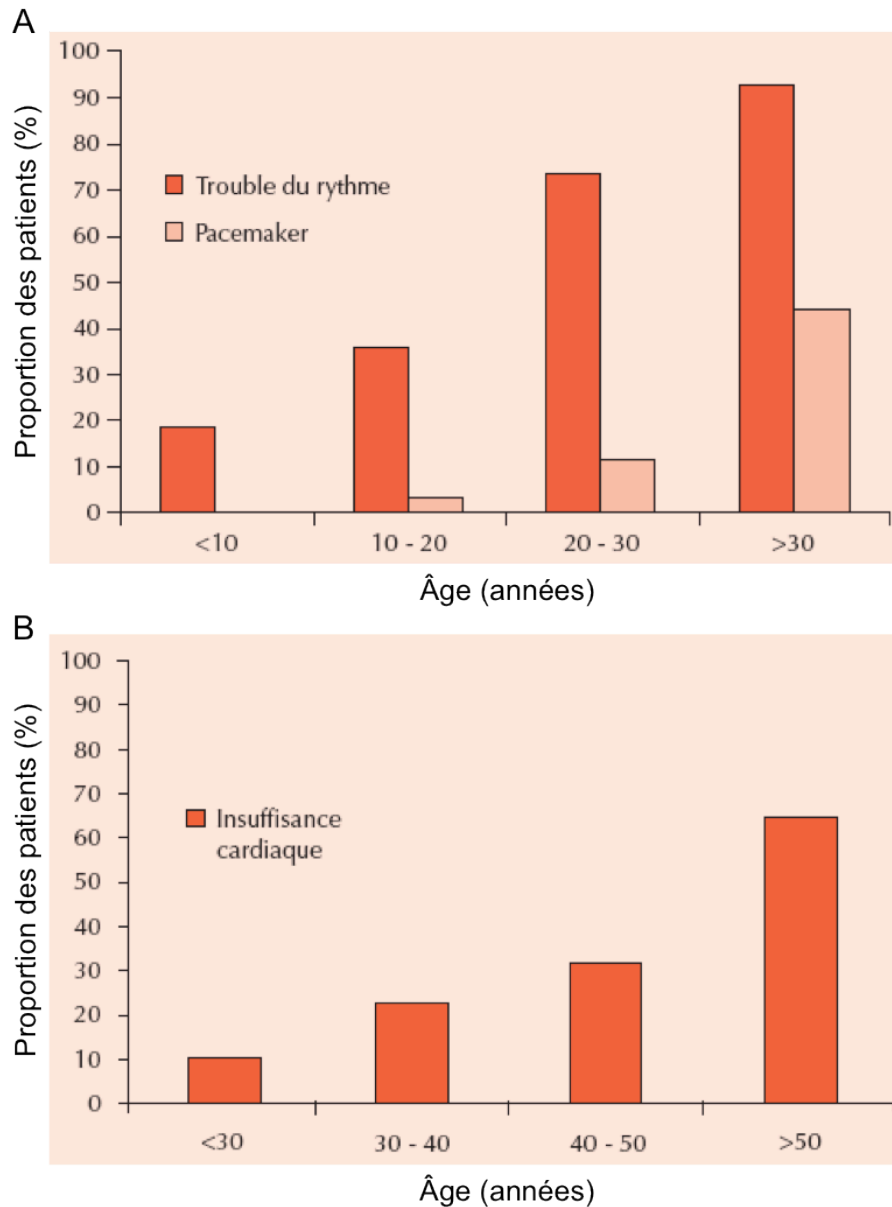


Figure 9. Chronologie d'apparition des symptômes cardiaques dans la cardiomyopathie.

(A) Troubles rythmiques et conductifs, (B) Insuffisance cardiaque.
 (D'après Wahbi *et al.* 2007; adapté de van Berlo *et al.* 2005)

De façon générale, l'évolution de la cardiomyopathie est plus agressive et le pronostic vital des patients est moins bon que pour les autres formes de CMD d'origine génétique (Arbustini *et al.*, 2002 ; Taylor *et al.*, 2003) (Figure 10). L'âge moyen de décès est en effet de 46 ans. A l'âge de 45 ans, 55% des patients porteurs de mutations *LMNA* sont décédés ou ont subi une transplantation cardiaque contre 11% des patients souffrant de CMD sans mutation *LMNA* (Taylor *et al.*, 2003). Les troubles du rythme ventriculaire constituent la cause principale des décès. Les résultats de la méta-analyse réalisée par

van Berlo *et al.* en 2005 (van Berlo et al, 2005a) indiquent que parmi les patients décédés de mort subite (46% de la cohorte), 43% étaient porteurs de pacemaker. De plus, un événement de mort subite est parfois le premier signe clinique de cardiomyopathie. Une étude récente (van Rijsingen et al, 2012), évaluant les facteurs de risques pour des arythmies ventriculaires malignes chez les patients porteurs de mutation *LMNA*, a montré que le délai moyen entre le premier événement d'arythmies ventriculaires malignes et l'établissement d'une insuffisance cardiaque terminale n'est que de 16 mois dans la cohorte étudiée. Ceci souligne une fois encore le caractère agressif de l'atteinte.

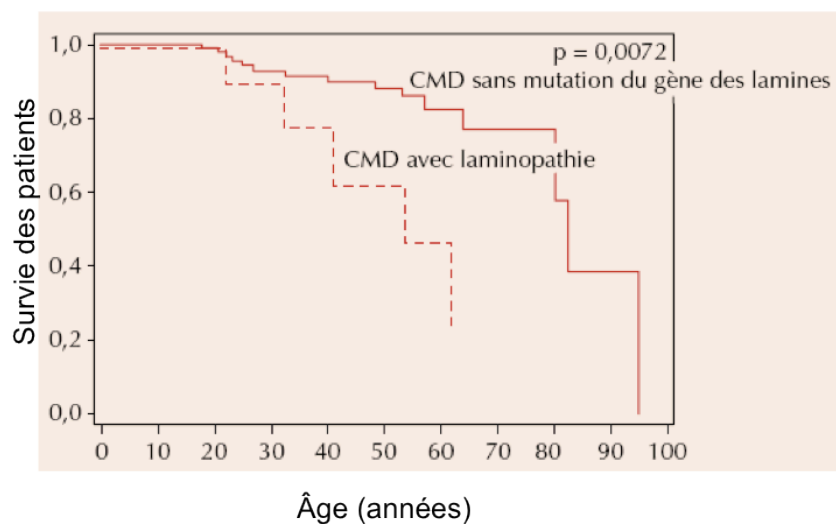


Figure 10. Courbe de survie des patients souffrant de CMD causée par une mutation du gène *LMNA* ou d'autres CMD.

La survie des patients souffrants de cardiomyopathie dilatée est diminuée lorsqu'ils sont porteurs de mutation du gène *LMNA*.

(D'après Wahbi *et al.* 2007; adapté de Taylor *et al.* 2003)

4-2 Autres atteintes cardiaques liées à des mutations du gène *LMNA*

D'autres atteintes plus « atypiques » du muscle cardiaque liées à des mutations du gène *LMNA* ont été décrites. On recense notamment des CMD avec des caractéristiques de non compaction du ventricule gauche (Hermida-Prieto et al, 2004), avec anévrisme apical du ventriculaire gauche (Forissier et al, 2003), des cardiomyopathies arythmogènes du ventricule droit (Larsen et al, 2011; Quarta et al, 2011), des cardiomyopathies hypertrophiques (Mercuri et al, 2005). Ces observations restent cependant rares.

4-3 Physiopathologie des cardiolaminopathies

Malgré la progression des connaissances sur la physiopathologie des laminopathies, les mécanismes exacts conduisant à la cardiolaminopathie restent encore très peu connus. Les études de corrélation génotype-phénotype n'ont pas établi de relation claire et forte entre le type de mutation et l'apparition d'un phénotype, comme je l'ai indiqué dans la première partie de cette introduction. Pour les laminopathies du muscle strié en général, et les cardiolaminopathies en particulier, il apparaît que les mutations de type non-sens et tronquantes sont plus fréquemment retrouvées comparées aux autres laminopathies (voir plus haut). Parmi les individus souffrant de laminopathies, 24,2% développent une cardiolaminopathie isolée et 34,3% une cardiolaminopathie associée à une atteinte des muscles squelettiques. L'analyse de la base UMD-*LMNA* révèle que 33,7% des patients avec une cardiolaminopathie isolée sont porteurs de mutation de type non-sens ou tronquante, contre seulement 8,5% pour les patients du groupe « cardiolaminopathie associée à une atteinte des muscles squelettiques ». Ces proportions semblent indiquer que le muscle squelettique est moins « sensible » à l'haploinsuffisance des lamines A/C que le cœur. De plus, l'analyse de la répartition des mutations faux-sens indique que le *coil1B* est plus affecté dans les cardiolaminopathies (Figure 11), suggérant qu'une modification d'interaction avec des partenaires protéiques spécifiques de ce domaine et à expression cardiaque pourrait jouer un rôle dans la physiopathologie des cardiomyopathies liées au gène *LMNA*.

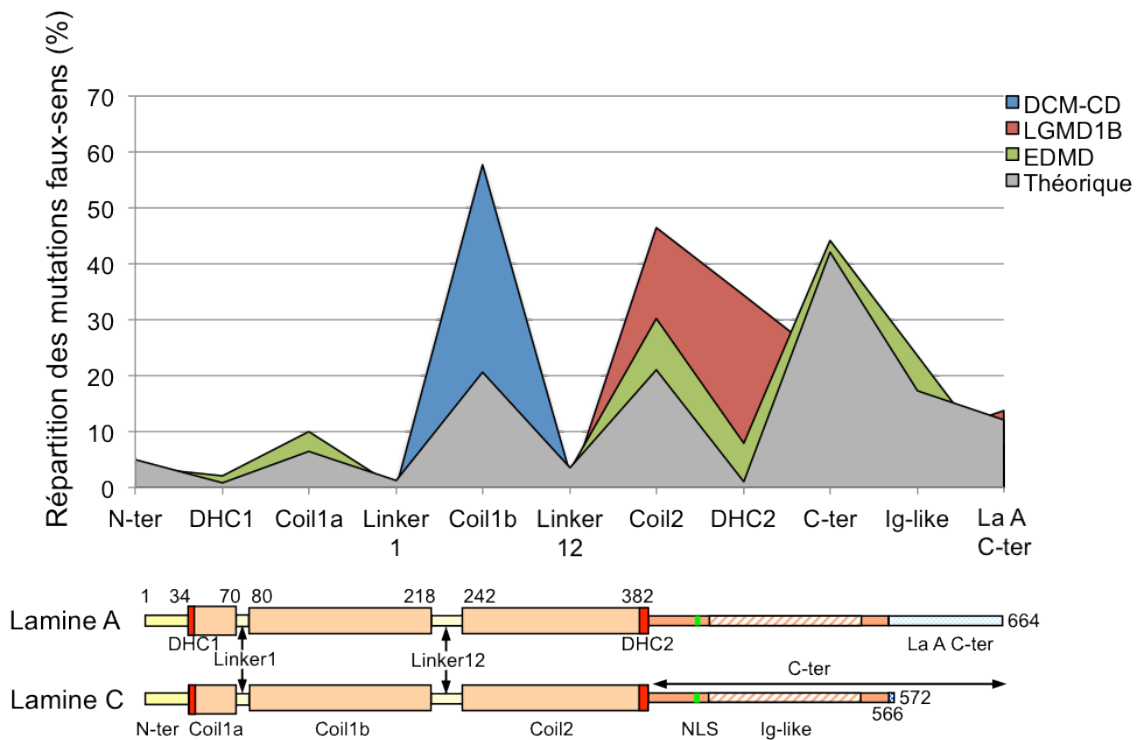


Figure 11. Répartition des mutations faux-sens par domaine protéique en fonction des phénotypes cliniques musculaires.

En gris est représentée la distribution théorique des mutations en fonction de la taille des différents domaines protéiques. DHC = domaine hautement conservé, NLS = séquence de localisation nucléaire. (adapté de L. Gueneau)

Dans la recherche de mécanismes physiopathologiques, l'étude de modèles animaux apporte de nombreuses pistes de recherche. Plusieurs modèles murins reproduisant des mutations associées à des LMS ont été générés (tableau 3). Les deux plus étudiés sont la souris *Lmna*^{H222P/H222P} et les souris *Lmna*^{-/-} et *Lmna*^{+/-}. Les souris n'exprimant ni lamine A ni lamine C, *Lmna*^{-/-}, développent des défauts de croissance importants et une dystrophie musculaire associée à une cardiomyopathie dilatée et une diminution très importante du tissu adipeux notamment (De Sandre-Giovannoli et al, 2002 ; Nikolova et al, 2004; Sullivan et al, 1999). Elles ne survivent pas au delà de 8 semaines. Dans ce modèle d'inactivation du gène *Lmna*, les souris hétérozygotes *Lmna*^{+/-} n'expriment que 50% du niveau normal des lamines A/C et développent à l'âge adulte une pathologie cardiaque modérée sans autre atteinte associée. Seules 20% d'entre elles décèdent à partir de l'âge de 8 mois (35 semaines) (Chandar et al, 2010 ; Wolf et al, 2008).

Tableau 3. Modèles murins reproduisant des mutations associées à des laminopathies du muscle strié.

Mutation	Domaine protéique	Phénotype	Létalité (semaines)	Références
<i>Lmna</i> ^{-/-}	-	- dystrophie musculaire - cardiomyopathie dilatée avec troubles du rythme et de conduction - défauts du tissu adipeux - défauts osseux - neuropathie	4-8	(Cutler et al, 2002 ; De Sandre-Giovannoli et al, 2002; Li et al, 2011b ; Nikolova et al, 2004 ; Sullivan et al, 1999)
<i>Lmna</i> ^{+/-}	-	Cardiomyopathie dilatée avec troubles du rythme et de la conduction	40- ?	(Chandar et al, 2010; Wolf et al, 2008)
<i>Lmna</i> ^{H222P/H222P}	Linker 12	- dystrophie musculaire - cardiomyopathie dilatée avec troubles du rythme et de conduction	18-36 (M) 31-58 (F)	(Arimura et al, 2005)
<i>Lmna</i> ^{N195K/N195K}	Coil1b	- dystrophie musculaire - cardiomyopathie dilatée avec troubles du rythme et de conduction	12-14	(Mounkes et al, 2005)
<i>Lmna</i> ^{TgM371K}	Coil2	Cardiomyopathie	2-7	(Wang et al, 2006)
<i>Lmna</i> ^{nPLA0}	Queue	Cardiomyopathie dilatée	20-40 (M) 30-80 (F)	(Davies et al, 2010)

Lmna^{TgM371K} : surexpression cardiaque de lamines mutées. *Lmna*^{nPLA0} : expression de prélamine A non farnésylée uniquement. ? : 80% des animaux sont toujours en vie à l'âge de 100 semaines (fin du suivi). M : mâles, F : femelles.

Les modèles *Lmna*^{H222P/H222P} et *Lmna*^{+/-} reproduisent assez fidèlement la CMD observée chez les patients porteurs de mutations *LMNA* : ils développent tous deux des troubles du rythme et de la conduction, suivis de l'apparition d'une CMD (Arimura et al, 2005; Chandar et al, 2010 ; Wolf et al, 2008). L'atteinte cardiaque est cependant plus sévère et plus précoce chez les animaux *Lmna*^{H222P/H222P} qui décèdent entre 4 et 6 mois pour les mâles et entre 7 et 9 mois pour les femelles, et elle est associée à une dystrophie musculaire (Arimura et al, 2005). L'activation de la voie TGFβ/Smad, avec une accumulation de Smad2/3 phosphorylés dans les noyaux, a été suspectée de participer à la fibrose importante observée dans le cœur des souris *Lmna*^{H222P/H222P} (Arimura et al, 2005).

De façon intéressante, Wolf *et al.*, ont montré que l'apoptose spécifique et précoce des cellules du tissu de conduction cardiaque est l'événement premier en cause dans l'apparition des troubles rythmiques et conductifs chez les animaux *Lmna*^{+/-} (Wolf et al,

2008). En parallèle, des défauts de mécanotransduction ont aussi été mis en évidence *in vivo* chez les souris *Lmna*^{-/-} et *Lmna*^{+/-}, corroborant ce qui était connu sur les cellules *Lmna*^{-/-} (voir plus haut). Dans le cœur des souris *Lmna*^{-/-} un défaut de transmission de la force résultant d'une distorsion du réseau de desmine a été observé (Nikolova et al, 2004). Cette altération de la transmission de force est visible chez les souris *Lmna*^{+/-}, qui ne développent qu'une réponse hypertrophique limitée en réponse à une constriction de l'aorte thoracique (Cupesi et al, 2010).

4-4 Prise en charge thérapeutique des patients

Malgré les avancées que j'ai présentées ci-dessus, les mécanismes spécifiques conduisant à l'atteinte cardiaque n'étant pas encore élucidés, le traitement de la cardiomyopathie est celui des pathologies de la conduction ou du rythme et de l'insuffisance cardiaque.

Les troubles supraventriculaires peuvent nécessiter la mise en place d'un pacemaker. Cependant, ce dispositif est parfois insuffisant et ne prévient pas les événements rythmiques graves, source de mort subite. Plusieurs études indépendantes (Meune et al, 2006 ; Pasotti et al, 2008 ; van Rijsingen et al, 2012) évaluant la survenue d'événements cardiaques majeurs, et en particulier de mort subite, ont souligné l'importance du suivi cardiologique des sujets encore asymptomatiques porteurs de mutation *LMNA*. En particulier, la pose prophylactique de défibrillateur cardiaque implantable a démontré des effets bénéfiques majeurs et a permis de sauver des vies chez ces patients (Meune et al, 2006 ; van Rijsingen et al, 2012).

Le traitement pharmacologique de la dysfonction ventriculaire gauche repose sur l'utilisation des inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine, ou les antagonistes de l'angiotensine 2, en association aux bêtabloquants. Certains anti-arythmiques comme l'amiodarone sont utilisés. D'autre part, le risque thromboembolique étant élevé chez ces patients (Boriani et al, 2003 ; Redondo-Verge et al, 2011), l'utilisation d'anti-vitamines K peut être recommandée.

Enfin, lorsque la CMD évolue en insuffisance cardiaque terminale malgré les traitements pharmacologiques, la transplantation cardiaque peut être envisagée chez les sujets de moins de 60 ans. Cependant, la coexistence de pathologies respiratoires et musculaires sévères chez certains patients est une contre-indication à la transplantation cardiaque.

4-5 Nouvelles voies thérapeutiques ?

Bien que la physiopathologie de la cardiomyopathie reste très peu connue, l'étude des modèles animaux présentant le même type d'atteinte a permis de découvrir de nouveaux mécanismes et de tester de nouvelles approches thérapeutiques. Dans ce domaine, l'étude du modèle murin *Lmna*^{H222P/H222P} a ouvert de nouvelles perspectives pour la compréhension et le traitement de cette pathologie.

4-5-1 Améliorer les défauts contractiles ? Traitement au SCH0013

Dans le but de palier à la dysfonction contractile cardiaque apparaissant progressivement chez ces animaux, Arimura *et al.*, ont utilisé un agent augmentant la sensibilité calcique du myocarde, le SCH0013 (Arimura *et al.*, 2010). Bien que non spécifique, cette approche était prometteuse pour améliorer la contractilité cardiaque sans augmentation des concentrations calciques et d'AMPc intracellulaires, source d'effets cardiotoxiques et arythmogènes. L'effet de l'administration orale de SCH0013 s'est révélé bénéfique. Il a permis de retarder l'apparition de la dysfonction contractile, de limiter le remodelage et la fibrose cardiaque et de prolonger la survie chez les souris femelles. Son effet a été cependant plus mitigé chez les souris mâles avec un meilleur temps de survie médian mais sans amélioration du taux de survie globale.

4-5-2 Contrecarrer les mécanismes primaires ? Les voies MAPK

En parallèle de cette étude, l'équipe de Worman et Muchir a mis en évidence l'implication des voies MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinases) dans l'atteinte cardiaque de ces mêmes souris *Lmna*^{H222P/H222P} (Muchir *et al.*, 2007b).

4-5-2-1 Mitogen-Activated Protein Kinases

Très conservées de la levure à l'homme (Widmann *et al.*, 1999), elles se subdivisent en 4 grandes familles : extracellular signal-regulated kinases (ERK1/2), c-Jun NH2-terminal kinases (JNK1, -2 and -3), p38 kinase (α , β , γ , δ), et big MAPK (BMK or ERK5) (Johnson & Lapadat, 2002 ; Pearson *et al.*, 2001 ; Qi & Elion, 2005).

L'activation des MAPK nécessite la double phosphorylation d'un motif Thr-X-Tyr (où X est soit une Gly, Pro, ou Glu) dans la boucle de régulation de ces protéines (Canagarajah *et al.*, 1997 ; Raingeaud *et al.*, 1995). L'événement typique qui mène à cette

phosphorylation est une cascade à trois niveaux de kinases dans laquelle une MAPK kinase kinase (MAPKKK, MAP3K, MEKK, ou MKKK) active une MAPK kinase (MAPKK, MAP2K, MEK ou MKK), qui à son tour active la MAPK par une série de phosphorylations (Figure 12). Cette cascade d'activation canonique permet l'amplification du signal, sa modulation, et la spécificité de réponse à différents stimuli (Ferrell, 1996). Une fois activées, les MAPK phosphorylent la sérine ou thréonine d'un motif spécifique Pro-X-Thr/Ser-Pro sur leurs protéines cibles (Songyang et al, 1996). La durée et le niveau de la signalisation des MAPK sont régulés par des phosphatases à spécificité Tyr ou Ser/Thr, ou des phosphatases à double spécificité (Martin et al, 2005 ; Owens & Keyse, 2007). Parmi ces phosphatases on peut citer la protéine phosphatase 2A (PP2A) (Junttila et al, 2008).

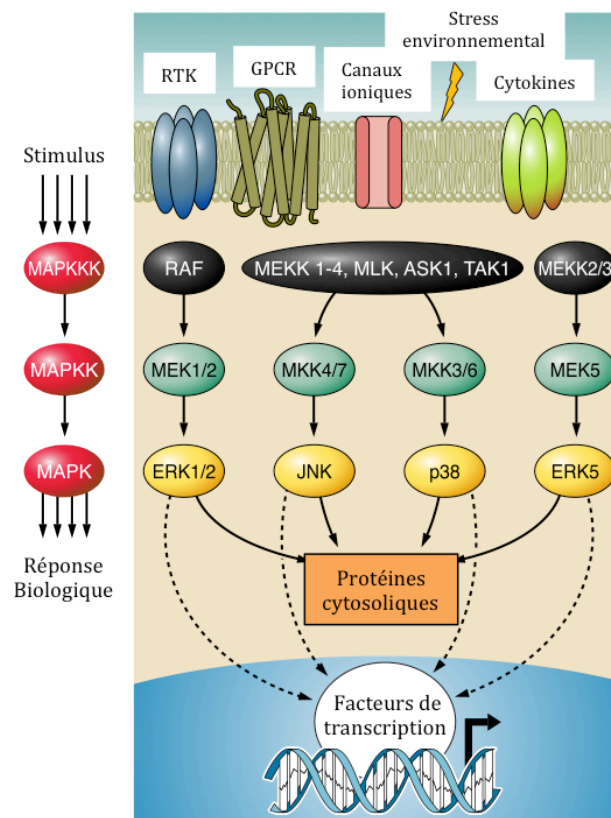


Figure 12. Cascade d'activation des différentes voies MAP kinases

Les MAPK sont typiquement activées par une cascade canonique de phosphorylations séquentielles à trois niveaux : les MAPK kinases kinases (MAPKKK) activent les MAPK kinases (MAPKK), qui à leur tour activent les MAPK ERK1/2, JNK, p38 et ERK5. Les MAPK activées exercent leurs effets, par phosphorylation ou non, sur des protéines cytosoliques ou nucléaires. Seules sont représentées les plus connues des MAPKKK et MAPKK pour chaque MAPK. En outre, plusieurs étapes peuvent exister entre le stimulus cellulaire et l'activation de la MAPKKK et entre l'activation de la MAPK et la réponse biologique. RTK = Récepteurs à activité Tyrosine kinase; GPCR = Récepteurs couplés aux protéines G. (D'après Rose *et al.* 2010)

Les MAPK sont impliquées dans un très grand nombre de processus biologiques en réponse à des signaux externes (facteurs de croissance, cytokines, canaux ioniques, stress environnemental...) et internes (remodelage du cytosquelette, kinases...). Cette grande variété de fonction tient au très large spectre de substrats de ces kinases, tels que de nombreux facteurs de transcription (c-fos, Elk1, Elk4, c-jun, JunD, p53, pRb, NFATc3 et 4, Smad2/3 et 4...), des protéines kinases et phosphatases (FAK1, GRK2, PTP2c, Calcineurine, Akt...), des composants du cytosquelette (paxilline, microtubule-associated proteins, Tau, kinésine, connexine 43, lamine B2...), des facteurs régulant l'apoptose (Bcl2, Bax, Bad...) et d'autres molécules impliquées dans des processus de signalisation cellulaire multiples (EGFR, PLC β et γ , PDE4...) (Bogoyevitch & Kobe, 2006 ; Yoon & Seger, 2006).

L'abondante littérature décrivant la régulation et les nombreux rôles des MAPK dans la physiologie cellulaire de différents types cellulaires ou systèmes reflète la grande complexité de ces voies de signalisation. Après avoir introduit rapidement leurs rôles dans la physiologie et les pathologies cardiaques, je me concentrerai ici sur leur implication dans la CMD liée au gène *LMNA*.

4-5-2-2 MAPK, fonction et dysfonction cardiaque

Le rôle de la voie Ras-Raf-MEK-ERK1/2 dans la physiologie et pathologie cardiaques a été largement étudié grâce à l'utilisation de modèles animaux et cellulaires surexprimant ou déficients pour un des acteurs de cette voie (expression de formes constitutivement actives de MEK1, Ras, ou dominant négatif de Raf-1, ERK1^{-/-}, ERK2^{+/-} chez la souris) (Bueno et al, 2000 ; Harris et al, 2004; Hunter et al, 1995 ; Purcell et al, 2007 ; Ueyama et al, 2000 ; Yamaguchi et al, 2004 ; Zheng et al, 2004). L'ensemble de ces travaux a montré que cette signalisation pouvait généralement être considérée comme pro-hypertrophique et favorisant la survie cellulaire dans un contexte ischémique. En revanche, elle a été montrée comme pouvant induire des arythmies et des défauts de la régulation calcique intracellulaire par modulation de l'expression et de la fonction de canaux (canal Ca²⁺ de type L, canaux potassiques), d'échangeurs (échangeur Na⁺/H⁺) et de pompes ioniques (SERCA) (Fliegel, 2009 ; Ho et al, 2001 ; Teos et al, 2008 ; Zheng et al, 2004). Elle pourrait ainsi contribuer aux défauts contractiles et à l'augmentation de la prévalence des événements d'arrêt cardiaque brutaux dans la cardiomyopathie hypertrophique.

En résumé, l'activation de ERK joue un rôle important dans l'hypertrophie cardiaque et la cardioprotection. Cependant, le résultat fonctionnel de cette activation peut être modulé ou modifié de façon spécifique dans le temps et l'espace grâce à l'interaction de ERK avec différentes plateformes protéiques (Jacobs et al, 1999 ; Raman et al, 2007 ; Remenyi et al, 2005). Ces processus complexes d'interaction/régulation spécifiques conduisent donc à différents phénotypes allant de l'hypertrophie dite physiologique à des formes pathologiques d'hypertrophie avec remodelage.

A l'opposé, les voies JNK et p38 ont montré des effets plus contradictoires sur la physiologie cardiaque. Selon les études et les contextes, elles apparaissent pro- ou anti-hypertrophiques, pro- ou anti-survie, indiquant à quel point leur régulation et les stimuli à l'origine de leur activation déterminent la réponse cellulaire en aval (Rose et al, 2010).

4-5-2-3 MAPK et cardiomyopathie

Comme je l'ai indiqué plus haut, afin d'identifier des mécanismes physiopathologiques impliqués dans le développement de la CMD, une étude d'expression génique globale a été réalisée dans le cœur des souris *Lmna*^{H222P/H222P} âgées de 10 semaines (Muchir et al, 2007b), à un stade très précoce de la dysfonction cardiaque. Cette étude a révélé une activation des voies ERK1/2 et JNK. Cette activation a été montrée comme directement due à l'expression des lamines A/C mutées par transfert de gènes dans des systèmes cellulaires simples tels que les cellules Cos7 et C2C12.

Afin d'évaluer si l'activation des voies ERK1/2 et JNK constituait un mécanisme compensatoire bénéfique ou dommageable pour le cœur des souris *Lmna*^{H222P/H222P}, l'équipe de Worman et Muchir a réalisé des traitements inhibiteurs de ces deux voies à différents stades de la cardiomyopathie (Muchir et al, 2012 ; Muchir et al, 2009a ; Wu et al, 2010). Leurs travaux montrent que, quel que soit le stade de la dysfonction (précoce à 8 semaines ou avancé à 16 et 19 semaines), le traitement avec des inhibiteurs de MEK1/2 (PD98059 et Solumetinib, inhibant l'activation finale de ERK1/2) ou de JNK (SP600125, inhibant les 3 isoformes JNK1, 2 et 3) a des effets bénéfiques sur la fonction cardiaque avec un maintien de la fraction de raccourcissement (FS), une diminution de la fibrose myocardique associée à une diminution du remodelage matriciel, ainsi qu'une normalisation de l'expression des facteurs natriurétiques. En particulier, le traitement permanent au Solumetinib commencé à un stade où la fonction cardiaque est déjà bien

altérée (FS diminuée de 25 à 30% comparée aux Wt) a permis de prolonger modérément (3 semaines) mais significativement la survie des animaux traités (Muchir et al, 2012).

L'ensemble de ces études indique que l'activation des voies ERK1/2 et JNK joue un rôle délétère majeur dans la progression de la cardiomyopathie chez les souris *Lmna*^{H222P/H222P}.

De façon plus générale, il semble que l'activation des voies MAP kinases constitue un mécanisme commun à différents défauts des lamines A/C. En effet, il a été montré que l'expression de gènes connus comme cibles des MAP kinases (c-jun et Elk1 notamment) était stimulée, en réponse à l'expression de différentes lamines A mutées dans des cellules Cos7. Muchir *et al.* ont en effet montré que les mutations N195K, R298C et N456I conduisaient à l'activation transcriptionnelle de ces gènes cibles (Muchir et al, 2007b). De la même manière, la diminution d'expression des lamines A/C et de l'émerine par ARN interférence (Muchir et al, 2009b) (ou modèle d'inactivation du gène *Emd* chez la souris (Muchir et al, 2007a)) active ces voies MAPK. Enfin, de manière particulièrement intéressante, la voie ERK1/2 est aussi activée dans le cœur de patients souffrant de CMD liée au gène *LMNA* (Muchir et al, 2012). Il apparaît donc que la modulation des voies MAPK chez les patients pourrait avoir un impact bénéfique sur la progression de la CMD et constituer une future voie thérapeutique à explorer.

4-5-3 Réparer le cœur ? La thérapie cellulaire

Le groupe de Jean-Thomas Vilquin et Cyril Catelain a évalué le bénéfice de la thérapie cellulaire cardiaque pour contrecarrer les effets délétères de la mutation p.H222P sur le modèle murin *Lmna*^{H222P/H222P}. Ce type d'approche a été très utilisé dans les cardiomyopathies ischémiques mais très peu dans des modèles de CMD génétiques.

Des myoblastes murins ou des cellules souches embryonnaires (ES) murines prétraitées au BMP-2 afin d'induire la différenciation cardiomyocytaire, ont été injectés dans le cœur des souris *Lmna*^{H222P/H222P} immunosupprimées. L'évaluation de la fonction cardiaque avant et à 8 semaines après la transplantation a montré une stabilisation de la fonction chez les souris ayant reçues les myoblastes (fraction de raccourcissement : -12±10%), alors que les souris transplantées avec les cellules ES n'ont pas montré d'évolution différente des souris contrôles injectées avec du milieu (fraction de raccourcissement : -32±8% et -41±8%, respectivement). De plus, dans les cœurs

explantés, des myoblastes greffés et différenciés ont pu être mis en évidence, alors qu'aucune cellule ES n'a été retrouvée (Catelain *et al.*, soumis). Ces résultats suggèrent que la thérapie cellulaire pourrait aussi représenter un moyen thérapeutique à explorer pour les cardiopathies.

V- Système ubiquitine-protéasome

Les cellules ont trois grands systèmes de contrôle qualité des protéines qui agissent en collaboration ou séparément afin d'assurer l'homéostasie des protéines et d'éviter la production de protéines aberrantes, limitant ainsi les dommages cellulaires. (i) Le premier échelon de ce contrôle est le système des chaperonnes moléculaires qui sont impliquées dans le repliement des protéines et la stabilisation de leur conformation. (ii) L'autophagie est un processus peu sélectif de dégradation de protéines et plus spécifiquement d'organelles endommagées ou à recycler, via les lysosomes. (iii) Le système ubiquitine-protéasome (UPS) est un acteur majeur et très sélectif de la dégradation de protéines intracellulaires, cytoplasmiques et nucléaires. L'UPS est responsable de la dégradation de plus de 70% des protéines intracellulaires (Rock et al, 1994) et est impliqué dans une variété de mécanismes cellulaires de base tels que la prolifération cellulaire, l'adaptation au stress et la mort cellulaire, sa principale fonction étant d'empêcher l'accumulation de protéines endommagées, mal conformées ou mutées (Glickman & Ciechanover, 2002).

1-Structure et fonction

L'UPS est un système protéolytique ATP-dépendant qui nécessite d'abord la polyubiquitination des protéines cibles avant leur dégradation par le protéasome 26S.

1-1 Polyubiquitination des substrats

La polyubiquitination consiste à lier de façon covalente la partie carboxy-terminale de l'ubiquitine (petite protéine ubiquitaire et conservée de 76 acides aminés) à un résidu lysine du substrat. L'ubiquitine possède 7 lysines (K6, K11, K27, K29, K33, K48, K63) qui, chacune, permettent son autopolymérisation. Les différentes chaînes formées à partir de ces différentes lysines de « branchement » ont été impliquées dans des processus divers, non nécessairement liés à la destruction protéique tels que les processus de réparation de l'ADN, de régulation de l'activité de facteurs de transcription, d'adressage des protéines ou d'endocytose, entre autres (Welchman et al, 2005). Les plus représentées dans la cellule sont, de loin, les chaînes K48 qui servent de signaux

d'adressage au protéasome.

La réaction de polyubiquitination implique l'action concertée d'enzymes spécifiques (Figure 13) :

- une enzyme d'activation de l'ubiquitine (E1) qui active l'ubiquitine en présence d'ATP en formant une liaison thiolester entre un résidu cystéine de son site catalytique et l'ubiquitine, puis transfère l'ubiquitine activée sur l'une des E2s.
- une enzyme de conjugaison de l'ubiquitine (E2) qui est capable d'attacher l'ubiquitine à la protéine cible en général avec l'aide d'une E3.
- une ubiquitine ligase (E3) qui joue un rôle dans la reconnaissance entre l'ubiquitine et les différentes protéines cibles.
- et dans certains cas, une enzyme d'élongation de la chaîne d'ubiquitine (E4).

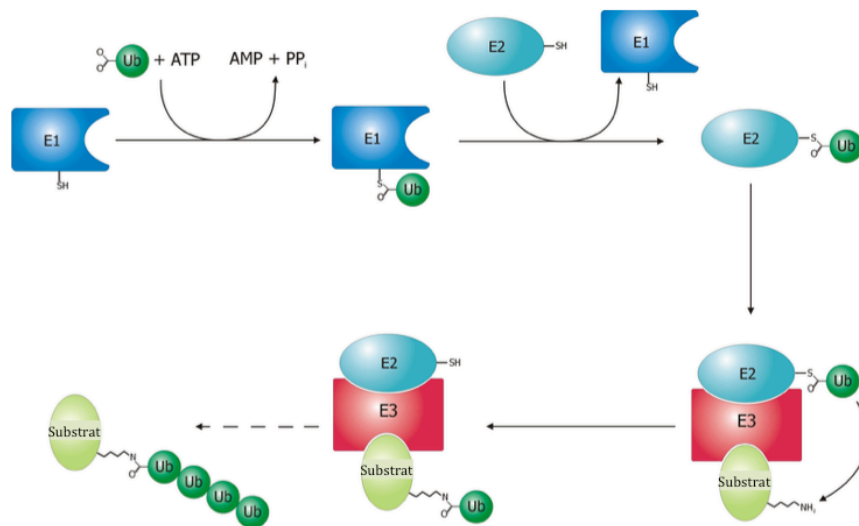


Figure 13. Réaction de polyubiquitination

Une enzyme d'activation de l'ubiquitine (E1) active l'ubiquitine (Ub) en présence d'ATP en formant une liaison thiolester entre un résidu cystéine (-SH) de son site catalytique et l'ubiquitine, puis transfère l'ubiquitine activée sur une enzyme de conjugaison E2. L'ubiquitine est ensuite transférée sur la protéine cible (substrat) en général avec l'aide d'une E3, une ubiquitine ligase qui joue un rôle dans la reconnaissance entre l'ubiquitine et les différentes protéines cibles. Plusieurs molécules d'ubiquitine sont ensuite ajoutées les unes aux autres pour former une chaîne de polyubiquitines.

Bien qu'il n'y ait qu'une seule enzyme E1, environ 50 enzymes E2 et plus de 100 enzymes E3 ont été décrites. C'est cette dernière qui confère la spécificité du processus de dégradation, en reconnaissant de manière spécifique les substrats à dégrader.

L'ubiquitination est régulée par la signalisation intracellulaire via des modifications

post-traductionnelles des substrats (phosphorylations, hydroxylations...) ou à travers de la modulation de l'activité des enzymes E3.

Dix enzymes E3 spécifiques du muscle ont été décrites et sont responsables de l'ubiquitination de facteurs de différenciation musculaire (MyoD, GATA4...), de protéines sarcomériques (cTnI, actine, β -MHC, cMyBP-C...), de canaux ioniques (Nav1.5, KCNQ1...) ou de molécules de signalisation diverses (FHL2, PKC ϵ , Calcineurine, p53...) (Tableau 4) (Bello et al, 2009 ; Mearini et al, 2008 ; Schlossarek & Carrier, 2011).

Tableau 4. Ubiquitine ligases E3 spécifiques du muscle et leurs cibles.
(Adapté de Schlossarek *et al.* 2011).

Ubiquitine ligase E3	Cible	
Atrogin-1	CnA MyoD FoxO1, FoxO3 cMyBP-C	Calcineurine Facteur de différenciation myogénique Forkhead box O Protéine interagissant avec la myosine cardiaque
MuRF1	cTnI PKC ϵ M-CK β -MHC	Troponine I cardiaque Protéine kinase C Créatine kinase musculaire Chaîne lourde de myosine, isoforme β
MuRF3	FHL2 γ -filamine β -MHC	Four and a half LIM 2 Chaîne lourde de myosine, isoforme β
CHIP	Hsp70 GATA4	Protéine de stress thermique
Mdm2	p53 β -arrestine 2 Tcap	Téléthonine
Ozz	β -caténine	
Nedd4-like	Nav1.5 KCNQ1	Canal sodique voltage dépendant Canal potassique voltage dépendant
Trim32	Actine	
ASB2 β	Filamine B	
MYFbx	α -actinine Filamine C	

Enfin, il est à noter qu'une fraction non négligeable de protéines ne nécessite pas d'être ubiquitinées pour être dégradées (Orlowski & Wilk, 2003; Verma & Deshaies, 2000). Ainsi pour des substrats tels que I κ B (Krappmann et al, 1996), p53 (Asher et al, 2002) ou pRb (Kalejta & Shenk, 2003), par exemple, des voies de dégradation dépendante et indépendante de l'ubiquitination ont été décrites, en fonction des signaux inducteurs.

1-2 Structure du protéasome

Le protéasome 26S est un grand complexe protéolytique consistant en une particule dite « core » 20S et une ou deux particules de régulation appelées 19S (Figure 14).

La particule régulatrice 19S est constituée d'un complexe formant la « base » qui se compose de six sous-unités ATPases (Rpt1-6) et quatre sous-unités non-ATPase (Rpn1, 2, 10, 13), et d'un complexe formant le « couvercle » constitué d'au moins neuf sous-unités non-ATPase (Glickman et al, 1998). C'est ce complexe qui reconnaît la chaîne de polyubiquitine. Il participe au dépliement de la protéine ainsi qu'à sa translocation dans le cœur de la sous-unité 20S, et contient également une activité *ubiquitin c-terminus hydrolase* qui va enlever la chaîne d'ubiquitine de la protéine à dégrader (Lam et al, 2002 ; Liu et al, 2006a ; Sharon et al, 2006).

La particule catalytique 20S se compose de quatre anneaux, chacun contenant sept sous-unités. Chacun des deux anneaux extérieurs se compose de sept sous-unités α différentes, tandis que les deux anneaux intérieurs comportent chacun sept sous-unités β différentes (Baumeister et al, 1998). Les activités protéolytiques résident dans la particule 20S où les sous-unités β 1, β 2, et β 5 portent les activités catalytiques caspase-like, trypsine-like et chymotrypsine-like, respectivement. Dans les cellules hématopoïétiques, ces sous-unités catalytiques peuvent être substituées par des sous-unités β 1i (i pour immune), β 2i, et β 5i, qui sont induites en réponse à des signaux inflammatoires comme l'interféron γ (Rivett et al, 2001; Tanaka, 2009). Cet « immunoprotéasome » a une spécificité de substrats différente et est important pour la présentation des antigènes CMH de classe I (Van den Eynde & Morel, 2001). Il est aussi impliqué dans l'élimination des protéines endommagées par un stress oxydatif ou sénéscentes (Ferrington et al, 2005; Husom et al, 2004). Des proportions variables d'immunoprotéasomes sont présentes dans tous les types cellulaires (Noda et al, 2000).

Il existe enfin un complexe 11S heptamérique dit « activateur » (aussi appelé PA28) qui peut s'associer au 20S. Il stimule l'activité protéolytique du protéasome mais est incapable de reconnaître l'ubiquitine et ne possède pas d'activité ATPase. Il pourrait jouer un rôle dans la dégradation des peptides viraux. Tout comme les sous-unités β de

l'immunoprotéasome, son expression est induite par l'interféron γ (Wang & Maldonado, 2006).

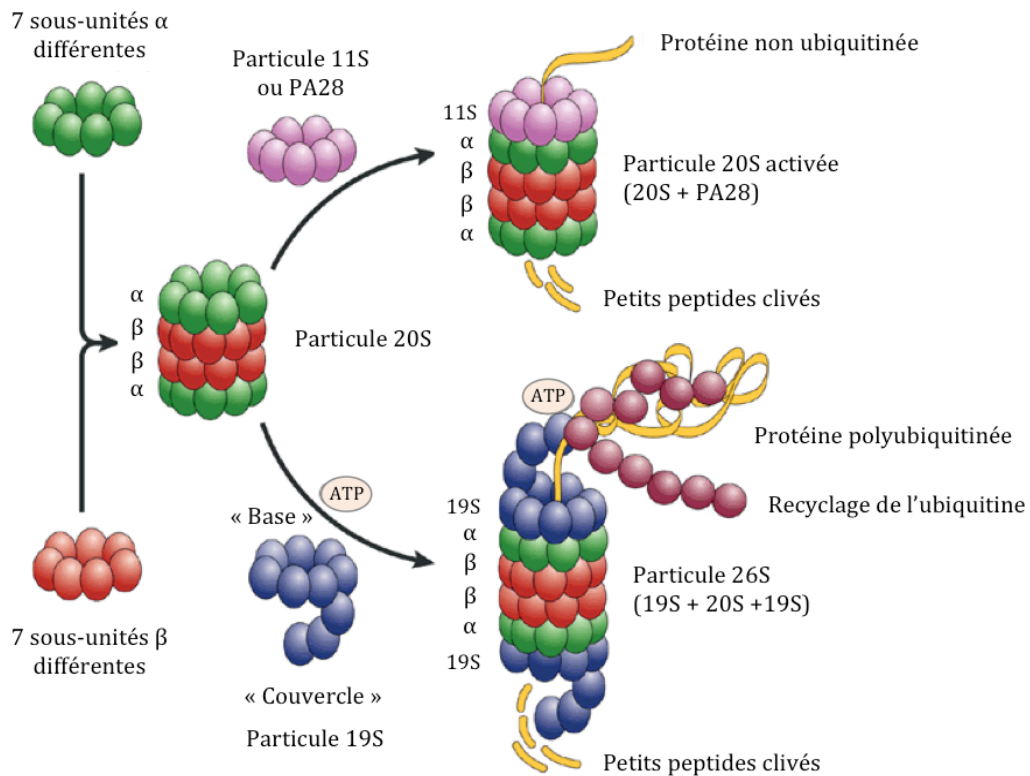


Figure 14. Structure des différents protéasomes.

Le protéasome 26S est une protéase multicatalytique se composant d'un noyau de 28 sous-unités catalytiques, la particule 20S du protéasome, qui est un assemblage de deux anneaux extérieurs et deux anneaux intérieurs heptamériques empilés pour former une structure cylindrique creuse. Chacun des deux anneaux intérieurs de la particule 20S se compose de sept sous-unités β différentes, trois d'entre-elles portant les activités catalytiques : chymotrypsine-like, trypsine-like et caspase-like. Les anneaux extérieurs comprennent sept sous-unités α différentes, dont aucune ne possède d'activité catalytique, mais qui servent de point d'ancrage à la particule régulatrice 19S, se liant à la particule 20S pour former un complexe appelé le protéasome 26S. La liaison du complexe 19S permet d'une part l'ouverture du canal de la particule 20S, qui est normalement fermée par les extrémités N-terminales des sous-unités α , et d'autre part, de dérouler les protéines polyubiquitinées pour permettre leur entrée dans le cœur catalytique du complexe 20S. Ces deux processus requièrent de l'ATP.

Alternativement, le complexe régulateur 11S ou PA28 peut également se lier à la particule 20S du protéasome et ouvrir le canal du complexe 20S, ainsi activé. Ce processus est indépendant de l'ATP mais ne sert de médiateur qu'à la dégradation de peptides courts non ubiquitinés. (D'après McNaught et al. 2001)

1-3 Régulation de la fonction du protéasome

Les modifications post-traductionnelles des composants du protéasome jouent un rôle régulateur majeur de modulation de son activité. Il a été rapporté des phosphorylations des sous-unités α ($\alpha 1$ à 7), $\beta 2$, $\beta 3$, $\beta 5$ et $\beta 6$, et Rpt6 dans les tissus de mammifères. Beaucoup de ces phosphorylations sont sous le contrôle de la protéine kinase A (PKA)

(Lu et al, 2008; Pereira & Wilk, 1990 ; Zhang et al, 2007a). Ces modifications modifient l'assemblage et/ou la fonction catalytiques des protéasomes 20S et 26S (Bose et al, 1999 ; Satoh et al, 1995; Satoh et al, 2001 ; Zong et al, 2006). D'autres modifications post-traductionnelles incluant des glycosylations, oxydations, nitrosylations ont été rapportées (Zong et al, 2008). L'effet de la plupart de ces modifications reste cependant inconnu.

2-Inhibition biochimique de l'UPS

Les activités protéolytiques de la sous-unité 20S peuvent être inhibées soit de façon réversible par des peptides aldéhydes (comme le MG132) et peptides boronates (comme le MG262 ou le bortézomib) ou de manière irréversible par les dérivés β -lactones (comme la lactacystine) et les époxyketones (comme l'époxomicine). Ces différents composés ont de plus des cibles différentes. Les peptides aldéhydes inhibent les 3 sous-unités protéolytiques β 1, β 2, et β 5. Les peptides boronates inhibent seulement les sous-unités β 1 et β 5. Enfin, les dérivés β -lactones et les époxyketones n'inhibent eux que la sous-unité β 5 (Hedhli & Depre, 2010).

3-Méthodes d'étude de la fonction de l'UPS

La fonction de l'UPS peut être évaluée au niveau de l'ubiquitination des protéines, de la dégradation, ou des deux. En général, l'évaluation du niveau de protéines ubiquitinées et du niveau d'expression des enzymes d'ubiquitination, de désubiquitination et des sous-unités du protéasome est analysée. En complément, les mesures des activités protéolytiques réalisées *in vitro* en utilisant des substrats synthétiques fluorescents révèlent l'état fonctionnel de la sous-unité 20S du protéasome. Le désavantage de ces petits substrats fluorescents, est qu'ils peuvent facilement entrer dans la sous-unité 20S sans ubiquitination. Par conséquent, ils ne reflètent pas l'entrée très régulée et contrôlée des substrats dans la sous-unité 20S. Afin de mieux examiner la fonction globale de l'UPS, ainsi que sa localisation dans les cellules vivantes, des protéines du système UPS (ubiquitine ou sous-unités de l'UPS) marquées grâce à la fusion avec la protéine GFP (Green Fluorescent Protein) ont été générées (Salomons et al, 2010). Ces outils ont

révélé que l'UPS pouvait être localisé dans le noyau et au réticulum endoplasmique, ou qu'il pouvait être réparti de manière homogène dans le cytosol.

Dans le noyau, le protéasome a été associé au nucléole, à l'euchromatine, à l'hétérochromatine périphérique, à la membrane interne de l'enveloppe nucléaire ou à des sous-domaines nucléaires tels que les *PML bodies* (Savulescu et al, 2011). Il pourrait ainsi jouer un rôle dans la régulation de certaines fonctions du noyau comme par exemple l'inactivation ou la localisation de facteurs de transcription tels que le facteur de différenciation myogénique MyoD (Floyd et al, 2001) ou le suppresseur de tumeur p53 (Karni-Schmidt et al, 2008).

Un des moyens utilisés pour suivre la fonctionnalité de l'UPS est d'évaluer le turnover de l'un de ses substrats. Des modèles de souris transgéniques exprimant des protéines fluorescentes rapportrices ont été créés pour suivre la fonction de l'UPS *in vivo* (Kumarapeli et al, 2005), on peut citer comme exemple la souris Ub^{G76V}-GFP (Lindsten et al, 2003). Ces souris sont des outils importants pour décrypter le rôle de l'UPS chez l'animal entier dans diverses pathologies, y compris les maladies cardiaques.

4-UPS et cardiopathies

Un grand nombre d'études a révélé des altérations de l'UPS dans les pathologies cardiaques, à la fois en clinique et dans de nombreux modèles expérimentaux (Mearini et al, 2008). L'accumulation de protéines ubiquitinées est en effet une caractéristique commune des pathologies cardiaques, suggérant une insuffisance de l'UPS. En revanche, les activités du protéasome ne sont pas toujours diminuées dans ces atteintes. De même, l'expression des composants du système tels que les enzymes de conjugaison E2, des ubiquitine ligases E3, ou des sous-unités du protéasome peut être soit augmentée, soit diminuée dans les cœurs déficients. D'autre part, des études récentes suggèrent que les ubiquitine ligases E3 musculaires jouent un rôle clé dans la régulation à la fois de l'hypertrophie des cardiomyocytes *in vitro* et *in vivo*. Un résumé de la littérature est présenté dans le tableau 5.

Tableau 5. Altérations de l'UPS dans les pathologies cardiaques.
(D'après Mearini *et al.* 2008)

Pathologies cardiaques	Types d'altérations de l'UPS	Références
Insuffisance cardiaque	↑Protéines ubiquitinées	(Birks et al, 2008; Hein et al, 2003 ; Tsukamoto et al, 2006 ; Weekes et al, 2003)
	↑E2	(Kostin et al, 2003)
	↑E3	(Birks et al, 2008)
	↑Déubiquitinases	(Kostin et al, 2003)
Hypertrophie et insuffisance cardiaque induites par TAC	↑Protéines ubiquitinées	(Balasubramanian et al, 2006; Tsukamoto et al, 2006)
	↑E2	(Razeghi et al, 2006)
	↑E3	(Balasubramanian et al, 2006 ; Razeghi et al, 2006)
	↑Sous-unités de l'UPS	(Depre et al, 2006; Razeghi et al, 2006)
	↑/↓Activités protéolytiques	(Depre et al, 2006; Tsukamoto et al, 2006)
Ischémie myocardique expérimentale	↑Protéines ubiquitinées	(Powell et al, 2005)
	↓Activités protéolytiques	(Powell et al, 2005)
	Modifications des sous-unités 20S	(Powell et al, 2005)
Cardiomyopathie induite par doxorubicine	↑E3	(Yamamoto et al, 2008)
	↑Activités protéolytiques	(Kumarapeli et al, 2005)
Cardiomyopathie hypertrophique	↑Protéines ubiquitinées	(Sarikas et al, 2005 ; Schlossarek et al, 2012)
	↑Activités protéolytiques	(Schlossarek et al, 2012)
Cardiomyopathie à surcharge en desmine	↓Activités protéolytiques	(Chen et al, 2005 ; Liu et al, 2006b)
	↑Activités protéolytiques	(Chen et al, 2005 ; Liu et al, 2006b)
	↑Sous-unités 20S	(Chen et al, 2005 ; Liu et al, 2006b)
	↓Sous-unités 19S	(Chen et al, 2005 ; Liu et al, 2006b)

Dans les cardiomyopathies familiales, il a également été démontré que la dysfonction de l'UPS fait partie des mécanismes physiopathologiques reliant certaines mutations à l'apparition de l'atteinte cardiaque. C'est le cas par exemple de mutations de l' α B-cristalline (codée par le gène *CRYAB*) responsables de la cardiomyopathie familiale liée à une surcharge en desmine (Vicart et al, 1998) ou de mutations de la protéine C cardiaque (cMyBP-C, codée par le gène *MYPBC3*) conduisant à une cardiomyopathie hypertrophique (Bonne et al, 1995). Dans ces deux cardiomyopathies de nature différente, une dysfonction du protéasome a été rapportée à la fois chez les patients et chez la souris (Chen et al, 2005 ; Liu et al, 2006b ; Sanbe et al, 2004 ; Vignier et al, 2009; Wang et al, 2001). Les mécanismes exacts à l'origine de l'altération de la fonction de l'UPS dans ces contextes de cardiomyopathies restent peu connus. Les protéines formant des agrégats, comme c'est le cas de la desmine dans les desminopathies,

pourrait « choquer » les sous-unités du complexe 26S, induisant des dommages et une dysfonction. Alternativement, des altérations de type oxydatif ont été mises en évidence dans les pathologies ischémiques notamment.

Les effets délétères de l'altération de la fonction de l'UPS sur la physiologie cardiaque sont également mis en évidence par l'utilisation clinique d'un inhibiteur spécifique de ce système. Depuis 2003, le bortezomib (Velcade) est approuvé pour le traitement du myélome multiple et est efficacement utilisé comme thérapie anti-cancéreuse (Ludwig et al, 2005). Toutefois, il présente des effets secondaires cardiotoxiques dramatiques allant des arythmies à l'insuffisance cardiaque (Enrico et al, 2007 ; Hacıhanefioglu et al, 2008; Voortman & Giaccone, 2006).

D'un point de vue mécanistique, l'UPS est impliqué dans la régulation de voies de signalisation comme par exemple la voie NFκB (activé par la dégradation de son inhibiteur IκB) (Scheidereit, 2006) ou la voie calcineurine-NFAT (inhibée par dégradation de la calcineurine) (Li et al, 2004), connue comme induisant un phénotype inflammatoire et un remodelage cardiaque pathologique. En particulier, l'activation de la voie calcineurine-NFAT due à la dysfonction de l'UPS a été impliquée dans la cardiomyopathie dilatée liée à une surcharge en desmine (Tang et al, 2010). Il joue aussi un rôle dans l'apoptose en régulant les voies d'induction via les « récepteurs de mort » (*Death receptors ; inhibitor of apoptosis IAPs, NFκB...*), la voie apoptotique mitochondriale, des facteurs pro/anti-apoptotiques (*Bcl-2, apoptosis repressor with caspase recruitment domain ARC...*) (Sohns et al, 2010).

L'ensemble de ces études suggère qu'une thérapie visant à activer l'UPS pourrait avoir des effets bénéfiques dans le contexte des pathologies cardiaques. Ceci a été démontré par la surexpression de la sous-unité PA28α qui stimule l'activité du complexe 20S, comme je l'ai indiqué plus haut, dans des cardiomyocytes en culture. Ces cardiomyocytes sont en effet protégés contre le stress oxydatif et l'apoptose qui en découle (Li et al, 2011a).

A l'inverse, le traitement par des inhibiteurs du protéasome a démontré des effets bénéfiques sur l'hypertrophie, le remodelage et la dysfonction cardiaques dans différents contextes pathologiques. Le traitement avec une faible dose d'époxomicine prévient l'hypertrophie ventriculaire gauche en réponse à une constriction de l'aorte chez la souris (Depre et al, 2006) et un analogue de la lactacystine réduit l'hypertrophie induite par l'isoprénaline chez la souris (Stansfield et al, 2008). De la même manière, des

doses faibles et non toxiques de bortezomib réduisent l'hypertrophie cardiaque chez des rats hypertendus sensibles au sel (Meiners et al, 2008).

Il apparaît donc qu'un contrôle très fin de la fonction de l'UPS et de façon générale de l'homéostasie des protéines cardiaques est essentiel à la physiologie cardiaque.

OBJECTIFS DE LA THESE

Objectifs de la thèse

Comme je l'ai indiqué dans l'introduction de ce manuscrit, les mécanismes physiopathologiques à l'origine des laminopathies restent encore assez peu connus, malgré les avancées faites grâce à l'étude de modèles animaux.

Jusqu'à très récemment, tous les modèles murins reproduisant des mutations découvertes chez les patients ne concernaient que des résidus localisés dans le domaine central en hélice α ou dans la partie carboxy-terminale des lamines A/C. D'autre part, les mutations choisies pour la construction de ces modèles étaient responsables de cardiomyopathie ou d'EDMD (Arimura et al, 2005; Mounkes et al, 2003 ; Mounkes et al, 2005 ; Wang et al, 2006). Aucun modèle ne reproduisant une mutation associée à un phénotype de dystrophie musculaire sévère, ni aucune mutation touchant un résidu de la partie N-terminale des lamines A/C n'avait alors été généré. C'est donc pour ces deux raisons que notre équipe a choisi de créer, par recombinaison homologue, le modèle *Lmna* ^{Δ K32}. Cette mutation, une délétion de la lysine en position 32 des lamines A/C, localisée dans le domaine globulaire N-terminal, a été retrouvée chez 9 patients souffrant de L-CMD ou d'EDMD sévère (tableau 6).

Tableau 6. Phénotypes associés aux mutations de la lysine 32 des lamines A/C.

Type de mutation	Nombre de patients	Phénotype clinique	Transmission	Référence
p.Lys32del	5	EDMD sévère	<i>de novo</i> , isolé, familiale	(Muchir et al, 2004; Vytopil et al, 2002)
p.Lys32del	4	L-CMD	<i>de novo</i> , inconnue	(D'Amico et al, 2005 ; Menezes et al, 2012; Quijano-Roy et al, 2008)
p.Lys32del	1	Asymptomatique (père d'une patiente EDMD sévère)	familiale	(Vytopil et al, 2002)
p.Lys32Asn	1	EDMD	inconnue	P. Richard, G. Bonne, E. Bertini ; non publiée
p.Lys32Glu	1	L-CMD	<i>de novo</i>	(Monges et al, 2011)

A mon arrivée dans l'équipe, le modèle était en cours d'évaluation. Les souris homozygotes meurent à 15 jours et présentent un retard de maturation des muscles et du cœur. Nous avons depuis montré que le décès de ces animaux est dû à des défauts métaboliques sévères (Bertrand et al, 2012) (Manuscrit en annexe). Les défauts observés chez les souris *Lmna*^{ΔK32/ΔK32} reproduisent les symptômes observés chez les patients souffrant de L-CMD, tant en terme de sévérité que de tissus affectés.

De plus, contrairement à tous les modèles murins précédemment créés et reproduisant des mutations existant chez les patients (*Knock-in*), pour lesquels seules les souris homozygotes développent un phénotype, la souris *Lmna*^{ΔK32} est la première à développer un phénotype pathologique à l'état hétérozygote. C'est donc le premier modèle murin qui reproduit au plus près le défaut génétique des patients. Lors de mon arrivée au laboratoire, les souris hétérozygotes *Lmna*^{ΔK32/+} présentaient clairement une atteinte cardiaque conduisant au décès vers l'âge d'un an, sans atteinte musculaire manifeste.

Dans ce contexte, mon projet de thèse visait à analyser le phénotype musculaire et la physiopathologie de l'atteinte cardiaque de ces souris tant au niveau fonctionnel que moléculaire, dans le but d'identifier des stratégies thérapeutiques potentielles applicables à la pathologie humaine. Pour cela, j'ai dans un premier temps complété le phénotypage des souris hétérozygotes (Résultats, Partie I), puis exploré les hypothèses mécanistiques proposées pour les laminopathies (exposées en introduction).

L'hypothèse structurale/mécanique, proposant que la mutation induit une fragilité nucléaire et cellulaire, a été explorée par une étude des propriétés morphologiques, contractiles et adaptatives du cœur et des muscles *in vivo* en réponse à un stress mécanique induit par un protocole d'exercice chronique épuisant sur nos souris hétérozygotes (Résultats, Partie II).

L'hypothèse génique, propose que la mutation induit des modifications d'expression génique et/ou de signalisation. Ainsi, comme je l'ai indiqué dans l'introduction, l'étude de plusieurs modèles animaux reproduisant des mutations *Lmna* et *Emd* associées à l'EDMD (*Lmna*^{H222P} et *Emd*^{-/y}) a mis en évidence l'activation précoce des voies MAP Kinases ERK1/2 et JNK1. L'existence d'un mécanisme unificateur initiant le développement de la cardiomyopathie dilatée dans ces différents modèles d'EDMD a été

évaluée en étudiant l'activation de ces voies dans notre modèle *Lmna*^{ΔK32}. D'autre part, la modulation d'autres voies impliquées dans le développement de la cardiomyopathie a été recherchée par une étude de l'expression génique globale dans le cœur d'animaux avant l'apparition des signes de dysfonction cardiaque (Résultats, Partie III).

RESULTATS

Résultats : Partie I
Caractérisation du phénotype des souris *Lmna*^{ΔK32/+} et
implication du système ubiquitine-protéasome

Problématique et résumé du travail

Comme je l'ai indiqué plus haut, le premier objectif de mon travail de thèse a été de d'établir précisément le phénotype cardiaque et musculaire des souris hétérozygotes *Lmna*^{AK32/+} (que j'appellerai Het dans la suite de ce mémoire). Pour ce faire, nous avons dans un premier temps effectué une étude longitudinale de la fonction cardiaque sur une cohorte d'animaux sauvage (Wt) et Het. Nous avons recueilli des données échocardiographiques et électrocardiographiques (ECG) tous les mois à partir de l'âge de 12 semaines, jusqu'au décès des animaux. Ce suivi a montré que les animaux Het développent une dysfonction contractile gauche progressive suivie d'une dilatation du ventricule gauche. Cette CMD évolue en insuffisance cardiaque congestive conduisant au décès des animaux entre l'âge de 35 et 70 semaines. Aucun trouble du rythme ou de la conduction précoce n'a été observé avec la méthode ECG que nous avons utilisée.

En parallèle de ces études cardiaques, une évaluation de la fonction et de la morphologie musculaire squelettique a été réalisée et n'a mis en évidence aucun défaut observable chez les souris Het. Elles ne développent donc qu'une cardiomyopathie dilatée sans atteinte squelettique associée.

J'ai ensuite analysé la morphologie du tissu cardiaque et des noyaux en microscopie, et mesuré le niveau d'expression des lamines A/C dans trois groupes de souris d'âges différents. Nous avons choisi d'étudier le phénotype de souris Het âgées de 10 semaines ne présentant pas encore de dysfonction cardiaque, de souris de 30 semaines présentant un début de dysfonction cardiaque et enfin un groupe de souris de 57 semaines souffrant de CMD à un stade avancé.

La morphologie des noyaux des cardiomyocytes est altérée dans le cœur des souris Het. La localisation des lamines A/C a été étudiée en immunofluorescence sur coupe de cœur. Elles apparaissent correctement localisées à la périphérie nucléaire. L'analyse de l'ultrastructure du myocarde, réalisée en microscopie électronique a révélé des noyaux allongés et déformés, ainsi qu'un élargissement de l'espace intermembranaire nucléaire chez les souris Het.

L'analyse du niveau de lamines A/C a montré une réduction de 50% environ dans le cœur des souris Het de 10 et 30 semaines mais une quantité similaire aux animaux Wt chez les souris de 57 semaines souffrant de CMD. En revanche, le niveau d'ARNm *Lmna* total (sauvage et muté) mesuré par PCR quantitative est similaire dans le cœur des

souris Het et Wt aux trois âges testés. Grâce à l'utilisation de sondes d'hydrolyses reconnaissant spécifiquement les ARNm *Lmna* sauvages ou mutés, nous avons montré que le niveau d'expression des deux allèles est équivalent dans le cœur des souris Het aux trois âges étudiés. Ces résultats suggèrent un défaut de traduction protéique ou une dégradation accélérée d'environ la moitié des lamines A/C chez les animaux Het sans ou présentant un début d'atteinte cardiaque. Nous nous sommes concentrés sur l'hypothèse d'une dégradation accélérée des lamines A/C.

A partir de ces résultats nous avons formulé les hypothèses suivantes :

- 1) Les lamines mutées seraient dégradées chez les animaux Het sans ou présentant un début d'atteinte cardiaque et cette dégradation n'existerait plus chez les animaux ayant développé une CMD.
- 2) L'évolution du ratio lamine Wt vs mutée pourrait donc avoir un impact important dans l'apparition et/ou la progression de la CMD chez les souris Het. La lamine mutée jouerait un rôle de peptide poison.
- 3) Le système protéolytique responsable de la dégradation des lamines A/C mutées serait altéré avec la progression de la CMD.

Nous avons exploré ces hypothèses en :

- 1) Etudiant l'effet de l'inhibition du principal système de dégradation des protéines, le système ubiquitine-protéasome (UPS), sur le niveau de lamines A/C mutées dans différents systèmes *in vitro*. En premier lieu, des myoblastes issus de muscle de souris Wt et homozygotes *Lmna*^{ΔK32/ΔK32}, n'exprimant que des lamines A/C mutées, ont été utilisés pour étudier la dégradation des lamines mutées endogènes. Pour déterminer si un mécanisme identique existe dans les cellules cardiaques, des cardiomyocytes néonataux de souris Wt ont été transduits avec un adénovirus pour surexprimer la lamine A ΔK32 humaine. La dégradation de cette lamine mutée exogène a ensuite été analysée dans les cardiomyocytes, en réponse à l'inhibition de l'UPS.
- 2) Analysant le niveau de lamines mutées et sauvages par spectrométrie de masse dans le cœur des souris Het de 10 et 57 semaines (en collaboration avec Søren Skov Jensen et Marie-Catherine Le Bihan, Odense, Danemark). La lysine est un

acide aminé chargé positivement. La délétion de la lysine 32 change donc le point isoélectrique (pI) et la masse des lamines A et C, et permet ainsi la détection et la quantification des peptides mutés et sauvages, coexistant dans le cœur des animaux Het. Pour évaluer un rôle « peptide poison » de la lamine mutée, nous avons étudié l'impact de la surexpression de la lamine A Δ K32 humaine dans un tissu cardiaque reconstitué. Ce système, appelé EHT (Engineered Heart Tissue), consiste à reconstruire *in vitro* un tissu contractile à partir de cellules cardiaques isolées de cœurs de rats nouveaux nés (Hansen et al, 2010). Ces cellules sont mélangées à un gel de fibrine qui forme une matrice élastique permettant aux cellules de s'aligner et de battre de façon coordonnée, mimant ainsi les contractions du tissu cardiaque. Les propriétés contractiles des EHTs peuvent ensuite être mesurées grâce à un système de vidéoscopie (Hansen et al, 2010). Dans ce système, nous avons transduit les cellules avec le même adénovirus que celui utilisé sur les cardiomyocytes de souris, pour surexprimer la lamine A Wt ou Δ K32 humaine. Après 8 jours de maturation du système en culture, nous avons mesuré les paramètres contractiles des EHTs transduits ou non, ainsi que l'expression et la localisation de la lamine A Wt ou Δ K32 exogène (en collaboration avec Lucie Carrier, Hambourg, Allemagne).

- 3) Analysant la fonction de l'UPS dans le cœur des souris Wt et Het. Ceci a été réalisé en croisant nos animaux avec des souris exprimant une GFP modifiée, rapportrice de la fonction de l'UPS *in vivo* (Lindsten et al, 2003). La lignée de souris que nous avons utilisée est la souris Ub^{G76V}-GFP, que j'ai présentée en introduction de ce mémoire (en collaboration avec Lucie Carrier, Hambourg, Allemagne). Nous avons analysée le niveau d'Ub-GFP dans le cœur des animaux Wt/Ub-GFP et Het/Ub-GFP âgées de 30 semaines, âge auquel les souris Het présentent un début de dysfonction contractile cardiaque.

Les résultats obtenus ont permis de confirmer nos hypothèses. Nous avons, en effet, montré que l'inhibition de l'UPS par des agents pharmacologiques comme le MG132 et l'époxomicine augmente le niveau de lamines mutées dans les myoblastes et les cardiomyocytes néonataux de souris. Ceci confirme que la lamine mutée endogène ou exogène est bien dégradée par l'UPS *in vitro*.

En parallèle, l'analyse de spectrométrie de masse a révélé que le niveau de lamine mutée est très faible. Il représente environ 8,4% et 8% des lamines totales dans le cœur des souris Het âgées de 10 et 57 semaines, respectivement. Ce ratio est stable avec l'âge mais étant donnée l'augmentation d'un facteur 2 du niveau total de lamines A/C (sauvages + mutées) entre 10 et 57 semaines dans le cœur des souris Het, la quantité totale de lamine mutée est doublée entre 10 et 57 semaines dans le cœur des animaux Het. Ce résultat est conforme à notre hypothèse que l'augmentation de la quantité de lamine mutée pourrait avoir un impact important dans la progression de la CMD chez les souris Het.

Les résultats de la surexpression de la lamine A humaine Wt ou mutée dans des EHTs, ayant pour but d'évaluer un effet peptide poison de la lamine A Δ K32, a montré que la surexpression de la lamine A Wt ou Δ K32 a des effets négatifs sur la fonction contractile du tissu cardiaque. De façon surprenante, en revanche, la surexpression de la lamine A Δ K32 s'est révélée moins délétère que celle de la lamine Wt. Ceci s'explique par la dégradation de la lamine A Δ K32 dans ce système que nous avons mis en évidence par l'inhibition de l'UPS par un traitement à l'époxomicine, comme dans les cardiomyocytes et les myoblastes en culture. En microscopie à fluorescence, nous avons montré que la lamine A Wt se localise correctement à l'enveloppe nucléaire dans les cardiomyocytes alors que la lamine A Δ K32 est localisée de façon diffuse dans le nucléoplasme ou dans le cytoplasme. L'inhibition de l'UPS n'a pas eu d'impact sur la localisation de la lamine A Wt. En revanche, la lamine A Δ K32 non dégradée dans ce contexte, forment des agrégats dans le nucléoplasme des cardiomyocytes, suggérant un effet négatif de cette lamine mutée.

Enfin, l'étude des souris Het/Ub-GFP a révélé une dysfonction de l'UPS dans le cœur des souris Het âgées de 30 semaines. Nous avons, en effet, montré une accumulation de protéine GFP-ubiquitinée dans le cœur des souris Het, indiquant un défaut de dégradation de ce substrat et donc une insuffisance de l'UPS à cet âge. De façon intéressante, cette dysfonction apparaît comme causale puisqu'elle survient avant la « normalisation » du niveau des lamines A/C dans le cœur des animaux Het.

L'ensemble des résultats de cette étude a donc mis en évidence un rôle important de l'UPS dans la dégradation des lamines A/C mutées, limitant ainsi leur effet délétère. Les mécanismes physiopathologiques à l'origine de la CMD chez les souris Het sont donc

doubles : à l'haploinsuffisance des lamines A/C, connue comme préjudiciable pour le myocarde (Chandar et al, 2010 ; Wolf et al, 2008), s'ajoute un effet poison de la lamine mutée, augmentant en raison de l'inhibition de l'UPS dans le cœur des souris Het.

Ce travail a donné lieu à la rédaction d'un manuscrit soumis au journal *Circulation Research* pour publication et présenté ci-après.

Manuscrit

Heterozygous *Lmna*^{delK32} mice develop dilated cardiomyopathy through a combined pathomechanism of haploinsufficiency and peptide toxicity

Cattin: DCM pathomechanisms of *Lmna*^{delK32/+} mice

Marie-Elodie Cattin^{1,2}, Saskia Schlossarek³, Marie-Catherine Le Bihan^{1,2,4}, Søren Skov Jensen⁴, Anne T. Bertrand^{1,2}, Claudia Crocini³, Sophia Maron³, Jeanne Lainé^{1,2,5}, Nathalie Mougenot⁶, Shaïda Varnous^{1,2}, Yves Fromes^{1,2}, Arne Hansen³, Thomas Eschenhagen³, Valérie Decostre^{1,2}, Lucie Carrier^{1,2,3}, Gisèle Bonne^{1,2,7,*}.

¹Inserm, U974, Paris F-75013, France. ²Université Pierre et Marie Curie- Paris 6, UM 76, CNRS, UMR 7215, Institut de Myologie, IFR14, Paris F-75013, France. ³Department of Experimental Pharmacology and Toxicology, Cardiovascular Research Center, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany. ⁴Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Southern Denmark, Odense, Denmark. ⁵UPMC Univ Paris 06, Site Pitié-Salpêtrière, Département de Physiologie, Paris F-75013 France. ⁶PECMV, Inserm, IFR14, Paris, France. ⁷AP-HP, Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière, U.F. Cardiogénétique et Myogénétique, Service de Biochimie Métabolique, Paris F-75013, France.

*To whom correspondence should be addressed: g.bonne@institut-myologie.org

Thérapie des maladies du muscle strié / Institut de Myologie

Inserm, U974, G.H. Pitié-Salpêtrière, 47 boulevard de l'Hôpital, F-75 651 Paris Cedex 13, France

Tel: (33) 142165723; Fax: (33) 142165700

Word count: 7000

Subject codes: 130, 11, 145

ABSTRACT

Rationale. Dilated cardiomyopathy (DCM) associates left ventricular dilatation and/or systolic dysfunction and is a major cause of heart failure and cardiac transplantation. *LMNA* gene encodes lamin A/C, proteins of the nuclear envelope and *LMNA* mutations cause DCM with conduction and/or rhythm defects. The pathomechanisms linking mutations to DCM remain to be elucidated.

Objective. To investigate the phenotype and associated pathomechanisms in heterozygous *Lmna*^{ΔK32/+} knock-in mice.

Methods and Results. Heterozygous *Lmna*^{ΔK32/+} mice (Het) did not show rhythm/conduction defect. They progressively developed cardiac dysfunction and DCM, and died between 35 and 70 weeks of age. Lamin A/C was correctly located at the nuclear envelope in Het hearts. The evolution of DCM was associated with a modulation of cardiac lamin A/C protein level. Before the development of DCM, lamin A/C protein level was 50% lower in Het than Wild-type (Wt) hearts, but did not differ between both groups thereafter. The reduced lamin A/C content resulted from ΔK32-lamin degradation via the ubiquitin-proteasome system (UPS). Crossing these mice with the Ub^{G76V}-GFP UPS reporter mice revealed a 1.5-fold higher level of Ub^{G76V}-GFP in Het than in Wt mice. Overexpression of ΔK32-lamin in engineered heart tissue followed by inhibition of the proteasome resulted in its nuclear aggregation. These results suggest a global UPS impairment and poison peptide effect in Het hearts.

Conclusions. *Lmna*^{ΔK32/+} mice are the first knock-in *Lmna* model with cardiac-specific phenotype at the heterozygous state. Our data provide evidence for haploinsufficiency associated with accumulation of a poison peptide as pathomechanisms of DCM in *Lmna*^{delK32/+} mice.

KEY WORDS: Lamin A/C, dilated cardiomyopathy, ubiquitin-proteasome system

Non standard Abbreviations and Acronyms

AAV: Adeno-associated virus

DCM: Dilated cardiomyopathy

DCM-CD: Dilated cardiomyopathy with conduction disease

EDL: *extensor digitorum longus* muscle

EDMD: Emery-Dreifuss muscular dystrophy

EHT: Engineered heart tissue

Het: Heterozygous *Lmna*^{ΔK32} knock-in mice

LMNA: Lamin A/C gene

MOI: Multiplicity of infection

NMCM: Neonatal mouse cardiomyocytes

Ub-GFP: mutant ubiquitin-coupled green fluorescent protein

UPS: Ubiquitin-proteasome system

Wt: Wild-type mice

The main features of dilated cardiomyopathy (DCM) are left ventricular dilatation, systolic dysfunction, myocyte death and myocardial fibrosis. DCM represents a major cause of heart failure and cardiac transplantation. Analysis of relatives of affected patients reveals a familial disease in 20% to 35% of cases.¹ Among all the mutated genes reported in familial DCM, *LMNA* gene represents one of the first known cause of non-syndromic DCM in patients, estimated at 6% of DCM.¹ The *LMNA*-related cardiomyopathy associates DCM, conduction and/or rhythm defects (DCM-CD)^{2,3} and is mainly dominantly inherited.

To date, more than 400 *LMNA* gene mutations have been reported (<http://www.umd.be/LMNA/>), which lead to a wide spectrum of diseases collectively referred to as laminopathies.⁴ These pathologies involve either specific tissues (striated muscles, adipose tissue, peripheral nerves) or several systems (progeroid syndromes) with overlapping phenotypes. Among the *LMNA* mutations identified so far, most of them lead to cardiac diseases (DCM-CD) that are isolated or associated with skeletal muscles involvement, e.g. *LMNA*-related congenital muscular dystrophy,⁵ Emery-Dreifuss muscular dystrophy (EDMD)⁶ In those pathologies, DCM-CD constitutes the most serious and life-threatening clinical manifestation of the disease.

LMNA encodes A-type lamins, mainly comprising lamin A and C.⁷ Lamin A/C are ubiquitous proteins of the type V intermediate filament family. They assemble in highly organized structures and, together with B-type lamins, form a meshwork beneath the inner nuclear membrane: the nuclear lamina.⁶ Lamin A/C physiological roles are not yet fully understood. Their numerous interactions with proteins of the nuclear membrane support a role in maintaining the structure and stiffness of the nuclear envelope. They also largely interact with proteins of the nucleoplasm (transcription factors and histones) and with chromatin, which suggests physiological functions in regulation of gene expression.^{8,9}

The mechanisms by which mutations in *LMNA* lead to tissue-specific diseases remain unclear. An important function of the nuclear lamina is to maintain the structural integrity of cells. Therefore, lamina defects might result in cellular “weakness” and damages, critical for muscular cells subjected to constant mechanical stress. In addition, altered tissue-specific gene expression might also be involved in the diseases.⁸ Cumulative evidence indicates that the steady-state level of lamin A/C level is crucial for normal cell morphology and function, especially in the heart. Overexpression of wild-

type lamin A/C in cells and tissues leads to nuclear abnormalities and higher sensitivity to cell death.^{10,11} *Lmna*^{-/-} null mice develop severe DCM and die prematurely by 8 weeks of age,¹² and finally, heterozygous *Lmna*^{+/-} mice that express only 50% of lamin A/C suffer from DCM-CD arising later at adulthood.^{13,14}

We created a new *Lmna* mutant mouse model deleted for lysine in position 32 of lamin A/C (*Lmna*^{ΔK32} mouse).¹⁵ Homozygous *Lmna*^{ΔK32/ΔK32} mice exhibit maturation defects of skeletal and cardiac muscles, and severe metabolic disorders responsible for premature death at 2 weeks of age, suggesting that the ΔK32-lamin A/C protein itself and/or the overall reduction in lamin A/C level (-80%)¹⁵ has deleterious effects. At this age, heterozygous *Lmna*^{ΔK32/+} mice did not have an obvious pathological phenotype. In the present paper, we further investigated the phenotype of the heterozygous *Lmna*^{ΔK32/+} adult mice (thereafter called Het mice).

MATERIALS AND METHODS

Expanded Methods section is available in the Online Data Supplement.

Animals

Lmna^{ΔK32} knock-in mice were generated as previously described.¹⁵ Mice were studied according to protocols approved by the European legislation (L358-86/609/EEC). We explored the cardiac phenotype of Het mice at three different ages corresponding to different stages of heart function: 10 week-old mice without any cardiac dysfunction, 30 week-old mice starting heart dysfunction and 57 week-old mice at advanced-stage of DCM (Supplemental tables 1 and 2). The Ub^{G76V}-GFP/1 mice were generated and characterized as previously described.¹⁶ They ubiquitously express a green fluorescent protein (GFP)-fused proteasome substrate.

Production of adeno-associated virus

FLAG-tag was inserted before the ATG codon of WT- and ΔK32-human prelamin A constructs by PCR. They were subcloned into the pSMD2-CMV vector for adeno-associated virus serotype 6 (AAV-6) production as described previously.¹⁷ Virus titers ranged from 1.92x10¹² to 1.03 x10¹³ virus genomes/ml.

Cardiomyocytes and myoblasts culture and analysis

Neonatal mouse cardiac myocytes (NMCM) were isolated from C57/BL6J mice as previously described.¹⁸ NMCM were transduced with AAV-6 encoding Flag-Wt- or Flag-ΔK32-prelamin A at MOI (Multiplicity Of Infection) of 30,000. Cells were treated with 500 nM epoxomicin in 10% DMSO or with DMSO alone for 24 h. NMCM were harvested 72 h after culture. Primary myoblasts were isolated from *tibialis anterior* muscle of 2 week-old Wt and *Lmna*^{ΔK32/ΔK32} mice. Myogenicity was checked by desmin staining. Cells were treated with 25 μM MG132 in DMSO or with DMSO alone for 3 or 6 hours.

Engineered Heart Tissue generation and analysis

Fibrin-based engineered heart tissues (EHT) from neonatal rat heart cells were generated and cultured as previously described.¹⁹ Briefly, for each EHT, a 100 μl-reconstitution mix containing 4x10⁵ cells/EHT, bovine fibrinogen, aprotinin, and DMEM

was mixed with 3 μ l thrombin and pipetted around two elastic silicone posts. EHTs were transduced with AAV-6 encoding Flag-Wt- or Flag- Δ K32-prelamin A at a MOI of 3000 directly added in the reconstitution mix. At day 17, EHTs were treated with 500 nM epoxomicin in 10% DMSO or with DMSO alone for 24 h. Contraction measurements were performed by video optical recording on day 8, 11, 15 and 17 as previously described.¹⁹ Average force and contraction and relaxation velocities were calculated from the recorded contractions by an algorithm that takes into account the elastic properties of the silicone posts.

Mass spectrometry

Heart protein extracts for mass spectrometry (MS) analysis were prepared as described in the Western blotting procedure (Supplemental methods) and separated using SDS-PAGE. The gel lanes containing the lamin A and C proteins were cut out and digested using in-gel tryptic digestion. The peptides were analyzed by nanoLC-MS/MS. The resulting sequence-data was searched against a custom-made mouse database containing the sequence of the Δ K32 variant. Relative label-free quantitation was performed in MaxQuant where total peptide signals were determined in the mass to charge, elution time and intensity space.^{20,21}

Statistical analysis

Differences between groups were assessed using ANOVA and Student's t-test with Sigmastat software. Values of $p < 0.05$ were considered statistically significant.

RESULTS

Het mice do not show skeletal muscle defect

As *Lmna*^{AK32/AK32} mice showed skeletal muscle abnormalities,¹⁵ we investigated the skeletal muscle phenotype of old Het mice (57 weeks of age). Spontaneous activity test, *in vitro* contractile function of diaphragm, *soleus* and *extensor digitorum longus* (EDL) muscles, and histological analysis of *gastrocnemius* muscle were performed in Het and Wt mice (Supplemental table 3 and supplemental Fig 1). All these parameters did not differ between Het and Wt mice, suggesting no skeletal muscle defect in Het mice. However, the lamin A/C protein level was more than 50% lower in *gastrocnemius* of Het than of Wt mice all life long (Supplemental Fig 2).

Het mice develop dilated cardiomyopathy

Het mice displayed a shortened lifespan. They died during adulthood between 35 and 70 weeks of age without any gender-difference (Fig 1A). To assess the cardiac phenotype of Het mice, we performed echocardiographic and electrocardiographic (ECG) longitudinal studies of male and female Het and Wt mice from 12 weeks of age until death. This monitoring revealed that Het mice developed decreased fractional shortening (FS) starting a bit earlier in males than in females (Fig 1B; Supplemental Tables 1 and 2), reflecting a progressive contractile dysfunction. This was followed by left ventricular dilation shown by increased left ventricular end-diastolic dimensions (LVEDD; Fig 1C; Supplemental Tables 1 and 2). These features matched with a DCM phenotype. Nevertheless it is worth noting that despite left ventricular (LV) dilation, there was no major wall thinning (IVSd and PWd; Supplemental Tables 1 and 2). Importantly, whatever the age of onset of cardiac dysfunction, which varied from 32 to 70 weeks of age, the timeline of the disease evolution was very reproducible between mice, i.e. 15-20 weeks between FS decrease and death. ECG recordings did not reveal any primary conduction or rhythm defect in Het mice. Some unspecific abnormalities (slight bradycardia, higher PR interval, QRS complex broadening) were observed at the very end-stages of the DCM only (data not shown). The progression of DCM was associated with cardiac hypertrophy (Fig 1D) and with ventricular and atrial enlargement (Fig 1G). At the end stage, the LV of Het mice presented slight fibrosis (Fig 1H and 1I). Het mice eventually presented congestive heart failure as demonstrated by dramatic LV

hypokinesia and lung oedema reflected by increase in lung weight to tibia length ratio (Fig 1E). Analysis of mRNA levels of cardiac remodelling markers (Fig 1F), at 10 and 57 weeks revealed that *Nppa* mRNA level did not differ between Het and Wt mice at both ages, whereas *Nppb* mRNA amounts were 1.6- and 5.6-fold higher in Het mice at 10 and 57 weeks of age, respectively. *Myh7* mRNA level did not differ between 10 week-old Het and Wt, but was 5-fold higher in 57 week-old Het mice. These results illustrated cardiac remodelling processes starting at 10 weeks of age in Het mice.

Nuclei show abnormal shape in Het hearts

Immunostaining analysis of lamin A/C in the heart of 10, 30 and 57 week-old Het mice (Fig 2) revealed nuclear rim localization similar to that observed in the heart of age-matched Wt. However, a large proportion of nuclei were abnormally elongated in Het hearts at all ages (Fig 2), even before the onset of DCM (Fig 2A). Myocardial ultrastructure analysed by electron microscopy revealed preserved sarcomeric architecture, but many nuclei with widening of the nuclear intermembrane space and elongated shape in young asymptomatic Het mice compared to Wt (Fig 3A and B). In older Het animals with mild cardiac dysfunction, severe alterations were found in many nuclei, such as extremely wide nuclear intermembrane space, accumulation of large perinuclear vacuoles (Fig 3C and D), or envelope rupture with extravasations of chromatin material into the cytoplasm (Fig 3E). In contrast, sarcomeric organization remained mostly undisturbed, except frequent scattered vacuolar structures. At end-stage, in addition to the pronounced alteration of a majority of nuclei, nonspecific degenerative changes were observed: disrupted sarcomeres, myofibrillar lysis, vesicular proliferation of sarcomeric reticulum, intracytoplasmic junctions, electron dense residual bodies and pericellular fibrosis (data not shown).

Mutant lamin A/C level is modulated with the progression of DCM

We evaluated the amount of lamin A/C proteins in the heart of 10, 30 and 57 week-old Het and Wt mice, and found lamin A/C protein levels to be 50 % lower in the heart of 10 and 30 week-old Het mice than in age-matched Wt (Fig 4A and B). Interestingly, in the heart of 57 week-old Het mice, the lamin A/C protein level did not differ between Het and Wt mice (Fig 4A and B), thus suggesting that progression of DCM is associated with increase in lamin A/C level. In addition, the level of lamin A is negatively correlated with

the fractional shortening of Het hearts (Fig 4C; $r = -0.581$; Pearson correlation test $p < 0.01$). Lamin A/C level did not change with aging in the heart of Wt mice (data not shown). We then evaluated whether the apparent increase in lamin A/C level in Het hearts was due to modulation of *Lmna* mRNA expression. Total *Lmna* mRNA level did not differ between Het and Wt mice at 10, 30 and 57 weeks of age (Fig 4D). Allele specific mRNA level assessment by RT-qPCR using specific hydrolysis probes for Wt or $\Delta K32$ -*Lmna* mRNA showed that both alleles were similarly expressed in the heart of Het mice at the three stages (Fig 4E). Taken together, these results suggest that the lower lamin A/C level in the heart of young Het mice was due to $\Delta K32$ -lamin A/C regulation at the post-transcriptional level at these stages. The normalization of lamin A/C level in 57 week-old Het hearts could reflect either an alteration of the $\Delta K32$ -lamin A/C post-transcriptional regulation process or an increase of global number of nuclei, secondary to proliferation of non-cardiomyocytes. However, emerin level, another nuclear protein, was similar in Het and Wt hearts at all tested ages (Fig 4A), indicating that the 2-fold increase of lamin A/C level was not due to an increase in the number of cells.

We thus hypothesized that normalization of the total level of lamin A/C resulted from accumulation of $\Delta K32$ -lamin A/C in old Het hearts and that this leads to deleterious consequences on cardiac function in Het mice. The amount of $\Delta K32$ -lamin A/C to that of total lamin A/C protein was analysed by mass spectrometry (MS) (Fig 4F and Supplemental Fig 3-4). Lamin A/C peptides were generated by trypsin digestion of protein extracts from heart samples of Het mice. Analysis of peptide signal intensities from the two unique Wt-peptides ($^{33}\text{EDLQELNDR}^{41}$ and $^{29}\text{LQEKEDLQELNDR}^{41}$) and from the unique $\Delta K32$ -peptide ($^{29}\text{LQEEDLQELNDR}^{40}$) showed that the $\Delta K32$ -peptide represented 8.4% and 8% of total lamin A/C proteins in the heart of 10 and 57 week-old Het mice, respectively (Fig 4F). This indicated that the level of $\Delta K32$ -lamin A/C was very low in Het hearts throughout the evaluated lifespan, but did not change over time. However, the MS quantification confirmed that the overall level of lamin A/C increased with age in Het mice (Supplemental Fig 4E). We can thus estimate that the amount of $\Delta K32$ -lamin A/C increased in 57 compared to 10 week-old Het hearts.

Ubiquitin-proteasome system is impaired in Het hearts

Similar transcript and increasing protein levels over time suggested that the level of lamin A/C was subject to post-transcriptional regulation in the heart of aging Het mice

(Fig 4). We hypothesized that this involves a protein degradation system, which may become impaired in Het mice with age. In mammalian cells, the ubiquitin-proteasome system (UPS) is the major non-lysosomal degradation system involved in protein homeostasis.²² To assess its global function, Het and Wt mice were crossed with Ub^{G76V}-GFP mice. Ub^{G76V}-GFP (thereafter called Ub-GFP) mice express ubiquitously a green fluorescent protein (GFP)-based proteasome substrate that allows monitoring of the UPS *in vivo*.¹⁶ Ub-GFP protein level in tissue, reflecting the steady-state of ubiquitin-linked degradation, provides a direct view of UPS function in those mice. In the heart of 30 week-old Het/Ub-GFP mice, the Ub-GFP level was 1.5-fold higher than in Wt/Ub-GFP mice (Fig 5A and B), indicating a global dysfunction of the UPS in Het/Ub-GFP mice. Interestingly, this UPS impairment appeared prior to normalization of lamin A/C level in Het/Ub-GFP mice, as lamin A/C level was 50% lower than in Wt/Ub-GFP mice at this age (Fig 5A and C), supporting the hypothesis that impaired UPS is a cause of lamin A/C accumulation in aging Het mice.

UPS inhibition results in increased lamin A/C level in myoblasts and cardiomyocytes

To determine whether UPS was involved in the degradation of Wt or Δ K32-lamin A/C, primary myoblasts derived from homozygous *Lmna* ^{Δ K32/ Δ K32} or Wt mice were treated for 3 or 6 hours with 25 μ M MG132, a specific inhibitor of the UPS, and lamin A/C level was measured by western blot. UPS inhibition was validated by accumulation of ubiquitinated proteins in myoblasts after MG132 treatment (Fig 6A). As previously described, lamin A/C level was 80% lower in *Lmna* ^{Δ K32/ Δ K32} than in Wt untreated cells.¹⁵ After UPS inhibition by MG132, lamin A/C level increased in both *Lmna* ^{Δ K32/ Δ K32} and Wt myoblasts (Fig 6A), suggesting that UPS is indeed involved in endogenous Δ K32-lamin A/C degradation. To investigate whether this mechanism occurred also in cardiomyocytes, NMCM were transduced with AAV6 encoding Flag-Wt- or Δ K32-prelamin A, and treated with 500 nM epoxomicin, another UPS inhibitor, for 24 h. In untreated NMCM, Flag- Δ K32-lamin A level was lower than Flag-Wt-lamin A (Fig 6B). After UPS inhibition, both Flag-Wt- and Δ K32-lamin A were significantly increased in epoxo-treated NMCM, demonstrating that, as in myoblasts, Δ K32-lamin A was degraded by the UPS in cardiomyocytes.

Degradation of Δ K32-lamin partially protects against contractile impairment of EHTs

Δ K32-lamin A/C increased in the heart of Het mice during cardiac disease progression (Fig 4) and was negatively associated with cardiac function, suggesting that Δ K32-lamin A/C had deleterious effect in the heart of Het mice. To evaluate this hypothesis, we studied the impact of Flag-Wt- or Δ K32-prelamin A overexpression on contractile properties of engineered heart tissues (EHTs).¹⁹ Both Flag-Wt- and Flag- Δ K32-lamin A-transduced EHTs started to beat later than untransduced EHTs (Fig 7A). Consistent with this observation, Flag-Wt-, and to a lower extent, Flag- Δ K32-lamin A-transduced EHTs showed impaired contractile function compared to untransduced EHTs, namely lower force generation and contraction/relaxation velocities (Fig 7A b and c, respectively). Overexpression of WT lamin A/C is known to give rise to deleterious effect in cells.^{10,11} To understand the lower deleterious effect of Flag- Δ K32-lamin A that contradicted our hypothesis, we evaluated the localization and expression level of Flag-Wt and Flag- Δ K32-lamin A in EHTs. Flag-Wt-lamin A had the expected rim nuclear localization, whereas Flag- Δ K32-lamin A was diffusely located within the nucleoplasm or in the cytoplasm (Fig 7B). This different localization between Flag-Wt- and Δ K32-lamin A was associated with slightly lower Flag- Δ K32-lamin A level compared with Wt (Fig 7C). 24 h treatment with epoxomicin increased both Flag-Wt- and Flag- Δ K32-lamin A levels (Fig 7C). The treatment had no major impact on Flag-Wt-lamin A localization (Fig 7B), but induced the formation of Flag- Δ K32-lamin A aggregates in the nuclei. These results showed that degradation of Flag- Δ K32-lamin A via the UPS in reconstituted heart tissue limited its aggregation and therefore also its negative effect.

DISCUSSION

We report here that a heterozygous in-frame deletion in the N-terminal domain of lamin A/C caused a cardiac-specific phenotype in mouse. We show that (i) Het mice developed a progressive cardiac dysfunction and DCM evolving to death between 35 and 70 weeks of age; (ii) Δ K32-lamin is subjected to degradation by the UPS; (iii) the progression of the cardiac disease in Het mice was associated with increased Δ K32-lamin A/C amount; (iv) the UPS was impaired in the heart of Het mice, providing a mechanistic basis for the

increase in Δ K32-lamin in aging animals; (v) degradation of Δ K32-lamin partially protected against contractile impairment of fibrin-based rat EHTs. These data provide evidence for a major role of the UPS in the pathophysiological mechanisms leading to DCM in Het mice.

Haploinsufficiency of lamin A/C in Het mice

Young Het mice presented 50% less lamin A/C than age-matched Wt in heart and muscles (Fig 3, Suppl Fig 2 and¹⁵). With age, they developed cardiac disease but no skeletal muscles defects. This segmental phenotype affecting only cardiac muscle has already been observed in striated muscle-specific laminopathies.²³ The heart seems to be more vulnerable than skeletal muscles to haploinsufficiency in patients. Genotype/phenotype correlation using *LMNA* Universal mutation database (<http://www.umd.be/LMNA/>) showed that 67% of nonsense and truncating mutations, which putatively lead to lower lamin A/C protein levels, cause cardiac diseases without muscle involvement.²⁴⁻²⁶ To date, no clear evidence explains the contrasting sensitivity to lamin A/C haploinsufficiency between heart and skeletal muscles. It might result from structural and functional differences of these two tissues. The heart contracts in a 'twist' way, generating torsion whereas skeletal muscles generate unidirectional shortening. In addition, distinct organizations of the cellular cytoarchitecture as well as central position of nuclei in cardiac cells compared to subsarcolemal location in muscular cells induce singular forces applied on nuclei of cardiac cells compared to myofibers. This may explain, in part, the higher susceptibility of cardiac muscle to nuclear mechanical defects and nuclear deformations induced by relative loss of lamin A/C, as observed in Het mice.

Like in human, lamin A/C haploinsufficiency in mouse induces heart disease. *Lmna*^{+/-} mice, presenting 50% of lamin A/C in tissues, exhibit programmed cell death of atrio-ventricular nodal myocytes and progressive electrophysiologic disease starting at 10 weeks of age.¹³ They also develop mild dilated cardiomyopathy.¹⁴ Like in *Lmna*^{+/-} mice, part of the heart phenotype of Het mice can be attributed to haploinsufficiency. However, our data show that Het mice developed a more severe phenotype than *Lmna*^{+/-} mice and with several different features. Both mouse strains displayed DCM, with a relatively earlier onset for *Lmna*^{+/-} mice.¹⁴ However, only 20% of *Lmna*^{+/-} mice suffered from life-threatening cardiac dysfunction, whereas all Het mice died from congestive

heart failure. Het mice did not display cardiac electrical abnormalities whereas *Lmna*^{+/-} mice showed rhythm and conduction defects, suggesting specific mechanisms related to the deletion of lysine 32. Indeed, in contrast to what was observed in *Lmna*^{+/-} mice, lamin haploinsufficiency in Het mice was compatible with apparently normal heart function and an age-related normalization of total (Wt and mutant) lamin A/C level was associated with DCM. These results suggest another pathomechanism for Δ K32 mutation: a 'toxic' effect of mutant lamin A/C.

Dominant negative effect of Δ K32-lamin A/C

The key and original finding of our heterozygous mouse model is the alteration of the degradation of Δ K32-lamin A/C restricted to the heart with the course of DCM. We showed an increase in Δ K32- and Wt-lamin A/C amount in the heart of 57 week-old Het mice and a negative correlation between cardiac level of lamin A/C and cardiac function in those mice. These results indicate that both Wt and up to 8.4% of mutant proteins co-exist in the heart and suggest a dominant negative effect of Δ K32-lamin A/C. In accordance with this hypothesis, we showed that degradation of Δ K32-lamin impeded its aggregation into the nuclei and partially protected against contractile impairment in EHTs.

Dominant negative effect of Δ K32-lamin A/C is supported by data from *C. elegans*. Ce- Δ K46-lamin (homologous to Δ K32 in human and mouse) filaments displayed alterations in the lateral assembly leading to abnormal lamin network *in vitro*.²⁷ We recently reported that homozygous *Lmna* ^{Δ K32/ Δ K32} mice died at 2 weeks of age because of severe global maturation defects and metabolic disorders.¹⁵ They exhibited only Δ K32-lamin A/C in all tissues. *Lmna* ^{Δ K32/ Δ K32} mice showed a more severe phenotype than *Lmna*^{+/-} mice (which die at 8 weeks of age)¹² suggesting that Δ K32-lamin A/C is worse than no protein at all. Thus, the presence of Δ K32-lamin in the heart of Het mice may disturb correct filament assembly of Wt-lamin, leading to lamina defects. All together these data support the notion of 'toxic' effect of Δ K32-lamin A/C.

UPS dysfunction in the heart of Het mice

Whatever the primary cause (mechanical overload, ischemia or mutant proteins), myocardial remodelling is a common feature of chronic heart failure and involves several pathways. Cumulative evidences suggest that alteration of proteasome-mediated

protein degradation contributes to the initiation and/or progression of cardiac diseases in human and in experimental models.²⁸ In familial cardiomyopathies, reports have demonstrated the role of UPS defective activity in the pathophysiological mechanisms. For example, α B-crystallin mutations (*CRYAB* gene) responsible for familial desmin-related cardiomyopathy²⁹ or cardiac myosin-binding protein C mutations (cMyBP-C, *MYPBC3* gene) leading to hypertrophic cardiomyopathy,³⁰ both involve cardiac UPS impairment in patients and mice.^{18,31,32} The deleterious effects of UPS inappropriate activity on cardiac physiology are also evidenced by the clinical use of specific UPS inhibitors. Since 2003, Bortezomib (Velcade) is approved for treatment of multiple myeloma and is efficiently used as anti-cancer drug.³³ However, it exhibits dramatic cardiotoxic side effects ranging from arrhythmias to heart failure.³⁴

A recent study highlighted proteasome involvement in cardiac and muscular laminopathies. Kandert *et al.* reported dysfunction of UPS associated with impairment of proliferation and differentiation capacities of myoblasts from EDMD patients expressing p.R545C lamin A/C.³⁵ In our study, regarding the modulation of lamin A/C level in Het hearts, two hypotheses can be proposed. First, Δ K32-lamin A/C steady-state degradation might directly overwhelm the proteolysis capacity of UPS. Alternatively, Δ K32-lamin A/C might impair UPS function via indirect effects. It might occur as a consequence of high degradation workflow imposed by cardiomyocytes remodelling in Het mice.

Even if the mechanisms leading to UPS impairment are not fully established in heart diseases, UPS is known to be essential for the balanced turnover of functionally important cardiac proteins, such as contractile proteins³⁶ and membrane receptors regulating cardiac function.^{37,38} It is also largely involved in regulation of many signalling pathways, such as NF- κ B,³⁹ β -catenin⁴⁰ and p53⁴¹ mediated pathways, regulating inflammation, cardiac remodelling and apoptosis. Hence, appropriate activity of UPS is essential to maintain normal cardiac function. Its dysfunction could therefore contribute to DCM in our Het mice. Further studies are needed to elucidate how Δ K32-lamin A/C plays its negative effect, either by increasing sensitivity to mechanical stress and/or by modifying interactions with partners essential for heart functions.

In conclusion, *Lmna* ^{Δ K32/+} mice are the first mutant *Lmna* mice associated with a cardiac-specific phenotype at the heterozygous state, and therefore recapitulate features of DCM

associated with dominant A-type lamin mutations in patients. Therefore, *Lmna*^{ΔK32/+} mice constitute a reliable model for further evaluations of potential therapies of A-type lamin related-DCM. Our findings suggest sequential pathophysiological mechanisms in the development of DCM: (i) Mutant lamin A/C disturb the assembly into protofilaments and are thus targeted for degradation. (ii) Haploinsufficiency contributes to heart tissue vulnerability. (iii) Remodelling mechanisms counteract the higher myocardial sensitivity but have global deleterious effects (e.g. UPS impairment). (iv) ΔK32-lamin A/C amount then increase to reach a threshold and play a dominant negative effect on Wt-lamin assembly. (v) This precipitates cardiac dysfunction and leads to congestive heart failure and death of Het mice.

Acknowledgements

We thank C. Enond at the Animal facility of Pitié-Salpêtrière campus (Centre d'Expérimentation Fonctionnelle, Faculté de Médecine Pierre Marie Curie) for her work and help in the mouse colony maintenance; B. Geertz, A. Jacquet for echographie and S. Bouyon for ECG analysis; N.Guerchet, F. Fougousse et G. Tanniou for muscle analysis; C. Beley, G. Précigout, L. Garcia for the AAV production; N. Dantuma (Stockholm, Sweden) for providing the Ub^{G76V}-GFP transgenic mice; V. Allamand, C. Coirault, T. Voit for critical reading and fruitful discussion; and the Myocastor study group for its constant support.

Source of Fundings

This work was financially supported by the *Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale*; the *Université Pierre et Marie Curie Paris 06*, the *Centre National de la Recherche Scientifique*; the *Association Française contre les Myopathies*; the sixth and seventh Framework Programs of the European Union (Euro-laminopathies #018690, Marie Curie EXT-014051; Health-F2-2009-241577-Big-Heart project), the Deutsche Forschungsgemeinschaft (FOR-604-CA 618/1-1 and 1-2), and the Leducq Foundation (Research grant Nr. 11, CVD 04).

Disclosures

None

Figure 1.

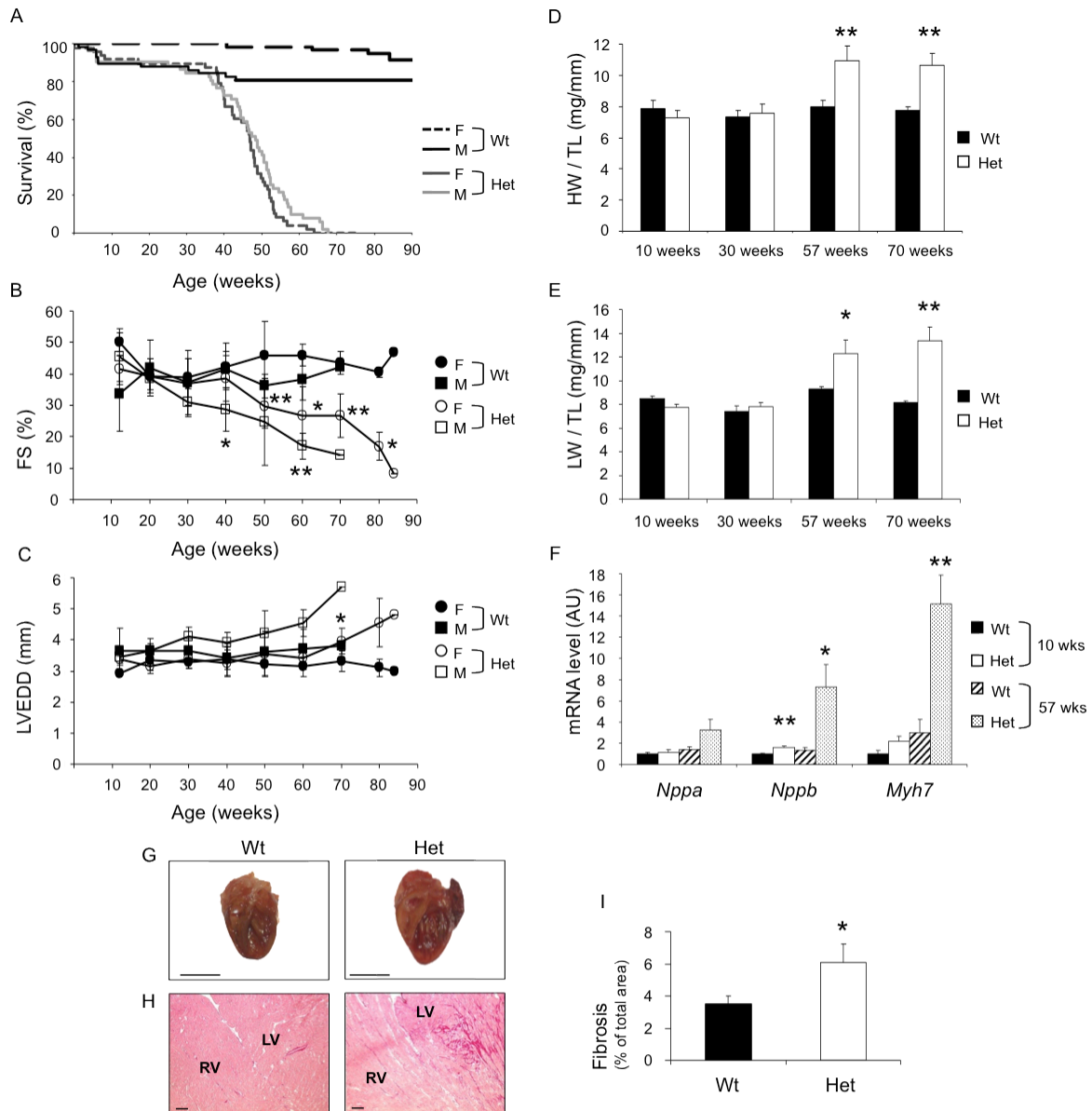


Figure 1. Cardiac phenotype of Het mice.

(A) Survival curve of Wt (57 males, 58 females) and Het (51 males, 48 females) mice. (B-C) Serial echocardiography from 12 to 84 weeks of age in males and females Wt (n=6 to 1 for each gender) and Het (n=9 to 1 for each gender) mice. (B) Fractional shortening. (C) Left ventricular end-diastolic diameter. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ compared with age- and gender-matched Wt. Mean \pm SD. Of note, the different lifespan observed on survival curve and cardiac follow-up is probably due to different animal facilities. (D) Heart weight (HW) to tibia length (TL) ratio in Wt and Het mice (n=6 to 17 in each group) ** $p < 0.01$ compared with age-matched Wt. Mean \pm SEM. (E) Lung weight (LW) to tibia length (TL) ratio in Wt and Het mice (n=6 to 17 in each group) * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ compared to age-matched Wt. Mean \pm SEM. (F) Expression of cardiac remodelling mRNA markers *Nppa*, *Nppb* and *Myh7* in 10 and 57 week-old Wt and Het mice (n=5 to 6 in each group). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ compared with age-matched Wt. Mean \pm SEM. (G) Coronal section of Wt and Het hearts at 57 weeks of age (scale bar = 5 mm). (H) Cross-section of Wt and Het hearts at 57 weeks of age stained with Sirius Red (RV = right ventricle, LV = left ventricle, scale bar = 100 μ m). (I) Proportion of fibrosis normalized to total cardiac area of 57 week-old mice (n=6 in each group). * $p < 0.05$. Mean \pm SD.

Figure 2.

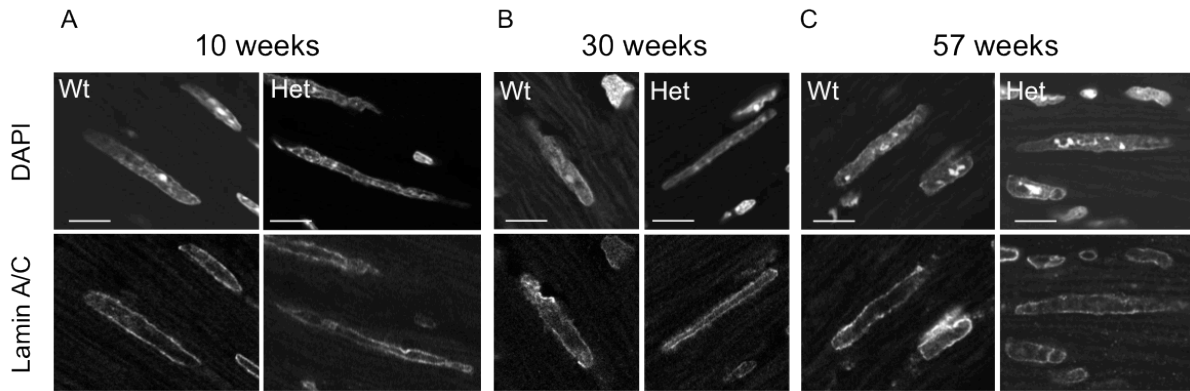


Figure 2. Lamin A/C staining in Wt and Het hearts before (10 weeks, A), at early-stage (30 weeks, B) and at end-stage of DCM (57 weeks, C).

Heart cross sections immunolabelled with anti-lamin A/C antibody. Nuclei are counterstained with DAPI.
Scale bar = 10 μ m.

Figure 3.

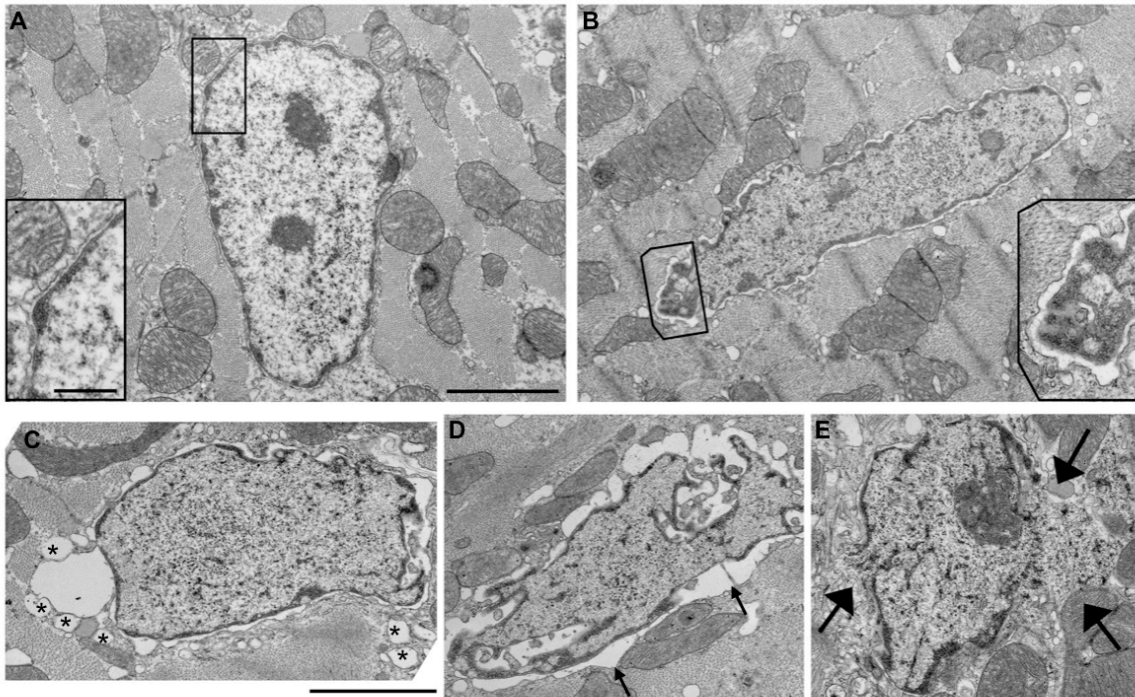


Figure 3. Ultrastructural features of myocardial nuclei in Het mice.

(A-B) 12 week-old mice Wt (A) and Het (B) mice. Insets show high magnifications of the nuclear envelope. (C-E) 26 week-old Het. Enlarged nuclear envelope and large vacuoles surrounding the nucleus (C, asterisks), widened nuclear intermembrane space (D, arrows), nuclear membrane rupture and chromatin exit (E, arrows).
Scale bar = 2 μ m and 500 nm in insets.

Figure 4.

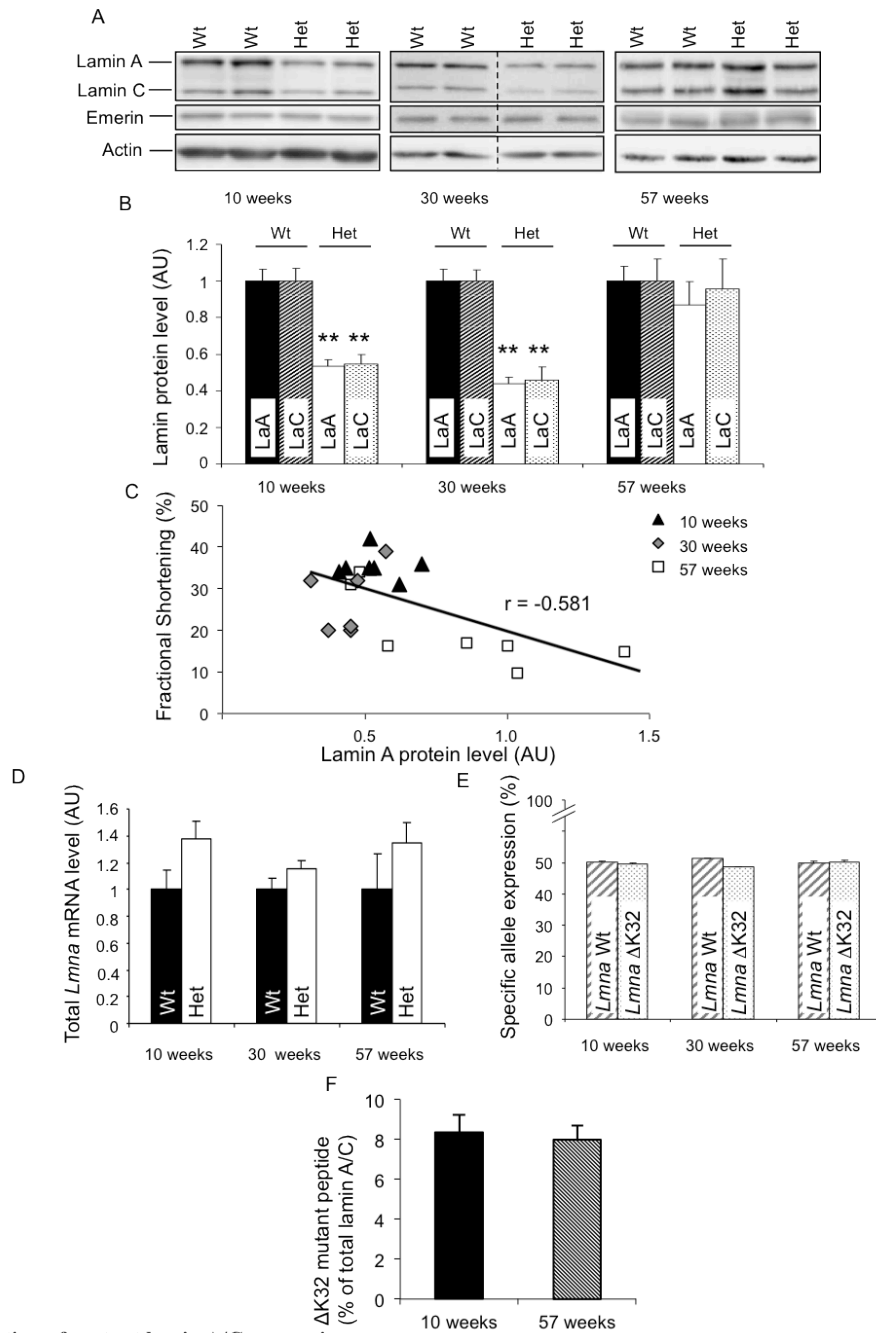


Figure 4. Evolution of mutant lamin A/C expression.

(A-B) Lamin A and C, emerlin protein level in the heart of 10, 30 and 57 week-old Het and Wt mice. Actin is used as a loading control. Representative blots (A) and quantification (B) of total lamin A (LaA) and C (LaC). (n=6 to 9 in each group). ** p<0.01. Mean±SEM. (C) Correlation between the lamin A level and % fractional shortening in Het mice at the 3 ages. (D) Level of total *Lmna* mRNA in the heart of 10, 30 and 57 week-old Het and Wt mice (n=5 to 6 in each group). *p<0.05, ** p<0.01 Mean±SEM. (E) Ratio of specific alleles level in the heart of 10, 30 and 57 week-old Het mice. Wt allele = *Lmna* Wt, mutant allele = *Lmna* ΔK32. (F) Mass spectrometry based label-free quantitation of mutant ΔK32-lamin A/C in the heart of 10 and 57 week-old Het mice (n=7 to 9 in each group at 10 and 57 weeks respectively). Mean±SEM.

Figure 5.

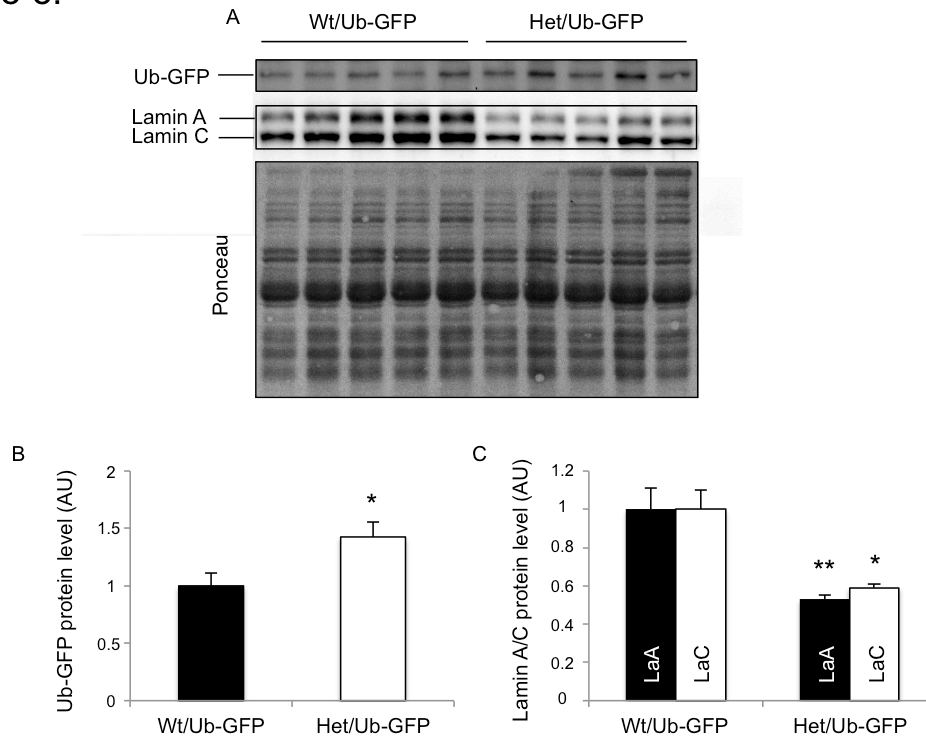


Figure 5. Global impairment of UPS in the heart of Het/Ub-GFP crossed mice.

(A) Western blots showing Ub-GFP, lamin A/C and Ponceau staining from heart of Wt/Ub-GFP and Het/Ub-GFP mice. (B, C) Quantification of Ub-GFP protein level (B), lamin A (LaA) and C (LaC) protein level (C). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ Mean \pm SEM. (n=8 Wt/Ub-GFP and 5 Het/Ub-GFP mice).

Figure 6.

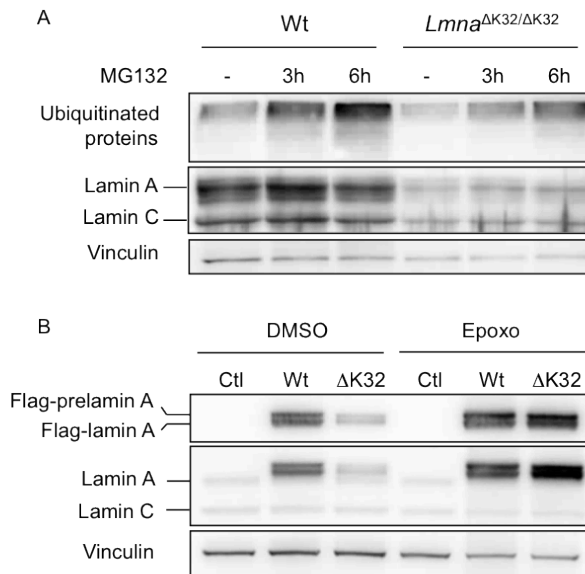


Figure 6. Effect of UPS inhibition on $\Delta K32$ -lamin A/C expression in myoblasts and neonatal mouse cardiomyocytes.

(A) Western blot showing ubiquitinated proteins and lamin A/C protein level in homozygous *Lmna* $\Delta K32/\Delta K32$ and Wt myoblasts treated or not with MG132. (B) Western blot showing Flag-prelamin A, Flag-lamin A and lamin A/C protein level in untransduced (Ctl), Flag-Wt-lamin A (Wt) or Flag- $\Delta K32$ -lamin A ($\Delta K32$) transduced NMCM treated with epoxomicin (epoxo) or not DMSO as vehicle control. Vinculin is used as loading control.

Figure 7.

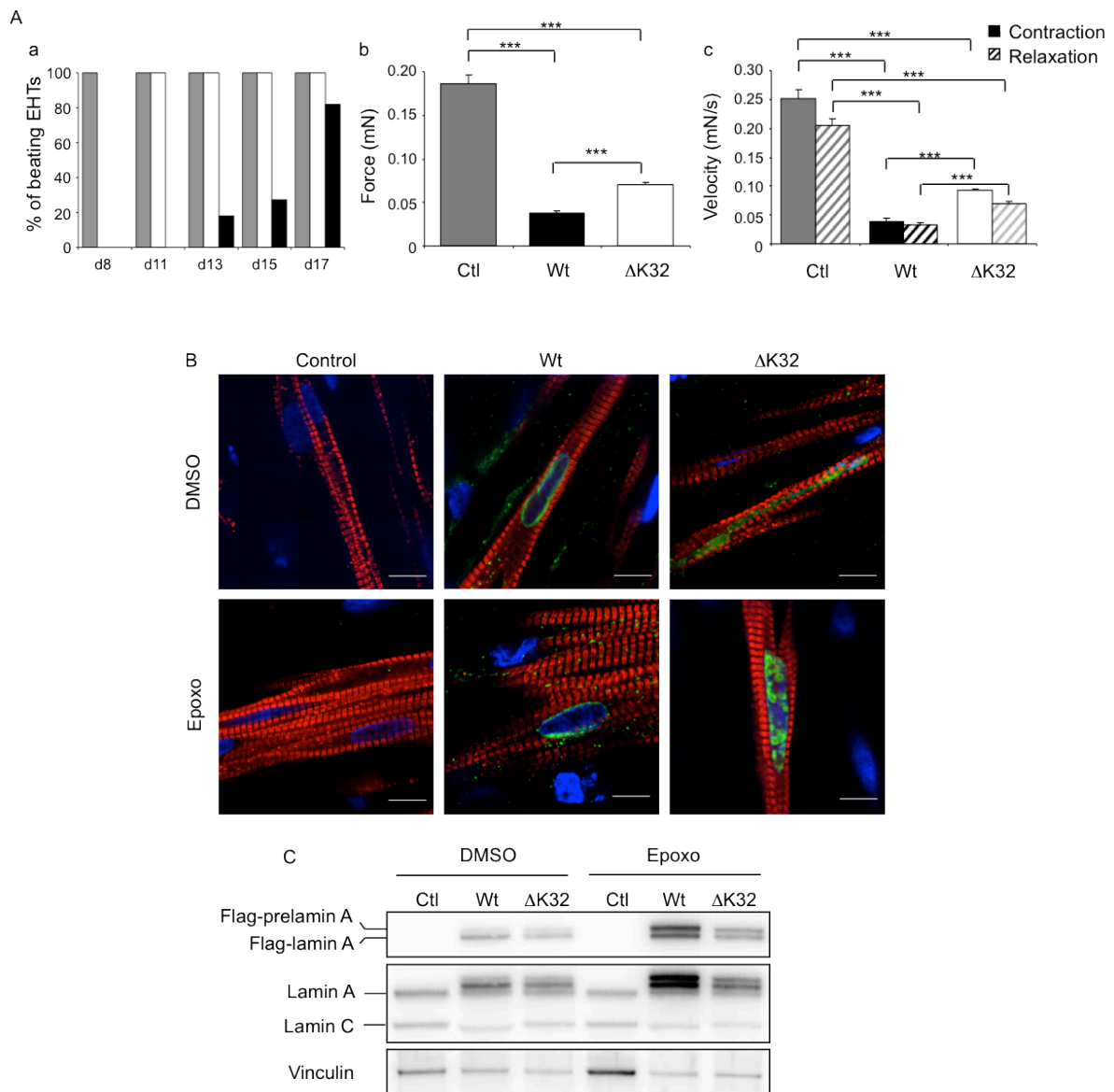


Figure 7. Effect of mutant lamin A/C overexpression on rat engineered heart tissue.

(A) Contractile properties of untransduced (Control, grey), Flag-Wt-lamin A (Wt, black) or Flag-ΔK32-lamin A (ΔK32, white) transduced EHTs. (a) proportion of beating EHTs at days 8, 11, 13, 15, 17. (b) force generated at day 17. (c) contraction/relaxation velocity at day 17. *** $p < 0.001$. Mean \pm SEM (B) Immunostaining with anti-cardiac myosin binding protein C (red), anti-Flag (green) antibodies. Nuclei are counterstained with Topro. (C) Western blot showing Flag-prelamin A, Flag-lamin A and lamin A/C protein level in Control, Wt and ΔK32 EHTs treated with epoxomicin (epoxo) or not DMSO as vehicle control. Vinculin is used as loading control.

References

1. Hershberger RE, Siegfried JD. Update 2011: clinical and genetic issues in familial dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*. 2011;57(16):1641-1649.
2. Ben Yaou R, Gueneau L, Demay L, Stora S, Chikhaoui K, Richard P, Bonne G. Heart involvement in lamin A/C related diseases. *Arch Mal Coeur Vaiss*. 2006;99(9):848-855.
3. Fatkin D, MacRae C, Sasaki T, Wolff MR, Porcu M, Frenneaux M, Atherton J, Vidaillet HJ, Jr., Spudich S, De Girolami U, Seidman JG, Seidman C, Muntoni F, Muehle G, Johnson W, McDonough B. Missense mutations in the rod domain of the lamin A/C gene as causes of dilated cardiomyopathy and conduction-system disease. *N Engl J Med*. 1999;341(23):1715-1724.
4. Worman HJ, Bonne G. "Laminopathies": a wide spectrum of human diseases. *Exp Cell Res*. 2007;313(10):2121-2133.
5. Quijano-Roy S, Mbieleu B, Bonnemann CG, Jeannot PY, Colomer J, Clarke NF, Cuisset JM, Roper H, De Meirleir L, D'Amico A, Ben Yaou R, Nascimento A, Barois A, Demay L, Bertini E, Ferreira A, Sewry CA, Romero NB, Ryan M, Muntoni F, Guicheney P, Richard P, Bonne G, Estournet B. De novo LMNA mutations cause a new form of congenital muscular dystrophy. *Ann Neurol*. 2008;64(2):177-186.
6. Bonne G, Di Barletta MR, Varnous S, Becane HM, Hammouda EH, Merlini L, Muntoni F, Greenberg CR, Gary F, Urtizberea JA, Duboc D, Fardeau M, Toniolo D, Schwartz K. Mutations in the gene encoding lamin A/C cause autosomal dominant Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Nat Genet*. 1999;21(3):285-288.
7. Lin F, Worman HJ. Structural organization of the human gene encoding nuclear lamin A and nuclear lamin C. *J Biol Chem*. 1993;268(22):16321-16326.
8. Broers JL, Ramaekers FC, Bonne G, Yaou RB, Hutchison CJ. Nuclear lamins: laminopathies and their role in premature ageing. *Physiol Rev*. 2006;86(3):967-1008.
9. Schirmer EC, Foisner R. Proteins that associate with lamins: many faces, many functions. *Exp Cell Res*. 2007;313(10):2167-2179.
10. Favreau C, Dubosclard E, Ostlund C, Vigouroux C, Capeau J, Wehnert M, Higuete D, Worman HJ, Courvalin JC, Buendia B. Expression of lamin A mutated in the carboxyl-terminal tail generates an aberrant nuclear phenotype similar to that observed in cells from patients with Dunnigan-type partial lipodystrophy and Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Exp Cell Res*. 2003;282(1):14-23.
11. Wang Y, Herron AJ, Worman HJ. Pathology and nuclear abnormalities in hearts of transgenic mice expressing M371K lamin A encoded by an LMNA mutation causing Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Hum Mol Genet*. 2006;15(16):2479-2489.
12. Nikolova V, Leimena C, McMahon AC, Tan JC, Chandar S, Jogia D, Kesteven SH, Michalick J, Otway R, Verheyen F, Rainer S, Stewart CL, Martin D, Feneley MP, Fatkin D. Defects in nuclear structure and function promote dilated cardiomyopathy in lamin A/C-deficient mice. *J Clin Invest*. 2004;113(3):357-369.
13. Wolf CM, Wang L, Alcalai R, Pizard A, Burgon PG, Ahmad F, Sherwood M, Branco DM, Wakimoto H, Fishman GI, See V, Stewart CL, Conner DA, Berul CI, Seidman CE, Seidman JG. Lamin A/C haploinsufficiency causes dilated cardiomyopathy and apoptosis-triggered cardiac conduction system disease. *J Mol Cell Cardiol*. 2008;44(2):293-303.
14. Chandar S, Yeo LS, Leimena C, Tan JC, Xiao XH, Nikolova-Krstevski V, Yasuoka Y, Gardiner-Garden M, Wu J, Kesteven S, Karlsdotter L, Natarajan S, Carlton A, Rainer S, Feneley MP, Fatkin D. Effects of mechanical stress and carvedilol in lamin A/C-deficient dilated cardiomyopathy. *Circ Res*. 2010;106(3):573-582.
15. Bertrand AT, Renou L, Papadopoulos A, Beuvin M, Lacene E, Massart C, Ottolenghi C, Decostre V, Maron S, Schlossarek S, Cattin ME, Carrier L, Malissen M, Arimura T, Bonne G. DelK32-lamin A/C has abnormal location and induces incomplete tissue maturation and severe metabolic defects leading to premature death. *Hum Mol Genet*. 2011.

16. Lindsten K, Menendez-Benito V, Masucci MG, Dantuma NP. A transgenic mouse model of the ubiquitin/proteasome system. *Nat Biotechnol.* 2003;21(8):897-902.
17. Riviere C, Danos O, Douar AM. Long-term expression and repeated administration of AAV type 1, 2 and 5 vectors in skeletal muscle of immunocompetent adult mice. *Gene Ther.* 2006;13(17):1300-1308.
18. Vignier N, Schlossarek S, Fraysse B, Mearini G, Kramer E, Pointu H, Mougnot N, Guiard J, Reimer R, Hohenberg H, Schwartz K, Vernet M, Eschenhagen T, Carrier L. Nonsense-mediated mRNA decay and ubiquitin-proteasome system regulate cardiac myosin-binding protein C mutant levels in cardiomyopathic mice. *Circ Res.* 2009;105(3):239-248.
19. Hansen A, Eder A, Bonstrup M, Flato M, Mewe M, Schaaf S, Aksehirlioglu B, Schwoerer AP, Uebeler J, Eschenhagen T. Development of a drug screening platform based on engineered heart tissue. *Circ Res.* 2010;107(1):35-44.
20. Cox J, Mann M. MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nature biotechnology.* 2008;26(12):1367-1372.
21. Lubner CA, Cox J, Lauterbach H, Fancke B, Selbach M, Tschopp J, Akira S, Wiegand M, Hochrein H, O'Keeffe M, Mann M. Quantitative proteomics reveals subset-specific viral recognition in dendritic cells. *Immunity.* 2010;32(2):279-289.
22. Rock KL, Gramm C, Rothstein L, Clark K, Stein R, Dick L, Hwang D, Goldberg AL. Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. *Cell.* 1994;78(5):761-771.
23. Becane HM, Bonne G, Varnous S, Muchir A, Ortega V, Hammouda EH, Urtizberea JA, Lavergne T, Fardeau M, Eymard B, Weber S, Schwartz K, Duboc D. High incidence of sudden death with conduction system and myocardial disease due to lamins A and C gene mutation. *Pacing Clin Electrophysiol.* 2000;23(11 Pt 1):1661-1666.
24. van Tintelen JP, Tio RA, Kerstjens-Frederikse WS, van Berlo JH, Boven LG, Suurmeijer AJ, White SJ, den Dunnen JT, te Meerman GJ, Vos YJ, van der Hout AH, Osinga J, van den Berg MP, van Veldhuisen DJ, Buys CH, Hofstra RM, Pinto YM. Severe myocardial fibrosis caused by a deletion of the 5' end of the lamin A/C gene. *J Am Coll Cardiol.* 2007;49(25):2430-2439.
25. Pasotti M, Klersy C, Pilotto A, Marziliano N, Rapezzi C, Serio A, Mannarino S, Gambarin F, Favalli V, Grasso M, Agozzino M, Campana C, Gavazzi A, Febo O, Marini M, Landolina M, Mortara A, Piccolo G, Viganò M, Tavazzi L, Arbustini E. Long-term outcome and risk stratification in dilated cardiomyopathies. *J Am Coll Cardiol.* 2008;52(15):1250-1260.
26. Gupta P, Bilinska ZT, Sylvius N, Boudreau E, Veinot JP, Labib S, Bolongo PM, Hamza A, Jackson T, Ploski R, Walski M, Grzybowski J, Walczak E, Religa G, Fidzianska A, Tesson F. Genetic and ultrastructural studies in dilated cardiomyopathy patients: a large deletion in the lamin A/C gene is associated with cardiomyocyte nuclear envelope disruption. *Basic Res Cardiol.* 2010;105(3):365-377.
27. Bank EM, Ben-Harush K, Wiesel-Motiuk N, Barkan R, Feinstein N, Lotan O, Medalia O, Gruenbaum Y. A laminopathic mutation disrupting lamin filament assembly causes disease-like phenotypes in *Caenorhabditis elegans*. *Mol Biol Cell.* 2011;22(15):2716-2728.
28. Schlossarek S, Carrier L. The ubiquitin-proteasome system in cardiomyopathies. *Current opinion in cardiology.* 2011;26(3):190-195.
29. Vicart P, Caron A, Guicheney P, Li Z, Prevost MC, Faure A, Chateau D, Chapon F, Tome F, Dupret JM, Paulin D, Fardeau M. A missense mutation in the alphaB-crystallin chaperone gene causes a desmin-related myopathy. *Nat Genet.* 1998;20(1):92-95.
30. Richard P, Charron P, Carrier L, Ledeuil C, Cheav T, Pichereau C, Benaiche A, Isnard R, Dubourg O, Burban M, Gueffet JP, Millaire A, Desnos M, Schwartz K, Hainque B, Komajda M. Hypertrophic cardiomyopathy: distribution of disease genes, spectrum of mutations, and implications for a molecular diagnosis strategy. *Circulation.* 2003;107(17):2227-2232.

31. Liu J, Chen Q, Huang W, Horak KM, Zheng H, Mestril R, Wang X. Impairment of the ubiquitin-proteasome system in desminopathy mouse hearts. *FASEB J.* 2006;20(2):362-364.
32. Sanbe A, Osinska H, Saffitz JE, Glabe CG, Kaye R, Maloyan A, Robbins J. Desmin-related cardiomyopathy in transgenic mice: a cardiac amyloidosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(27):10132-10136.
33. Ludwig H, Khayat D, Giaccone G, Facon T. Proteasome inhibition and its clinical prospects in the treatment of hematologic and solid malignancies. *Cancer.* 2005;104(9):1794-1807.
34. Hacıhanefioglu A, Tarkun P, Gonullu E. Acute severe cardiac failure in a myeloma patient due to proteasome inhibitor bortezomib. *Int J Hematol.* 2008;88(2):219-222.
35. Kandert S, Wehnert M, Muller CR, Buendia B, Dabauvalle MC. Impaired nuclear functions lead to increased senescence and inefficient differentiation in human myoblasts with a dominant p.R545C mutation in the LMNA gene. *Eur J Cell Biol.* 2009;88(10):593-608.
36. Eble DM, Spragia ML, Ferguson AG, Samarel AM. Sarcomeric myosin heavy chain is degraded by the proteasome. *Cell Tissue Res.* 1999;296(3):541-548.
37. Shenoy SK, McDonald PH, Kohout TA, Lefkowitz RJ. Regulation of receptor fate by ubiquitination of activated beta 2-adrenergic receptor and beta-arrestin. *Science.* 2001;294(5545):1307-1313.
38. Penela P, Ruiz-Gomez A, Castano JG, Mayor F, Jr. Degradation of the G protein-coupled receptor kinase 2 by the proteasome pathway. *J Biol Chem.* 1998;273(52):35238-35244.
39. Skaug B, Jiang X, Chen ZJ. The role of ubiquitin in NF-kappaB regulatory pathways. *Annu Rev Biochem.* 2009;78:769-796.
40. Aberle H, Bauer A, Stappert J, Kispert A, Kemler R. beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *EMBO J.* 1997;16(13):3797-3804.
41. Birks EJ, Latif N, Enesa K, Folkvang T, Luong le A, Sarathchandra P, Khan M, O'Vaah H, Terracciano CM, Barton PJ, Yacoub MH, Evans PC. Elevated p53 expression is associated with dysregulation of the ubiquitin-proteasome system in dilated cardiomyopathy. *Cardiovasc Res.* 2008;79(3):472-480.

SUPPLEMENTAL MATERIAL

	10 weeks		30 - 40 weeks		50 - 60 weeks	
	Wt (13)	Het (14)	Wt (7)	Het (7)	Wt (7)	Het (7)
BW (g)	25.3 ± 3.2	23.9 ± 2.1	33.4 ± 4.5	30.5 ± 2.0 *	41.1 ± 5.4	29.5 ± 3.0 **
IVSd (mm)	0.67 ± 0.16	0.65 ± 0.13	0.44 ± 0.10	0.45 ± 0.06	0.44 ± 0.10	0.43 ± 0.08
PWd (mm)	0.83 ± 0.18	0.80 ± 0.17	0.49 ± 0.18	0.47 ± 0.12	0.49 ± 0.22	0.43 ± 0.09
LVEDD (mm)	3.61 ± 0.29	3.44 ± 0.29	3.63 ± 0.48	4.20 ± 0.43 **	3.55 ± 0.43	4.33 ± 0.49 **
IVSs (mm)	1.06 ± 0.22	1.10 ± 0.19	0.93 ± 0.17	0.78 ± 0.11 **	0.89 ± 0.07	0.70 ± 0.10 **
PWs (mm)	1.22 ± 0.14	1.19 ± 0.20	1.10 ± 0.20	0.91 ± 0.14 **	1.15 ± 0.20	0.84 ± 0.21 **
LVEDS (mm)	2.10 ± 0.35	1.95 ± 0.30	2.24 ± 0.48	3.09 ± 0.64 **	2.18 ± 0.40	3.45 ± 0.72 **
LVM/BW (mg/g)	3.70 ± 1.02	3.41 ± 0.89	1.55 ± 0.71	2.13 ± 0.75 *	1.22 ± 0.63	2.31 ± 0.98 *
FS (%)	41.7 ± 7.0	43.5 ± 6.5	38.7 ± 6.8	26.9 ± 7.2 **	38.9 ± 5	20.9 ± 9 **
HR (bpm)	458 ± 56	479 ± 50	530 ± 38	525 ± 41	526 ± 40	559 ± 86

Supplemental table 1. Echocardiographic parameters of Wt and Het male mice at 10, 30-40, 50-60 weeks of age.

(number of animals). BW: body weight, IVSd: Interventricular septum thickness in diastole, PWD: Posterior wall thickness in diastole, LVED D: Left ventricular end-diastolic diameter, IVSs: Interventricular septum thickness in systole, PWS: Posterior wall thickness in systole, LVES D: Left ventricular end-systolic diameter, LVM: Left ventricular mass, FS: Fractional shortening, HR: Heart rate. **p<0.01 compared to age-matched Wt, Student t-test. Mean ± SD. Additional animals were added in the follow-up because death at some time points.

	10 weeks		30 - 40 weeks		50 - 60 weeks		70 - 80 weeks	
	Wt (7)	Het (8)	Wt (6)	Het (6)	Wt (7)	Het (7)	Wt (5)	Het (5)
BW (g)	20.2 ± 1.4	18.6 ± 1.4 *	25.5 ± 1.9	23.8 ± 2.2 *	28.8 ± 3.0	26.3 ± 2.1 **	31.1 ± 2.4	25.2 ± 4.5 **
IVSd (mm)	0.57 ± 0.13	0.60 ± 0.11	0.43 ± 0.09	0.42 ± 0.08	0.40 ± 0.04	0.38 ± 0.08	0.45 ± 0.11	0.44 ± 0.08
PWd (mm)	0.73 ± 0.16	0.78 ± 0.15	0.49 ± 0.20	0.48 ± 0.14	0.39 ± 0.07	0.38 ± 0.06	0.49 ± 0.19	0.47 ± 0.21
LVEDD (mm)	3.16 ± 0.27	3.18 ± 0.21	3.37 ± 0.41	3.33 ± 0.36	3.22 ± 0.33	3.54 ± 0.58	3.29 ± 0.28	4.19 ± 0.50 **
IVSs (mm)	0.99 ± 0.20	0.95 ± 0.18	0.88 ± 0.13	0.77 ± 0.11 **	0.83 ± 0.09	0.66 ± 0.13 **	0.93 ± 0.17	0.68 ± 0.21 *
PWs (mm)	1.07 ± 0.15	1.08 ± 0.22	0.97 ± 0.16	0.94 ± 0.12	1.02 ± 0.12	0.82 ± 0.14 **	1.06 ± 0.24	0.84 ± 0.28
LVEDS (mm)	1.77 ± 0.39	1.86 ± 0.27	2.03 ± 0.40	2.11 ± 0.43	1.76 ± 0.34	2.49 ± 0.59 **	1.93 ± 0.24	3.35 ± 0.71 **
LVM/BW (mg/g)	2.97 ± 0.55	3.56 ± 0.86	1.69 ± 0.69	1.77 ± 0.67	1.18 ± 0.39	1.47 ± 0.60	1.14 ± 0.41	2.30 ± 1.36 *
FS (%)	44.4 ± 8.1	41.6 ± 6.7	39.9 ± 7.3	37.1 ± 8.2	45.6 ± 7.5	30.2 ± 7.9 **	41.3 ± 4.7	20.8 ± 9.6 **
HR (bpm)	450 ± 43	462 ± 64	505 ± 49	513 ± 62	541 ± 38	541 ± 47	542 ± 68	507 ± 75

Supplemental table 2. Echocardiographic parameters of Wt and Het female mice at 10, 30-40, 50-60, 70-80 weeks of age.

(number of animals). BW: body weight, IVSd: Interventricular septum thickness in diastole, PWd: Posterior wall thickness in diastole, LVED D: Left ventricular end-diastolic diameter, IVSs: Interventricular septum thickness in systole, PWS: Posterior wall thickness in systole, LVES D: Left ventricular end-systolic diameter, LVM: Left ventricular mass, FS: Fractional shortening, HR: Heart rate. *p<0.05 and **p<0.01 compared to age-matched Wt, Student t-test. Mean ± SD. Additional animals were added in the follow-up because death at some time points.

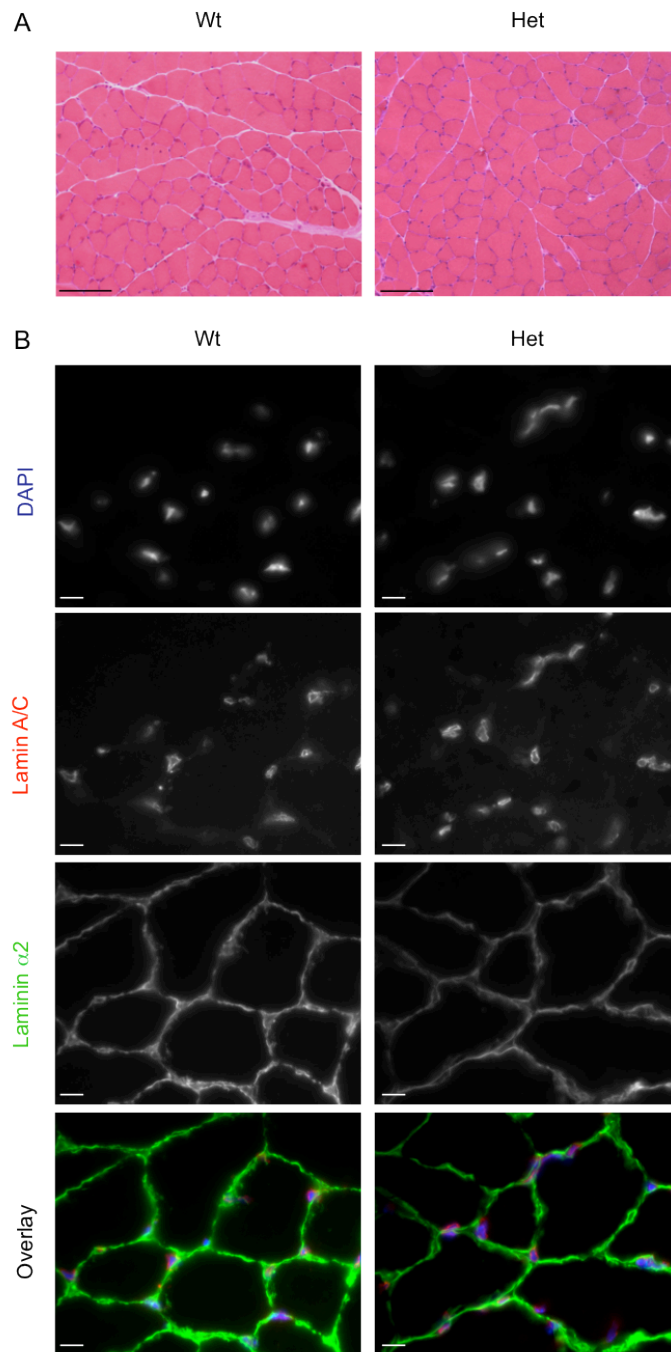
Supplemental table 3. Skeletal muscle contractile properties in 57 week-old Wt and Het mice. (number of animals). Iso N: specific maximal force during tetanic stimulation; TTP: time to peak measured during twitch stimulation; HRT: half-relaxation time measured during twitch stimulation. Mean \pm SD.

		Wt	Het
Spontaneous activity test (13)			
Active time (% test duration)		79.2 \pm 10.7	70.0 \pm 22.4
EDL (7-8)	Muscle weight (mg)	12.1 \pm 0.7	11.4 \pm 1.5
	Iso N (N/mg)	135 \pm 31	131 \pm 41
	TTP (ms)	21.7 \pm 3.0	23.1 \pm 4.4
	HRT (ms)	21.9 \pm 4.0	22.1 \pm 4.0
Soleus (7-8)	Muscle weight (mg)	8.7 \pm 1.7	7.8 \pm 1.1
	Iso N (N/mg)	137 \pm 41	129 \pm 34
	TTP (ms)	46.7 \pm 7.8	46.1 \pm 13.1
	HRT (ms)	53.0 \pm 17.0	74.1 \pm 36.8
Diaphragm (7-8)	Muscle weight (mg)	6.3 \pm 1.3	5.6 \pm 1.6
	Iso N (N/mg)	97 \pm 29	114 \pm 33
	TTP (ms)	44.0 \pm 8.0	44.0 \pm 8.1
	HRT (ms)	42.9 \pm 15.6	52.3 \pm 14.3

Supplemental table 4. Oligonucleotides sequences for qPCR analysis.

cDNA target	Oligonucleotide	Sequence (5' - 3')
<i>Nppa</i>	For	AGCTTCCACCGAAGATAAC
	Rev	TCGTGATAGATGAAGGCAG
<i>Nppb</i>	For	GTCAGTCGTTTGGGCTGTAAC
	Rev	AGACCCAGGCAGAGTCAGAA
<i>Myh7</i>	For	GACCAGACCCCAGGCAAGGG
	Rev	GCCAACTTTCCTGTTGCCCC
<i>Rplp0</i>	For	CTCCAAGCAGATGCAGCAGA
	Rev	ATAGCCTTGCGCATCATGGT
<i>Lmna</i>	For	GCCAGCTCTACCCCACTGT
	Rev	CAGACTCAGTGATGCGAAGG
<i>Lmna Wt</i>	hydrolysis probe	TGCAGGAGAAGGAGGACCTGC
<i>Lmna ΔK32</i>	hydrolysis probe	CTGCAGGAGGAGGACCTGCAGG

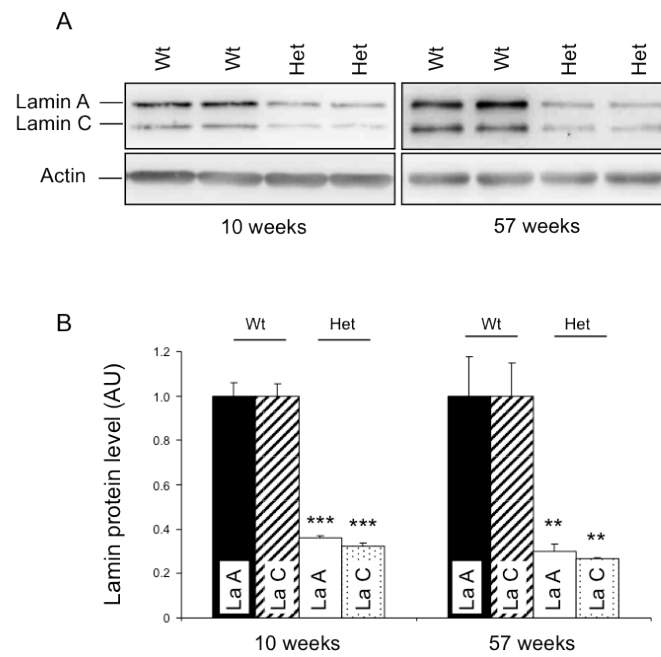
Supplemental Figure 1.



Supplemental Figure 1. Skeletal muscle phenotype of Het mice.

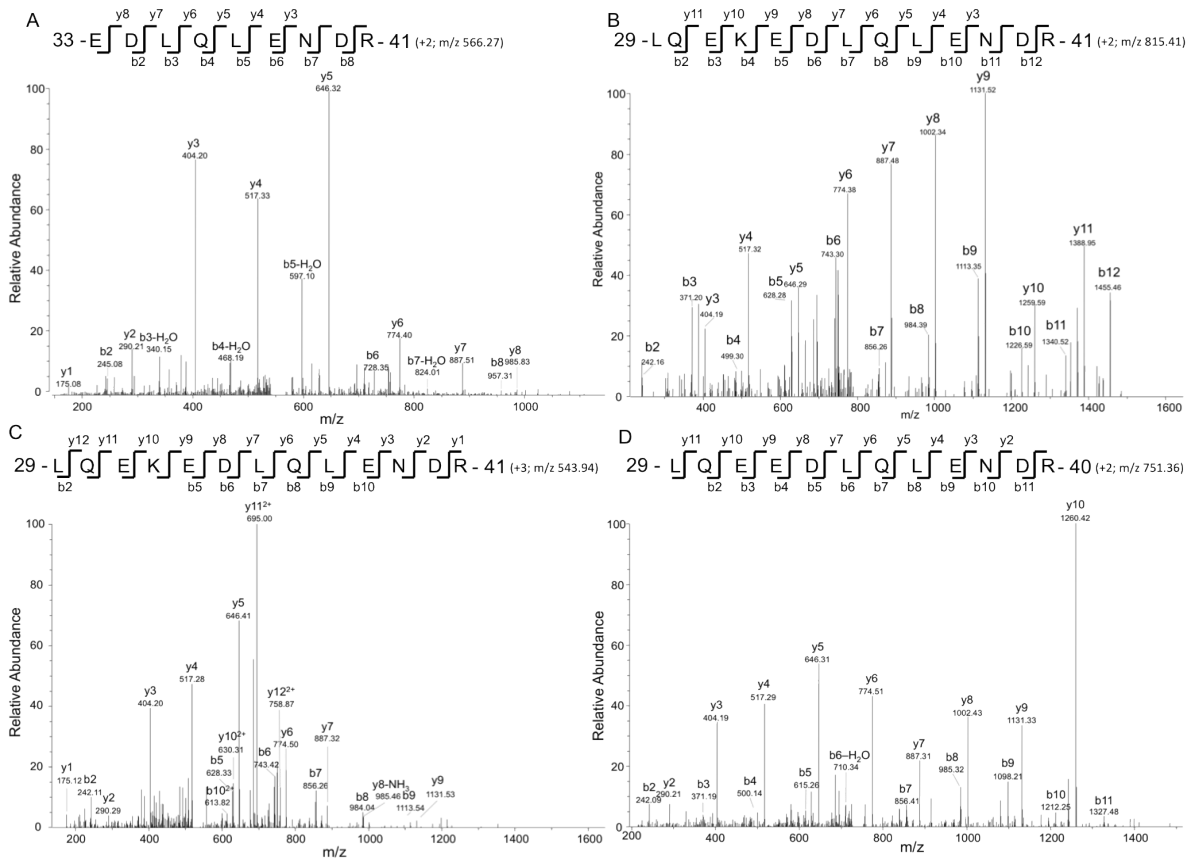
(A) *Gastrocnemius* cross-section from 57 week-old Het and Wt mice, stained with Hematoxylin/Eosin and showing similar structure, peripheral nuclei localization and fiber size in Het compared to Wt mice. Cytoplasm is colored in pink, nuclei are colored in purple. Scale bar = 100 μ m. (B) *Gastrocnemius* cross-section from 57 week-old Het and Wt mice, immunolabeled with anti-laminin A/C antibody (red) and anti-laminin- α 2 antibody (green), showing similar nuclear rim of laminin A/C in Het compared to Wt mice. Nuclei are counterstained in blue with DAPI. Scale bar = 10 μ m.

Supplemental Figure 2.



Supplemental Figure 2. Evolution of lamin A/C level in *gastrocnemius* muscle of Het mice.

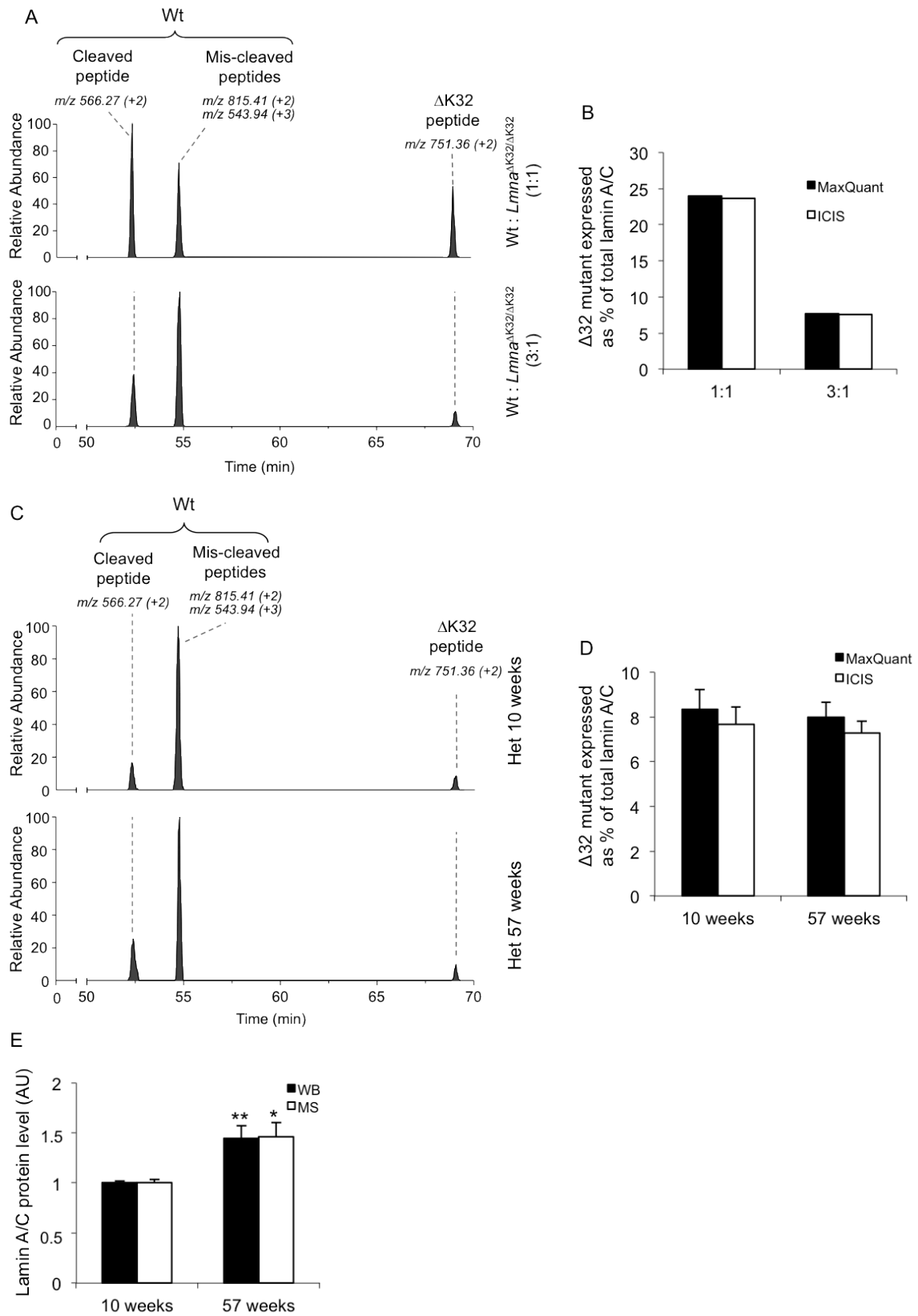
(A-B) Lamin A and C protein level in the heart of 10 and 57 week-old Het and Wt mice (n=4 in each group). Actin is used as a loading control. Blots (A), quantification (B) of total lamin A (La A) and total lamin C (La C). ** p<0.01, ***p<0.001. Mean \pm SEM.



Supplemental Figure 3. MS/MS Spectra of the unique peptides used for label-free quantitation of mutant lamin A/C ΔK32 versus Wt lamin A/C.

Wt and mutant lamin A/C differ only by the deletion of a single amino acid: a Lysine at position 32 (K32). The challenge was to identify and quantify, after trypsin digestion, the resulting unique peptides from the two forms of lamin A/C. In the Wt lamin A/C, trypsin cleaved at C-terminal to K32, hence resulting in two peptides: i) $^{29}\text{LQEK}^{32}$, not observed by mass spectrometry due to its small size; and ii) $^{33}\text{EDLQELNDR}^{41}$ (Spectrum illustrated in A). In addition, a mis-cleaved version where trypsin did not cleave at C-terminal to K32 was also observed: $^{29}\text{LQEKEDLQELNDR}^{41}$ with 2 different charged states (B and C, respectively). The deletion of K32 in lamin A/C (ΔK32) prevents the cleavage by trypsin: therefore, only one single peptide is observed $^{29}\text{LQEKEDLQELNDR}^{41}$ (D).

Supplemental Figure 4.



Supplemental Figure 4. Mass spectrometry-based label-free quantitation of Wt and mutant Δ K32 lamin A/C.

(A-B) Validation of label-free quantitation of Δ K32 versus Wt lamin A/C based on their unique peptides: Protein extracts from heart samples of Wt and homozygote *Lmna* ^{Δ K32/ Δ K32} mice were mixed in 2 different proportions: (1:1) and (3:1) and analyzed by LC-MS/MS. Wt cleaved (³³EDLQELNDR⁴¹) and mis-cleaved peptides (²⁹LQEKEDLQELNDR⁴¹) as well as the mutant peptide ²⁹LQEEDLQELNDR⁴¹, all had distinct retention times making unambiguous identification and quantitation possible. (A) Representative extracted ion-chromatograms of Wt and Δ K32 peptides in Wt : *Lmna* ^{Δ K32/ Δ K32} (1:1) & (3:1) mix. We recently showed that the level of lamin A/C protein in *Lmna* ^{Δ K32/ Δ K32} mice was 80% lower compared to Wt mice.² Therefore, we expected that the level of mutant protein in the (1:1) mix would be ~20% of the total lamin whereas in the (3:1) mix ~ 7%. The relative expression of mutant lamin A/C Δ K32 was calculated using the following formula: $SI_{\Delta K32 \text{ peptide}} / (SI_{\Delta K32 \text{ peptide}} + SI_{Wt \text{ mis-cleaved peptides}} + SI_{Wt \text{ cleaved peptides}})$. SI = Signal Intensity. We utilized two different algorithms to confirm our label-free quantitation approach: i) MaxQuant's intensity-based label-free quantification^{5,6} and ii) integration of peptide extracted ion-chromatograms using the ICIS integration algorithms in the Qual browser program (Thermo Fisher Scientific).⁷

(C-D) Mass spectrometry based label-free quantitation of mutant Δ K32-lamin A/C in the heart of 10 and 57 week-old Het mice. (C) Representative extracted ion-chromatograms of Wt and Δ K32 peptides in 10 and 57 week-old Het mice. (D) Comparison of two label-free quantitation methods MaxQuant and ICIS (n=7 to 9 in each group at 10 and 57 weeks respectively). Mean \pm SEM. (E) Comparative quantification of lamin A/C protein level in the heart of 10 and 57 week-old Het mice by Western blot and label-free quantitative mass spectrometry (n=7 to 8 in each group at 10 and 57 weeks respectively). Lamin immunoblots were normalized to the expression of actin (Fig. 3A). Label-free quantitation was performed in MaxQuant where total peptide signals were determined in the mass-to-charge, elution time and intensity space. The peptide signals for lamin A/C were then normalized to the total peptide signal for each individual sample.

** p<0.01, * p< 0.05. Mean \pm SEM.

Supplemental Materials and Methods

Cardiac function measurement

Transthoracic echocardiography was performed at room temperature using an echocardiography-Doppler (General Electric Medical systems Co, Vivid 7 Dimension/Vivid 7 PRO) with a probe emitting ultrasounds with 9-14 MHz frequency. Mice were slightly anesthetized with 0.5–1% isoflurane in 100% O₂. The two-dimensionally guided Time Motion mode recording of the left ventricle (LV) provided the following measurements: interventricular septal wall thickness in diastole (IVSd), posterior wall thickness in diastole (PWd), LV end-diastolic (LVEDD) and LV end-systolic (LVESD) diameters. Each set of measurements were obtained from a same cardiac cycle. At least three sets of measures were obtained from three different cardiac cycles. LV mass (LVM) and percentage of LV Fractional Shortening (%) were calculated as follows: $[(IVSd + PWd + EDD)^3 - EDD^3] \times 1.055$,¹ and $(LVEDD - LVESD)/LVEDD \times 100$, respectively.

Electrocardiographs (ECG) were performed in conscious mice. Mice were placed in cages in a way that each limb contacted a receiver for transmission of ECG signals. ECG traces were recorded during 20 min and analysed with ECG Auto software (EMKA). QRS duration, RR and PR intervals were measured.

Histology and immunochemical analysis

Fresh heart samples were snap frozen in liquid-nitrogen-cooled isopentane, and stored at -80°C until further processing. Frozen sections (8 µm) of transversal cardiac muscle were stained with Sirius red for fibrosis visualization. Sections were analyzed by light microscopy.

For immunohistochemical analysis, tissue sections were fixed for 10 min in 100% acetone at -20°C and incubated for 30 min with blocking solution (5% bovine serum albumin IgG-free in PBS) at room temperature. For detection of lamin A/C and lamin B, primary rabbit anti-lamin A/C polyclonal Antibody (Ab) (1:100, Santa Cruz) and primary goat anti-lamin B polyclonal Ab (1:100, Santa Cruz) were diluted in 5% bovine serum albumin IgG-free in PBS and sections were incubated for 90 min at room temperature. Sections were washed three times with PBS and incubated with secondary Ab (1:500, Alexa fluor 488 chicken anti-rabbit IgG and Alexa fluor 568 donkey anti-goat IgG) for 30 min at room temperature. Cardiac sections were mounted with mounting medium (Vectashield) with 40,6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI) and images were collected with a Carl Zeiss Axiophot1 fluorescence microscope.

For immunofluorescence analysis of EHTs, the entire EHTs were analysed using confocal imaging. EHTs were rinsed with PBS and fixed with Histofix® (Roth) overnight at 4°C. The samples were then removed from the silicon post and treated 24 h with blocking solution (TBS 0.05 M, pH 7.4, 10% FCS, 1% BSA, 0.5% Triton X-100) at 4°C. Immunofluorescence was performed with mouse anti-FLAG monoclonal Ab (1:250,

Sigma Aldrich) and cMyBPC (1:500, gift of W. Linke) and Alexa-fluor 488 anti-mouse and Alexa-fluor 546 anti-rabbit secondary Ab (1:600, Invitrogen). Nuclei were stained with Topro (1:1000). Incubation was 24 h for first and secondary antibody, respectively. Finally, the EHTs were fixed between a cover slip and a glass slide, and the fluorescence signal was analyzed using a Carl Zeiss confocal microscope (Zeiss LSM 510 META).

Electron microscopy

The ultrastructure of the myocardium of 12 mice was analysed: 6 Het and 6 WT siblings (4 at 12 weeks, 2 at 35 weeks, 2 at 51 weeks, and 4 at 67 weeks of age). Freshly harvested left ventricle apex was cut in small pieces and immediately fixed by immersion in 2.5% glutaraldehyde diluted in saline phosphate buffer (PBS) during 1 hour at room temperature. After abundant washing in PBS, samples were post-fixed with 2% OsO₄, dehydrated in a graded series of acetone including a 2% uranyl acetate in 70% acetone step, and finally embedded in epoxy resin. Ultrathin sections were stained with uranyl acetate and lead citrate, examined using a CM120 Philips transmission electron microscope and photographed with a digital SIS Morada camera, using iTEM software.

mRNA analysis

Hearts were dissected and rapidly frozen in liquid-nitrogen. Total RNA extraction and Q-PCR were performed as previously described.² Individual expression values were normalized by comparison with *Rplp0* mRNA, encoding ribosomal protein large P0. The sequences of oligonucleotides used for Q-PCR analysis are listed into supplemental table 4. *Lmna* expression level was measured using oligonucleotides matching with a common region of Wt and mutant on the cDNA. *Lmna* Wt and $\Delta K32$ expression level, encoding Wt and mutant lamin A/C protein respectively, were measured using hydrolysis probe

technique. Hydrolysis probes were designed to match specifically with Wt or deleted nucleotide region of *Lmna* cDNA with LightCycler 480 Probes Master kit (Roche Diagnostic).

Protein analysis

For western blot analyses, proteins were extracted from frozen tissues as previously described.² Total proteins were separated by SDS-PAGE and hybridized with primary rabbit anti-lamin A/C polyclonal Ab (1:2000, Santa Cruz), primary rabbit anti-emerin polyclonal Ab (1:1000, kindly provided by G.E. Morris, NEWI, UK), primary rabbit anti-actin polyclonal Ab (1:1000, Sigma Aldrich), mouse anti-ubiquitinated monoclonal Ab (1:5000, Enzo Lifesciences), rabbit anti-chymotrypsin-like subunit polyclonal Ab (1:5000, kindly given by Xuejun Wang, Vermillion, USA), mouse anti-FLAG-M2 monoclonal Ab (1:1000, Sigma Aldrich), mouse anti-vinculin monoclonal Ab (1:1000, Sigma Aldrich) or rabbit anti-GFP polyclonal Ab (1:1000, AbCam) and with secondary rabbit anti-mouse (for monoclonal Ab) or goat anti-rabbit (for polyclonal Ab) IgG HRP-conjugated Ab (1:2000, Dako A/S). Recognized proteins were visualized by enhanced chemiluminescence (Pierce or Millipore). Hybridization signals were quantified using MultiGauge software and normalized to actin, vinculin or Ponceau staining.

LC-MS/MS analysis

The gel lanes containing the lamin A and lamin C proteins were cut out and digested separately using in-gel tryptic digestion as previously described.³ Briefly, the gel bands were shrunk using acetonitrile, in-gel reduced and alkylated followed by saturation of the gel pieces with trypsin. Digestion was performed overnight at 37°C. The resulting peptides were desalted using in-house made StageTips as previously described⁴ and analyzed by a nanoLC-MS/MS system (LTQ-Orbitrap XL, Thermo Fisher Scientific). The peptides were eluted from an in-house packed fused-silica (length: 20 cm; i.d. 75 µm)

reversed-phase column (3 μm C18, ReproSil-Pur C18 AQ, Dr. Maisch, Germany) using an 80% acetonitrile (ACN), 0.5% acetic acid gradient, starting with 2% ACN and ending with 80% ACN. The MS full scans were detected in the Orbitrap, with MS/MS scans being detected in the LTQ iontrap. The peptides were identified by searching tandem MS spectra using the Mascot search engine (Matrix Science) against a custom-made mouse database, containing the sequence of the ΔK32 variant (Uniprot release 2011_01, restricted to UniProtKB/Swiss-Prot and Taxonomy: *mus musculus* (mouse) (49954 sequences)). The label-free quantification was performed using two different approaches: i) MaxQuant's intensity-based label-free quantification where total peptide signals were determined in the mass-to-charge, elution time and intensity space^{5,6} and ii) integration of peptide extracted ion-chromatograms using the ICIS integration algorithms in the Qual browser program (Thermo Fisher Scientific).⁷ Details and validation of the label free quantitation approach is provided in Supplemental Figure 4A and 4B.

Skeletal muscle analysis

Spontaneous activity and immunostaining were performed as previously described.⁸ For measurement of isometric contractile properties of muscles, after removal, muscles were soaked in an oxygenated Krebs solution (95% O_2 and 5% CO_2) containing 58.5 mM NaCl, 24 mM NaHCO_3 , 5.4 mM KCl, 1.2 mM KH_2PO_4 , 1.8 mM CaCl_2 , 1 mM MgSO_4 , and 10 mM glucose, pH 7.4, and maintained at a temperature of 22°C. One of the muscle tendons was attached to a lever arm of a servomotor system (300B Dual-Mode Lever; Aurora Scientific). After equilibration (30 min), electrical stimulation was delivered through electrodes running parallel to the muscle. 1 ms pulses were generated by a high power stimulator (701B; Aurora Scientific). P_0 was measured at L_0 during isometric contractions in response to electrical stimulation (frequency of 50–125 Hz; train of

stimulation of 1500 ms). Time to peak and time to half relaxation were recorded. Muscles were weighted and the specific force IsoN was calculated by dividing P_0 by muscle weigh.

Supplemental references

1. Tanaka N, Dalton N, Mao L, Rockman HA, Peterson KL, Gottshall KR, Hunter JJ, Chien KR, Ross J, Jr. Transthoracic echocardiography in models of cardiac disease in the mouse. *Circulation*. 1996;94:1109-1117
2. Bertrand AT, Renou L, Papadopoulos A, Beuvin M, Lacene E, Massart C, Ottolenghi C, Decostre V, Maron S, Schlossarek S, Cattin ME, Carrier L, Malissen M, Arimura T, Bonne G. Delk32-lamin A/C has abnormal location and induces incomplete tissue maturation and severe metabolic defects leading to premature death. *Hum Mol Genet*. 2011
3. Shevchenko A, Tomas H, Havlis J, Olsen JV, Mann M. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nat Protoc*. 2006;1:2856-2860
4. Rappsilber J, Mann M, Ishihama Y. Protocol for micro-purification, enrichment, pre-fractionation and storage of peptides for proteomics using stagetips. *Nat Protoc*. 2007;2:1896-1906
5. Cox J, Mann M. Maxquant enables high peptide identification rates, individualized p.P.B.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nature biotechnology*. 2008;26:1367-1372
6. Lubber CA, Cox J, Lauterbach H, Fancke B, Selbach M, Tschopp J, Akira S, Wiegand M, Hochrein H, O'Keeffe M, Mann M. Quantitative proteomics reveals subset-specific viral recognition in dendritic cells. *Immunity*. 2010;32:279-289
7. Hansen J, Corydon TJ, Palmfeldt J, Durr A, Fontaine B, Nielsen MN, Christensen JH, Gregersen N, Bross P. Decreased expression of the mitochondrial matrix proteases lon and clpp in cells from a patient with hereditary spastic paraplegia (spg13). *Neuroscience*. 2008;153:474-482
8. Arimura T, Helbling-Leclerc A, Massart C, Varnous S, Niel F, Lacene E, Fromes Y, Toussaint M, Mura AM, Keller DI, Amthor H, Isnard R, Malissen M, Schwartz K, Bonne G. Mouse model carrying h222p-lmna mutation develops muscular dystrophy and dilated cardiomyopathy similar to human striated muscle laminopathies. *Hum Mol Genet*. 2005;14:155-169

Résultats supplémentaires Partie I

Etude du complexe LINC dans le cœur des animaux Het et Wt.

L'observation du myocarde en microscopie électronique a montré que l'espace intermembranaire nucléaire est très élargi chez les souris Het et que ce défaut s'aggrave avec l'âge des animaux (Figure 3 du manuscrit). Ceci pourrait indiquer une déstabilisation du complexe LINC, constitué par l'interaction au niveau de la lumière du domaine KASH des protéines Nesprine et du domaine carboxy-terminal des protéines SUN (Padmakumar et al, 2005). Pour évaluer cette hypothèse, j'ai réalisé des immunomarquages avec des anticorps reconnaissant spécifiquement les protéines Nesprine 1, SUN1 et SUN2 sur des coupes de cœur de souris Wt et Het âgées de 10, 30 et 57 semaines (Figure 15). Les résultats de cette analyse indiquent que les protéines Nesprine 1, SUN1 et SUN2 sont correctement localisées au niveau de l'enveloppe nucléaire. L'observation au microscope confocal n'a pas mis en évidence une modification évidente de la colocalisation de ces protéines dans le cœur des souris Het comparées aux souris Wt. Une analyse plus fine en microscopie électronique avec des anticorps reconnaissant ces protéines et couplés à des billes d'or, par exemple, permettrait sans doute d'affiner ce résultat. Pour aller plus loin, il serait intéressant d'étudier les interactions des protéines du complexe LINC dans les cellules exprimant des lamines $\Delta K32$ dans un contexte de stress mécanique. Ceci pourrait être réalisé par la technique de FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer ou Fluorescence par transfert d'énergie). Cette technique utilise deux fluorochromes couplé à des protéines d'intérêt, un fluorochrome donneur qui va transmettre son énergie à un autre fluorochrome accepteur, émettant dans une longueur d'onde connue. Le FRET permet ainsi d'étudier des interactions entre deux molécules. Dans cette approche, les protéines Nesprines 1 d'un côté et SUN 1 ou 2 de l'autre seraient fusionnées à des protéines fluorescentes et transfectées dans des cellules comme des cardiomyocytes néonataux de souris exprimant la lamine $\Delta K32$. Nous disposons au laboratoire de systèmes de culture cellulaire permettant d'étirer les cellules en 2D ou en 3D. Ces expériences apporteraient des réponses sur la stabilité ou la labilité du complexe LINC face aux contraintes mécaniques s'exerçant sur le noyau des cardiomyocytes.

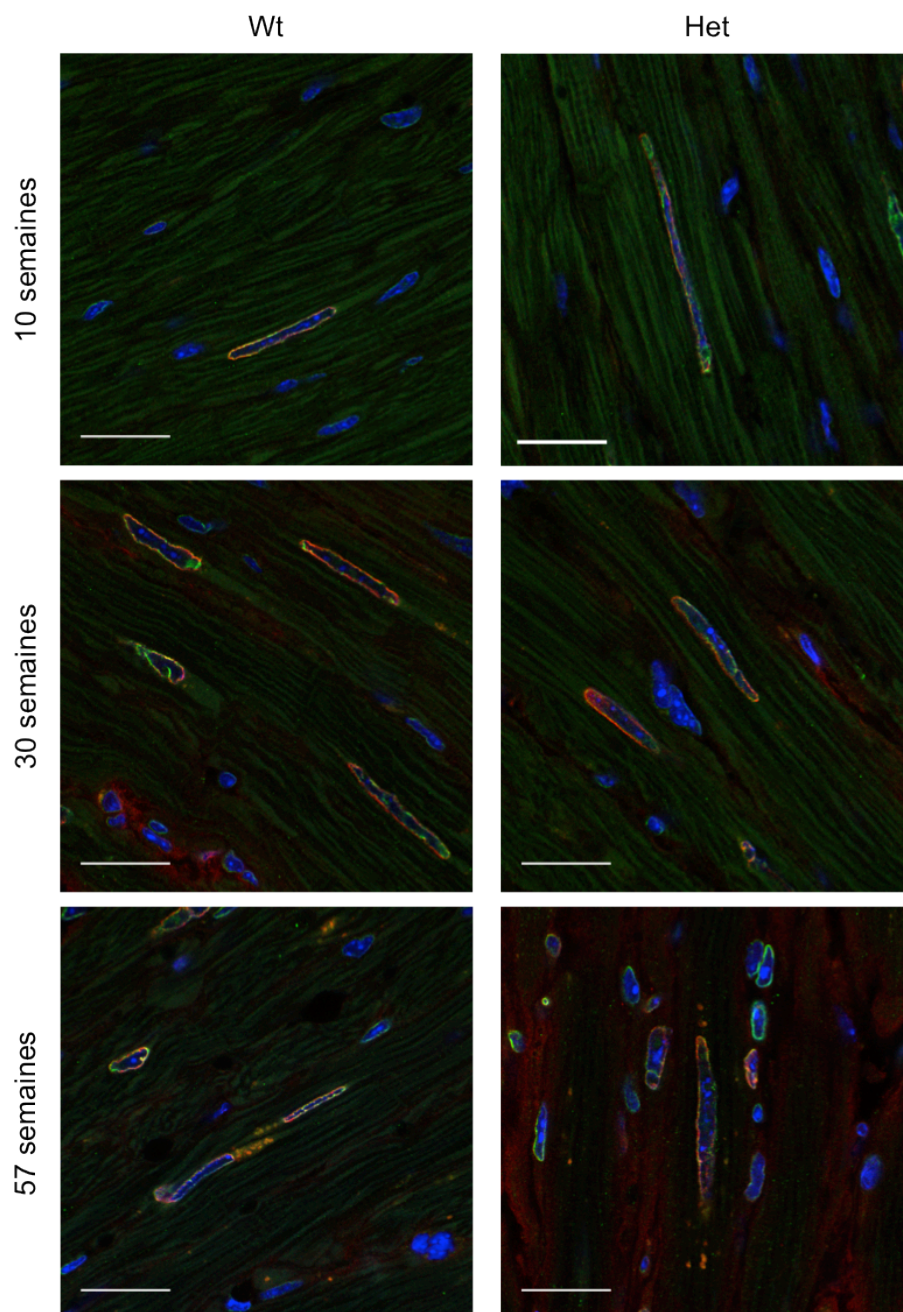


Figure 15. Etude du complexe LINC dans le cœur des souris Wt et Het âgées de 10, 30 et 57 semaines.

Coupes de cœur marquées avec un anticorps anti-nesprine 1 (rouge) et anti-SUN1 (vert). Les noyaux sont marqués au DAPI (bleu). Barre d'échelle = 20 μm . (n=2 souris de chaque génotype à chaque âge)

Etude complémentaire du protéasome : Inhibition in vivo du protéasome

Lors de notre étude de la fonction de l'UPS dans le cœur des souris Het, nous avons montré que le niveau des lamines A/C est modulé avec la progression de la cardiomyopathie et que la fonction globale de l'UPS est altérée dans le cœur des souris

Het. Il nous a paru important de montrer que la dégradation des lamines A/C était bien sous le contrôle de ce système *in vivo*.

Nous avons donc choisi de traiter des souris Het âgées de 10 et 30 semaines avec de l'époxomicine (epoxo), un inhibiteur spécifique de l'UPS (Meng et al, 1999), à la dose de 0,5 mg/kg/jour pendant une semaine via des mini-pompes osmotiques. Cette dose n'a pas d'effet secondaire cardiaque chez la souris (Depre et al, 2006; Vignier et al, 2009). Les souris Het contrôles ont été traitées avec du NaCl. La fonction cardiaque des animaux a été mesurée avant et après le traitement. Comme attendu à ces âges, les souris âgées de 10 semaines n'ont pas montré de dysfonction cardiaque, alors que les souris Het âgées de 30 semaines souffraient déjà de dysfonction contractile (Fraction de raccourcissement: $21 \pm 7,5\%$). Après le traitement à l'époxomicine, aucune modification des paramètres échocardiographiques n'a été observée, indiquant qu'une inhibition pharmacologique courte de l'UPS n'a pas aggravé le phénotype cardiaque des souris Het. L'époxomicine est connue pour inhiber l'activité chymotrypsine-like (CT-like) de l'UPS par liaison covalente sur le site actif de l'enzyme (sous-unité $\beta 5$ du complexe 20S) (Groll et al, 2000). La forme complexée à l'époxomicine de la sous-unité $\beta 5$ a été détectée dans le cœur des souris traitées confirmant l'inhibition de l'activité CT-like après le traitement (figure 16 A). Les mesures d'activité *in vitro* ont confirmé 41% et 63% d'inhibition de l'activité CT-like dans le cœur des souris Het traitées âgées de 10 et 30 semaines, respectivement (Figure 16 B). En dépit de cette inhibition de l'activité CT-like, et contrairement à ce que nous avons montré sur les myoblastes et les cardiomyocytes, le niveau des lamines A/C est similaire, voire légèrement diminué, dans le cœur des souris traitées comparées aux souris non traitées aux deux âges (figure 16 A et C).

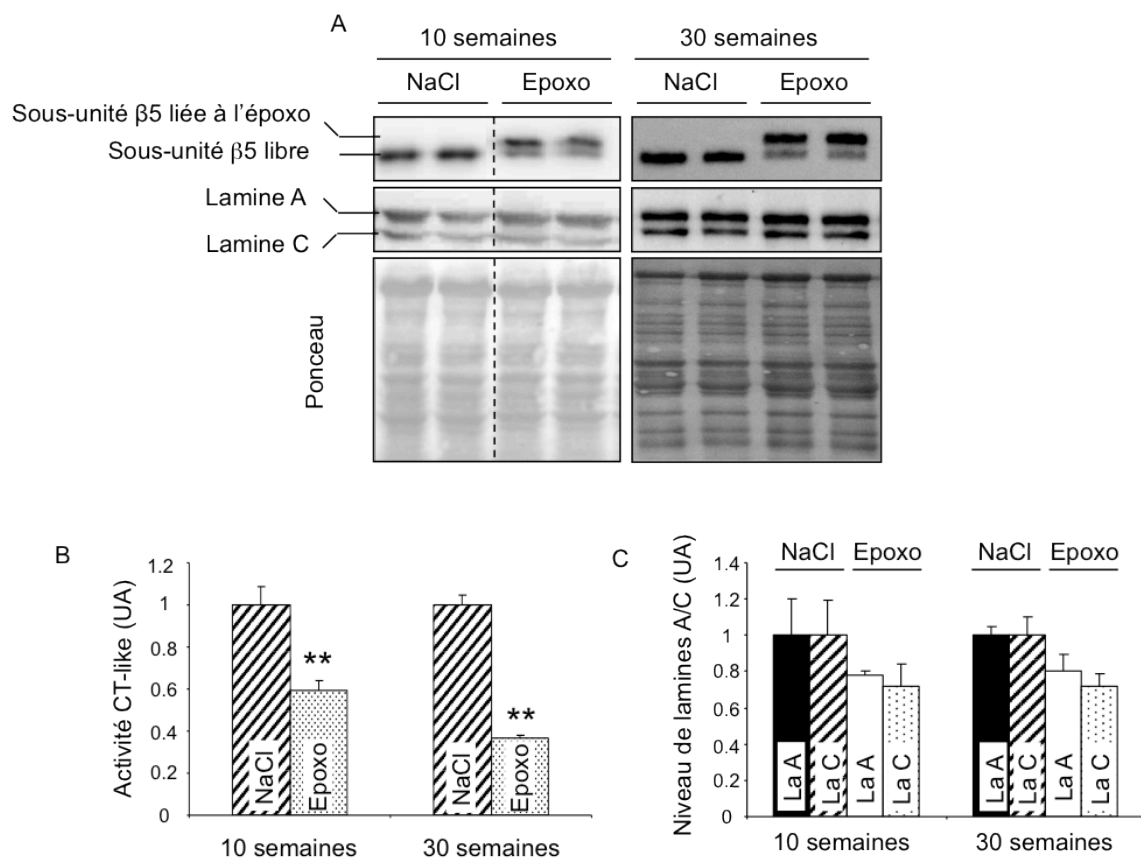


Figure 16. Effet de l'inhibition du protéasome par l'époxomicine sur le niveau des lamines A/C dans le cœur des souris Het âgées de 10 et 30 semaines.

(A) Western blot montrant le niveau de sous-unité $\beta 5$ complexée à l'époxomicine (inhibée) et libre (active), et des lamines A/C dans le cœur des souris Het traitées à l'époxomicine (Epoxo) et non traitées (NaCl). La coloration de la membrane au Rouge Ponceau sert de contrôle de charge.

(B) Mesure de l'activité Chymotrypsine (CT)-like dans le cœur des souris Het traitées et non traitées. ** $p < 0.001$. Moyenne \pm SEM. (n=5 souris non traitées et 6 traitées à 10 semaines; n=4 non traitées et 5 traitées à 57 semaines)

(C) Quantification du niveau de lamines A (La A) et lamines C (La C) dans le cœur des souris Het traitées et non traitées. Moyenne \pm SEM. (n=5 souris non traitées et 6 traitées à 10 semaines; n=4 non traitées et 5 traitées à 57 semaines)

L'inhibition par l'époxomicine est certes irréversible mais sélective de l'activité chymotrypsine-like de l'UPS. Ainsi, ce résultat surprenant et allant contre l'ensemble des résultats déjà acquis, peut être expliqué par plusieurs hypothèses : soit les lamines seraient dégradées par une autre activité de l'UPS (activités trypsine-like et/ou caspase-like), l'inhibition de la chymotrypsine-like n'ayant donc aucun impact sur leur dégradation ; soit elles seraient bien dégradées par l'activité chymotrypsine-like mais la dose d'époxomicine utilisée ne serait pas suffisante pour observer une augmentation des lamines A/C ; ou encore l'inhibition de leur dégradation, conduisant à leur accumulation dans le cœur des souris Het, aurait activé un mécanisme de dégradation

secondaire comme l'autophagie par exemple. Cette dernière hypothèse sera étudiée par l'analyse en western blot du niveau de protéines LC3-I et LC3-II (voir paragraphe suivant), reflétant l'activation de la voie autophagique dans le cœur des souris Het traitées et non traitées à l'époxomicine.

Etude de l'autophagie dans le cœur des animaux Het et Wt.

Chez les mammifères, et dans le cœur en particulier, deux systèmes protéolytiques majeurs sont impliqués dans le contrôle qualité des protéines et leur l'homéostasie: la voie lysosomale-autophagique et le système ubiquitine-protéasome (Wang et al, 2008b). Comme je l'ai montré dans le manuscrit soumis, la fonction de l'UPS est altérée dans le cœur des souris Het âgées de 30 semaines.

Nous avons aussi évalué la fonction autophagique dans le cœur des souris Het et Wt. Les processus d'autophagie sont contrôlés par de nombreux complexes protéiques. Une des protéines essentielles à ce processus est la protéine LC3 (microtubule-associated protein 1 light chain 3) dont la conversion de la forme soluble (LC3-I) en forme associée aux vésicules autophagiques (LC3-II) est utilisée comme marqueur d'autophagie (Kirisako et al, 1999). Dans le cœur des souris Het âgées de 10, 30 et 57 semaines, les niveaux de LC3-I et LC3-II, ainsi que le ratio LC3-II/LC3-I, qui reflète le flux autophagique, sont semblables à ceux observés chez les souris Wt du même âge (Figure 17). Ce résultat suggère que l'autophagie ne serait pas dérégulée dans le cœur des souris Het.

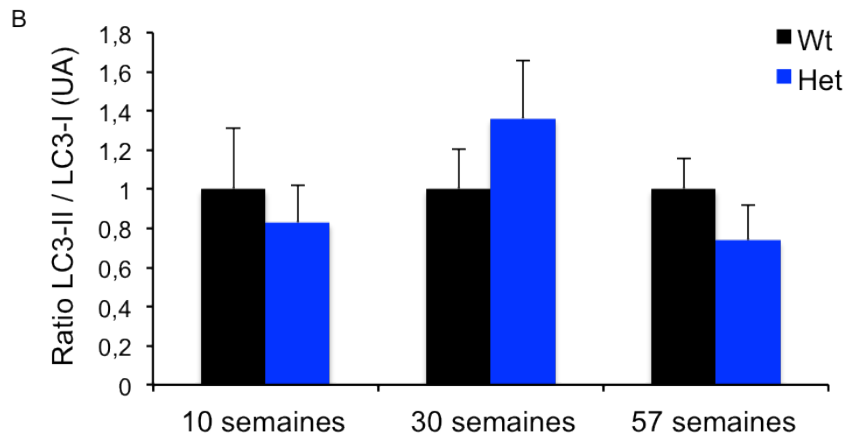
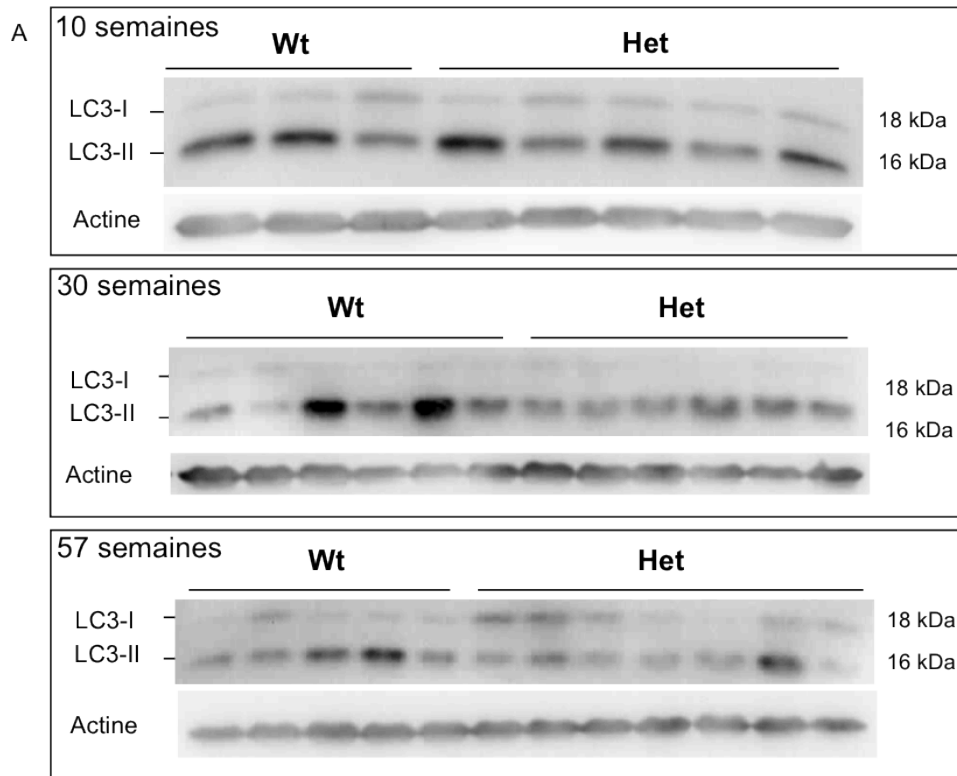


Figure 17. Evaluation du niveau d'activation de la voie lysosomale-autophagique dans le cœur des souris Wt et Het âgées de 10, 30 et 57 semaines.

(A) Western blot montrant le niveau de LC3-I et LC3-II. L'actine sert de contrôle de charge.

(B) Quantification du ratio de LC3-II / LC3-I dans le cœur des souris Wt et Het aux trois âges. Moyenne \pm SEM. (n=3 Wt et 5 Het à 10 semaines; n=6 Wt et 6 Het à 30 semaines; n=5 Wt et 7 Het à 57 semaines)

Résultats : Partie II

Réponse du myocarde et des muscles squelettiques des souris Het face à un stress induit par l'exercice

Problématique

A l'heure actuelle, plusieurs hypothèses prédominent quant au rôle des lamines A/C permettant d'expliquer la variété des phénotypes et la spécificité tissulaire liées aux mutations du gène *LMNA* (voir introduction). L'une de ces hypothèses, appelée « hypothèse mécanique / structurale », est basée sur le rôle primordial des lamines A/C au niveau du nucléosquelette. Les lamines A/C auraient comme fonction essentielle de maintenir l'intégrité de la cellule et les mutations du gène *LMNA* entraîneraient une fragilisation du nucléosquelette et donc de la cellule (Hutchison et al, 2001). Ceci a été démontré *in vitro* sur des fibroblastes embryonnaires de souris (MEF) *Lmna*^{-/-}. Lorsque ces cellules sont soumises à un étirement cyclique, les noyaux se déforment de façon plus importante que celui des cellules contrôles, indiquant un défaut de résistance aux contraintes mécaniques en absence de lamines A/C (Lammerding et al, 2004). De la même manière, lorsqu'une force est appliquée perpendiculairement à ces cellules, induisant une compression, les noyaux des MEF *Lmna*^{-/-} sont plus enclins aux déformations et aux ruptures membranaires que les MEF sauvages (Broers et al, 2004). Etant données les contraintes mécaniques fortes et permanentes qui s'exercent sur les cardiomyocytes, et dans une moindre mesure sur les fibres musculaires squelettiques, nous avons cherché à savoir si le cœur et les muscles des souris Het étaient plus sensibles aux contraintes mécaniques que ceux des souris Wt. Dans ce but, les souris Het et Wt ont été soumises à un protocole d'exercice chronique épuisant.

Méthodes d'étude utilisées

Nous avons choisi de réaliser cette étude sur des souris ne présentant pas encore de dysfonction cardiaque. Cependant, afin d'évaluer une aggravation ou une anticipation de la CMD en réponse au stress, nous avons choisi des souris d'un âge correspondant à la fenêtre d'apparition supposée des premiers signes pathologiques cardiaques. Cet âge a été estimé à partir de la courbe de survie des animaux et de la connaissance de l'histoire naturelle de la CMD (voir Résultats : Partie I). L'apparition de la dysfonction contractile cardiaque précède de 15 à 20 semaines environ le décès des animaux, les premiers décès survenant vers l'âge de 35 semaines, la fenêtre d'apparition des premiers signes cardiaques correspond donc à l'âge de 15 à 20 semaines. Nous avons donc choisi de réaliser cette étude sur des souris âgées de 17 semaines.

Après une première échocardiographie, 9 souris mâles Wt et 18 souris mâles Het issues de mêmes portées et âgées de 17 semaines ont effectué un test de tolérance à l'exercice sur tapis roulant. Ce test, permettant d'évaluer les capacités des animaux à soutenir l'effort, consiste en une augmentation progressive de la vitesse de course de 7 à 21 m/min par intervalle d'une minute, l'inclinaison du tapis étant nulle. La vitesse est ensuite fixée à 21 m/min et le temps pendant lequel les animaux sont capables de soutenir le rythme est enregistré. Le point d'épuisement est considéré comme atteint lorsque les souris sont incapables de maintenir la vitesse de course en dépit des stimuli électriques reçus à partir d'une grille placée à la base de chaque couloir.

Les souris Wt et Het ont ensuite été aléatoirement réparties en 4 groupes : 5 Wt-exercées (Wt Ex), 4 Wt-sédentaires (Wt Sed), 9 Het-exercées (Het Ex), 9 Het-sédentaires (Het Sed). Les souris des groupes exercés ont été soumises à un protocole de course chronique épuisant sur tapis roulant. Après 15 min d'acclimatation et d'échauffement à une vitesse faible, les animaux ont été forcés à courir à une vitesse comprise entre 16 et 21m/min pendant 45 minutes par session. Ce protocole a été répété 5 fois par semaine, pendant 5 semaines (Figure 18). Après 5 semaines, les animaux (Ex et Sed) ont été échocardiographiés et sacrifiés. La mesure des propriétés contractiles du muscle soléaire, très sollicité dans ce type d'exercice, a été réalisée. J'ai ensuite analysé la morphologie musculaire et cardiaque, et un éventuel remodelage cardiaque par histologie, et q-PCR. Le détail des méthodes utilisées est présenté en Annexe de ce manuscrit.

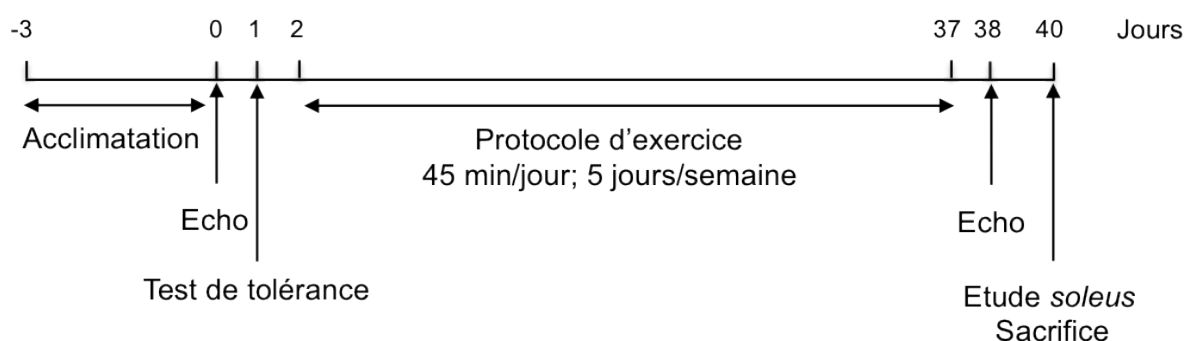


Figure 18. Représentation schématique du protocole suivi

Résultats

Deux souris Het sont mortes au cours des 5 semaines de suivi des animaux. L'une d'elles était sédentaire, l'autre était une souris Het exercée et est morte après le protocole, à la veille du sacrifice. L'exercice n'a donc pas eu d'incidence directe sur la survie des animaux exercés.

Aptitude à l'exercice

Tolérance à l'exercice

La première étape de notre protocole a été d'évaluer si la capacité à l'exercice était différente chez les souris Wt et Het. Pour cela nous avons réalisé un test de tolérance à l'effort, décrit plus haut dans la section Méthodes d'étude utilisées.

Ce test, réalisé chez toutes les souris Wt et Het, a montré que la capacité des animaux à soutenir l'effort imposé était identique, quelque soit le génotype (Figure 19A).

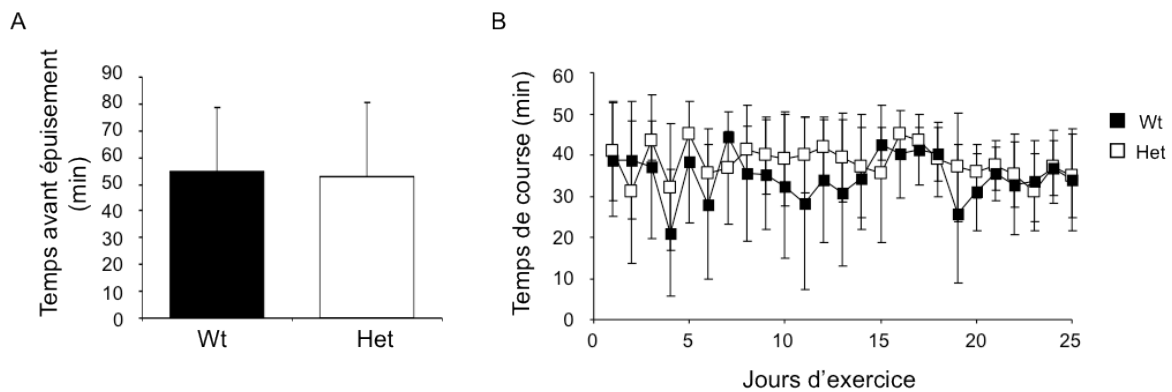


Figure 19. Aptitude à la course des souris Wt et Het.

(A) Test de tolérance à l'exercice (n=9 Wt et 18 Het).

(B) Temps de course pour chaque jour d'exercice (n=5 Wt and 9 Het). Moyenne \pm SD.

Evaluation du temps de course

De la même manière, il était important de s'assurer que les souris Het et Wt effectuent une même durée d'exercice à chaque séance. L'enregistrement du temps de course présenté figure 19 B montre qu'en moyenne les souris des deux groupes ont couru de façon similaire tout au long du protocole.

Analyses fonctionnelles

Fonction cardiaque

Nous avons tout d'abord vérifié que les souris Het ne présentaient pas de dysfonction contractile ni dilatation ventriculaire au début du protocole, comme attendu à cet âge (Tableau 7).

Tableau 7. Paramètres échocardiographiques des souris Wt et Het avant (âgées de 17 semaines) et après 5 semaines d'exercice (âgées de 22 semaines). (nombre d'animaux).

	Avant l'exercice		Après 5 semaines d'exercice			
			Sédentaires		Exercées	
	Wt (9)	Het (18)	Wt (4)	Het (9)	Wt (5)	Het (9)
BW (g)	29.7 ± 1.6	30.1 ± 3.2	33.2 ± 3.1	31.9 ± 3.1	29.8 ± 2.6	29.9 ± 1.7
IVSd (mm)	0.66 ± 0.05	0.63 ± 0.07	0.65 ± 0.06	0.60 ± 0.05	0.62 ± 0.05	0.60 ± 0.05
PWd (mm)	0.83 ± 0.09	0.81 ± 0.07	0.83 ± 0.10	0.80 ± 0.10	0.78 ± 0.04	0.73 ± 0.07
LVEDD (mm)	4.00 ± 0.35	4.11 ± 0.29	4.00 ± 0.28	4.00 ± 0.14	4.10 ± 0.26	4.30 ± 0.21
IVSs (mm)	1.23 ± 0.13	1.17 ± 0.15	1.20 ± 0.12	1.08 ± 0.12	1.16 ± 0.11	1.01 ± 0.11*
PWs (mm)	1.24 ± 0.15	1.19 ± 0.16	1.33 ± 0.17	1.23 ± 0.15	1.18 ± 0.11	1.11 ± 0.13
LVESD (mm)	2.34 ± 0.43	2.53 ± 0.29	2.33 ± 0.34	2.57 ± 0.26	2.54 ± 0.37	2.93 ± 0.39##*
LVM (mg)	107 ± 13.6	106 ± 15.2	105 ± 4.6	99 ± 12.9	103 ± 10.6	105 ± 8.8
FS (%)	41.5 ± 5.8	38.2 ± 4.8	42.3 ± 4.3	36.3 ± 5.4	38.9 ± 4.9	31.7 ± 6.21**
HR (bpm)	503 ± 43	475 ± 47	540 ± 19	539 ± 38	517 ± 22	515 ± 42

BW: poids du corps (body weight), IVSd: épaisseur du septum interventriculaire en diastole (Interventricular septum thickness in diastole), PWd: épaisseur de la paroi postérieure en diastole (Posterior wall thickness in diastole), LVEDD: diamètre ventriculaire gauche en fin de diastole (Left ventricular end-diastolic diameter), IVSs: épaisseur du septum interventriculaire en systole (Interventricular septum thickness in systole), PWs: épaisseur de la paroi postérieure en systole (Posterior wall thickness in systole), LVEDD: diamètre ventriculaire gauche en fin de diastole (Left ventricular end-systolic diameter), LVM: masse du ventricule gauche (Left ventricular mass), FS: fraction de raccourcissement (Fractional shortening), HR: rythme cardiaque (Heart rate). *p<0.05 et **p<0.01 comparés aux souris Wt exercées, #p<0.05 et ##p<0.01 comparés aux souris Het sédentaires. ANOVA, Holm-Sidak test. Moyenne ± SD.

Après les 5 semaines du protocole, les souris Het sédentaires âgées de 22 semaines présentaient une tendance à la diminution de la fraction de raccourcissement comparées aux souris Wt Sédentaires (p=0.084 vs Wt Sed, Holm-Sidak test). De façon intéressante, cette dysfonction contractile débutante a été légèrement aggravée par

l'exercice, puisque la fraction de raccourcissement des souris Het exercées est significativement plus basse que celle des Wt exercées (Tableau 7). De plus, alors que le diamètre ventriculaire gauche était identique chez les souris Het et Wt sédentaires, il était significativement augmenté chez les souris Het exercées comparées aux Het sédentaires. Ces résultats suggèrent un effet modéré mais significatif de l'exercice chronique épuisant sur le développement du phénotype cardiaque chez les souris Het. Il apparaît, en effet, une anticipation de l'apparition des symptômes chez les Het exercées. L'apparition plus précoce de la dilatation suggère un possible défaut d'élasticité du myocarde en réponse à l'étirement lié à la surcharge de volume induite par l'exercice chez les souris Het. Ce défaut pourrait provenir d'une trop grande déformabilité des cardiomyocytes d'une part, et/ou d'un remodelage inadéquat de la matrice extracellulaire assurant la cohésion et l'élasticité du tissu, d'autre part.

Propriétés contractiles du muscle soleus

Comme je l'ai indiqué dans la première partie des résultats, les souris Het ne présentent aucun phénotype musculaire pathologique, au repos du moins. Un des objectifs de ce protocole de course était d'évaluer si la surcharge de travail induite par l'exercice induisait le « démasquage » de défauts musculaires sous-jacents.

L'étude *ex vivo* des propriétés contractiles du muscle *soleus*, muscle de la patte postérieure particulièrement sollicité dans ce type d'exercice, n'a cependant révélé aucun impact délétère de l'exercice sur la fonction de ce muscle chez souris Het. Le muscle n'est ni plus fatigable, ni hypertrophique ou atrophique et la force qu'il développe est similaire dans tous les groupes (Tableau 8).

Tableau 8. Propriétés contractiles du muscle *soleus* des souris Wt et Het après le protocole d'exercice. (nombre d'animaux).

	Sédentaires		Exercées	
	Wt (4)	Het (8)	Wt (5)	Het (8)
Poids du muscle (mg)	13.6 ± 1.12	12.8 ± 1.27	13.2 ± 2.14	12.8 ± 1.47
L0 (mm)	13.0 ± 0.00	12.9 ± 0.50	12.9 ± 0.22	13.3 ± 0.12
sP0 (mN/mm ²)	176.6 ± 14.2	167.1 ± 29.4	148.4 ± 37.1	184.2 ± 21.1
Fatigue (sec)	35.9 ± 3.7	32.8 ± 4.5	33.2 ± 7.3	31.8 ± 6.3

L0: Longueur au repos ; sP0: Force maximale spécifique. Moyenne ± SD.

Le marquage histologique à l'hématéine/éosine de coupes transversales du muscle *plantaris*, autre muscle de la patte postérieure, n'a révélé aucune anomalie chez les souris Het sédentaires et exercées, ni chez les souris Wt exercées. La taille des fibres apparaît similaire dans les quatre groupes, il n'y a pas de centralisation nucléaire qui indiquerait des processus de régénération, ni d'infiltrat inflammatoire (Figure 20).

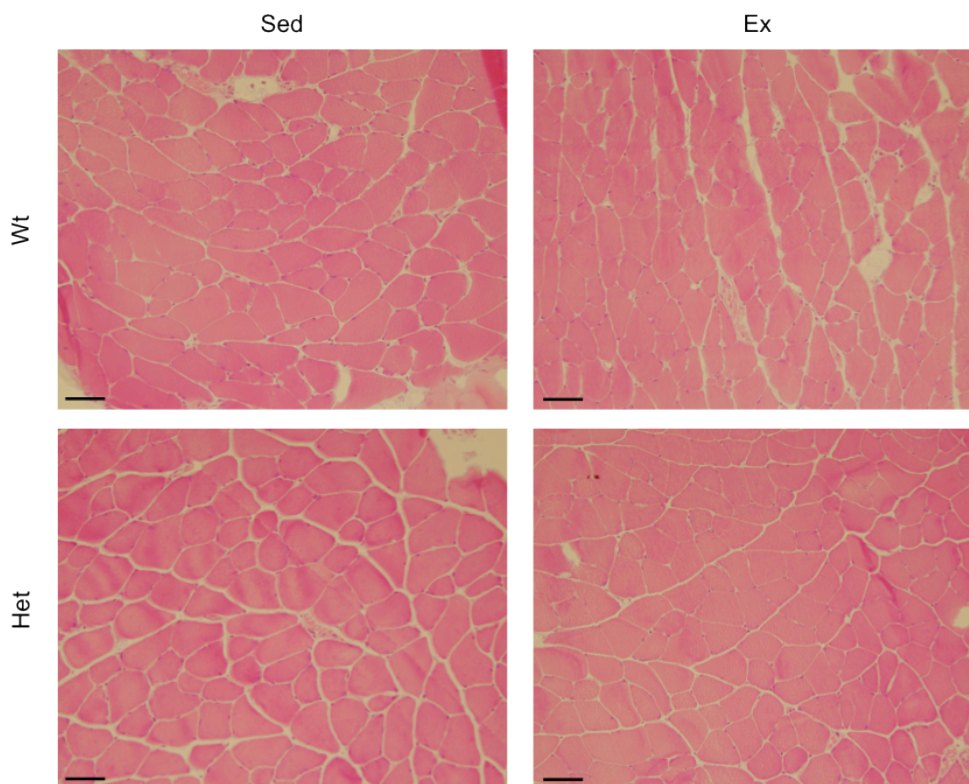


Figure 20. Morphologie musculaire des souris Wt et Het exercées et sédentaires.

Coupes transversales du muscle *plantaris* colorées à l'hématéine/éosine. Le cytoplasme des fibres est coloré en rose et les noyaux en violet. Barre d'échelle = 50 μ m.

Remodelage cardiaque

Etant donné l'effet de l'exercice sur la fonction et la dilatation cardiaque chez les souris Het, nous nous sommes intéressés à la morphologie cardiaque. Le ratio du poids du cœur rapporté à la longueur du tibia est similaire dans les quatre groupes, indiquant l'absence d'hypertrophie en réponse à l'exercice chez les animaux Wt et Het (Figure 21 A).

Taille des cardiomyocytes

Bien que le poids du cœur ne révèle aucun changement, nous avons évalué si l'exercice avait eu un effet au niveau cellulaire, en évaluant la surface transversale des cardiomyocytes. Pour cela, un marquage avec un anticorps reconnaissant la vinculine, protéine des costamères utilisée pour matérialiser les limites des cardiomyocytes (Figure 21B), a été réalisé et la surface intérieure des cellules a été mesurée. Les résultats montrent que la section moyenne des cardiomyocytes, ainsi que la répartition des cardiomyocytes en fonction de leur surface, sont similaires dans les quatre groupes (Figure 21C).

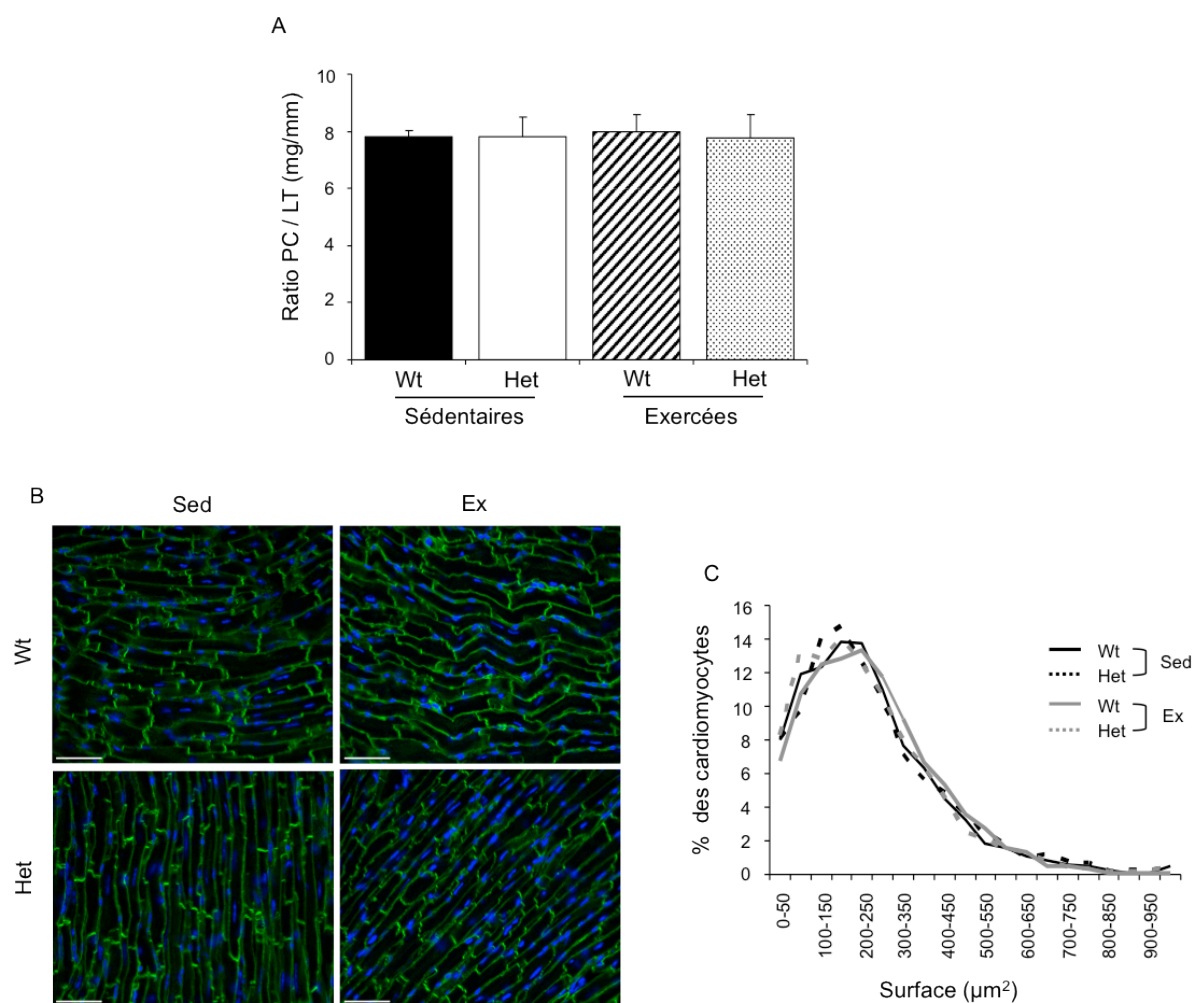


Figure 21. Morphologie cardiaque des souris Wt et Het exercées et sédentaires.

(A) Ratio poids du cœur (PC) sur longueur du tibia (LT) chez les souris sédentaires (n=4 Wt et 9 Het) et exercées (n=5 Wt et 9 Het). Moyenne \pm SEM.

(B) Coupes de cœur marquées avec un anticorps anti-vinculine (vert) indiquant les limites des cardiomyocytes. Sed = sédentaires; Ex = exercées. Les noyaux sont marqués au DAPI (bleu). (barre d'échelle = 50 μm)

(C) Distribution des aires des cardiomyocytes en coupe transversale (n=1124 \pm 302 cardiomyocytes mesurés par animal; n=3 souris par groupe).

Longueur des noyaux

Comme je l'ai présenté plus haut, les noyaux des MEF n'exprimant pas de lamines A/C (*Lmna*^{-/-}) sont sensibles à la déformation mécanique. Nous avons donc évalué l'effet de l'exercice sur la morphologie des noyaux dans les cœurs des animaux Wt et Het, sédentaires et exercés. Un marquage avec un anticorps reconnaissant la lamine B1, protéine de l'enveloppe nucléaire utilisée pour matérialiser les limites des noyaux (Figure 22A), a été réalisé et la longueur des noyaux a été mesurée dans les zones myocardiques où les cardiomyocytes sont orientés de manière longitudinale. Les résultats indiquent que la longueur moyenne des noyaux ainsi que leur répartition en fonction de leur surface, sont globalement similaires dans les quatre groupes (Figure 22B). En revanche, il est à noter une disparité de taille des noyaux dans le cœur des souris Het : une plus grande proportion de « petits » noyaux (5-10 μm) et une plus grande proportion de noyaux allongés. En effet, 65% et 57% des noyaux mesurent entre 5 et 10 μm dans le cœur des souris Het sédentaires et exercées, respectivement. Les noyaux de cette taille ne représentent que 53% et 55% des noyaux dans le cœur des souris Wt sédentaires et exercées, respectivement (Figure 22B). De même, la proportion de noyaux allongés tend à être supérieure chez les souris Het, sans effet de l'exercice dans le cœur des souris Het (Figure 22C). Les noyaux sont considérés comme allongés lorsque leur longueur excède 20 μm , longueur correspondant au double de la longueur moyenne des noyaux des animaux Wt sédentaires (moyenne = 10,3 μm). L'absence de significativité de ce paramètre entre les groupes est liée au faible échantillonnage, ce nombre sera augmenté dans la suite de cette étude.

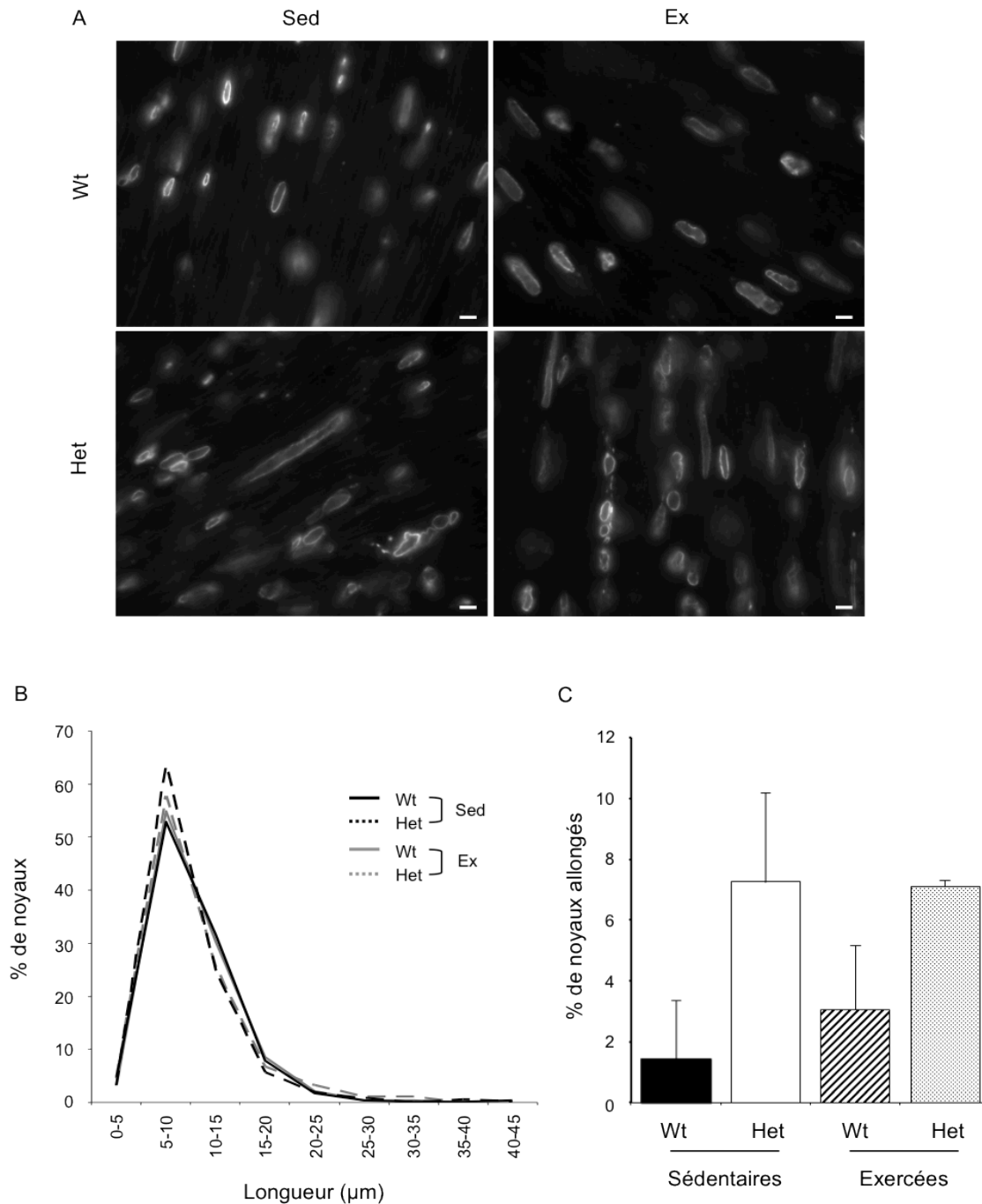


Figure 22. Morphologie des noyaux dans le cœur des souris Wt et Het sédentaires et exercées.

(A) Coupes de cœur marquées avec un anticorps anti-lamine B1, indiquant la membrane nucléaire.

Sed = sédentaires; Ex = exercées. Barre d'échelle = 10 µm.

(B) Distribution de la longueur des noyaux (n=272 ± 89 noyaux mesurés par animal (n=2 Ex et 3 Sed pour chaque génotype)).

(C) Proportion des noyaux allongés (longueur supérieure à 20µm, soit 2 fois la longueur moyenne des Wt Sed). Moyenne ± SEM.

Expression de marqueurs de remodelage myocardique

Lors de la caractérisation phénotypique des souris Het (Résultats : Partie I), j'ai montré que l'expression de certains facteurs classiques de remodelage myocardique (peptide natriurétique cérébral *Nppb*, chaîne lourde β de la myosine *Myh7*) est augmentée dans le

cœur des souris Het. Nous avons évalué si l'exercice avait un effet additif sur ce remodelage. L'expression des gènes à expression rapide dits « mécanosensibles » *Egr1* et *Iex1* (Early growth response 1, Immediate early gene response X-1) a aussi été mesurée.

Les niveaux d'expression des gènes *Nppa* (codant le facteur atrial natriurétique, ANF), *Nppb*, *Egr1* et *Iex-1* ne sont pas statistiquement différents entre les quatre groupes. On note toutefois une tendance à l'augmentation de l'expression de *Egr1* et *Iex-1* dans le cœur des souris Het exercées comparées aux souris Het sédentaires et aux souris Wt exercées (Figure 23).

En revanche, l'expression du gène *Myh7*, est augmentée d'un facteur 4, indiquant un remodelage des protéines contractiles chez les souris Het (exercées et sédentaires), mais il n'y a pas d'effet de l'exercice sur ce paramètre.

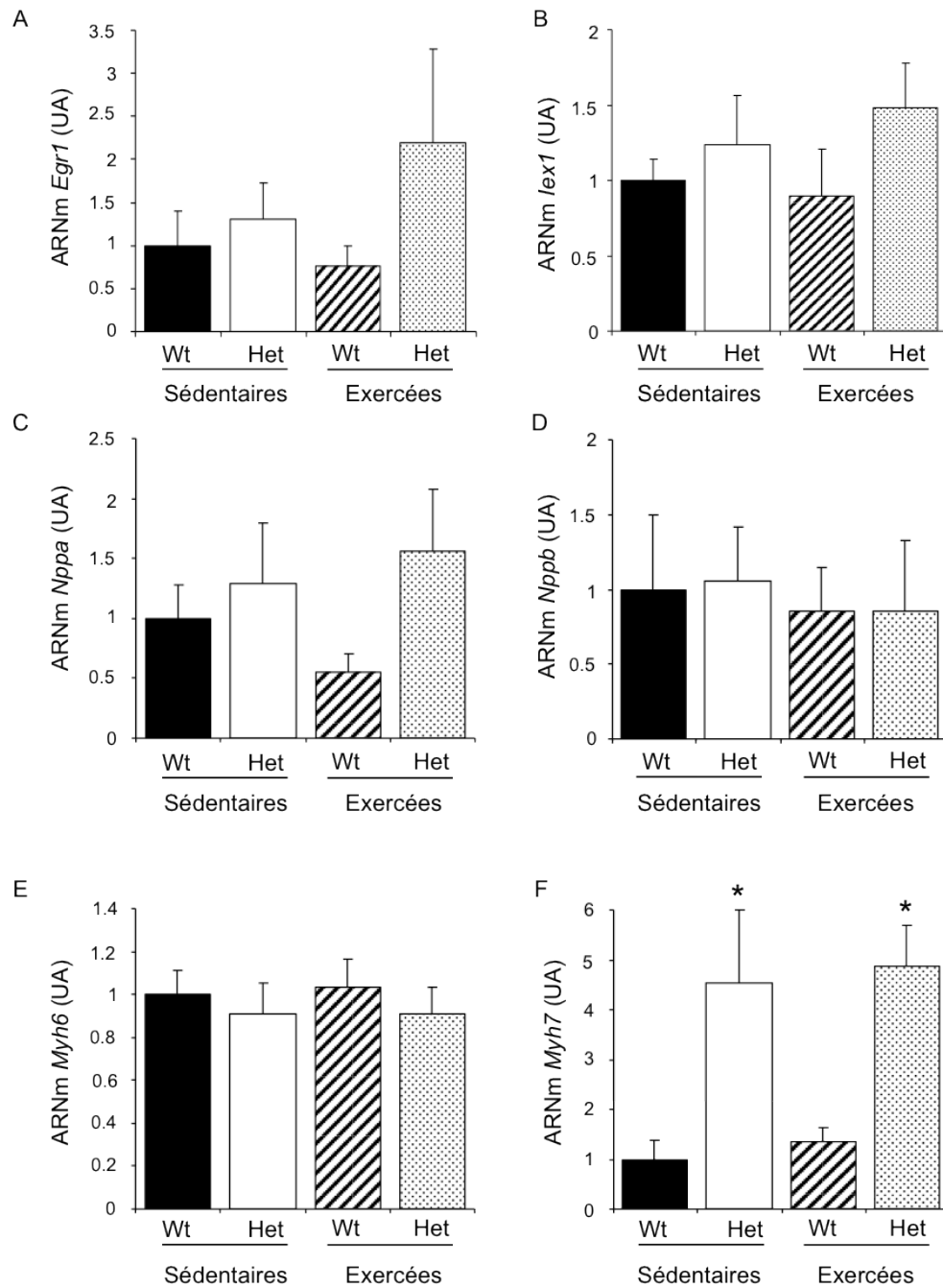


Figure 23. Expression de marqueurs de remodelage cardiaque.

(A-B) Niveau d'ARNm de gènes "mécanosensibles". A, Early growth response 1 (*Egr1*); B, Immediate early gene response X-1 (*Iex1*).

(C-D) Niveau d'ARNm codants les facteurs natriurétiques. C, Facteur natriurétique atrial (*Nppa*); D, Peptide natriurétique cérébral (*Nppb*).

(E-F) Niveau d'ARNm codants les chaînes lourdes de myosine. E, isoforme α (*Myh6*); F, isoforme β (*Myh7*) * $p < 0.05$ comparés aux Wt de même entraînement, Student t-test. Moyenne \pm SEM. (n=4 Wt Sed et n=5 dans les autres groupes).

Remodelage matriciel

Une hypothèse pour expliquer l'apparition plus précoce de la dilatation est un remodelage inadéquat de la matrice cellulaire assurant la cohésion et l'élasticité du

tissu. L'exercice est connu pour induire une dilatation relative du ventricule gauche afin d'augmenter le volume d'éjection (Goodman et al, 2005; Woodiwiss & Norton, 1995). Cette dilatation s'accompagne généralement d'une dégradation du collagène myocardique (Brower et al, 2006). Nous avons d'abord évalué si l'exercice a induit une modification du contenu en collagène myocardique dans le cœur des souris exercées. Un marquage au rouge Sirius, colorant les dépôts de collagène en rouge et la quantification des surfaces marquées, a montré que le contenu en collagène myocardique était similaire dans les quatre groupes (Figure 24A et B).

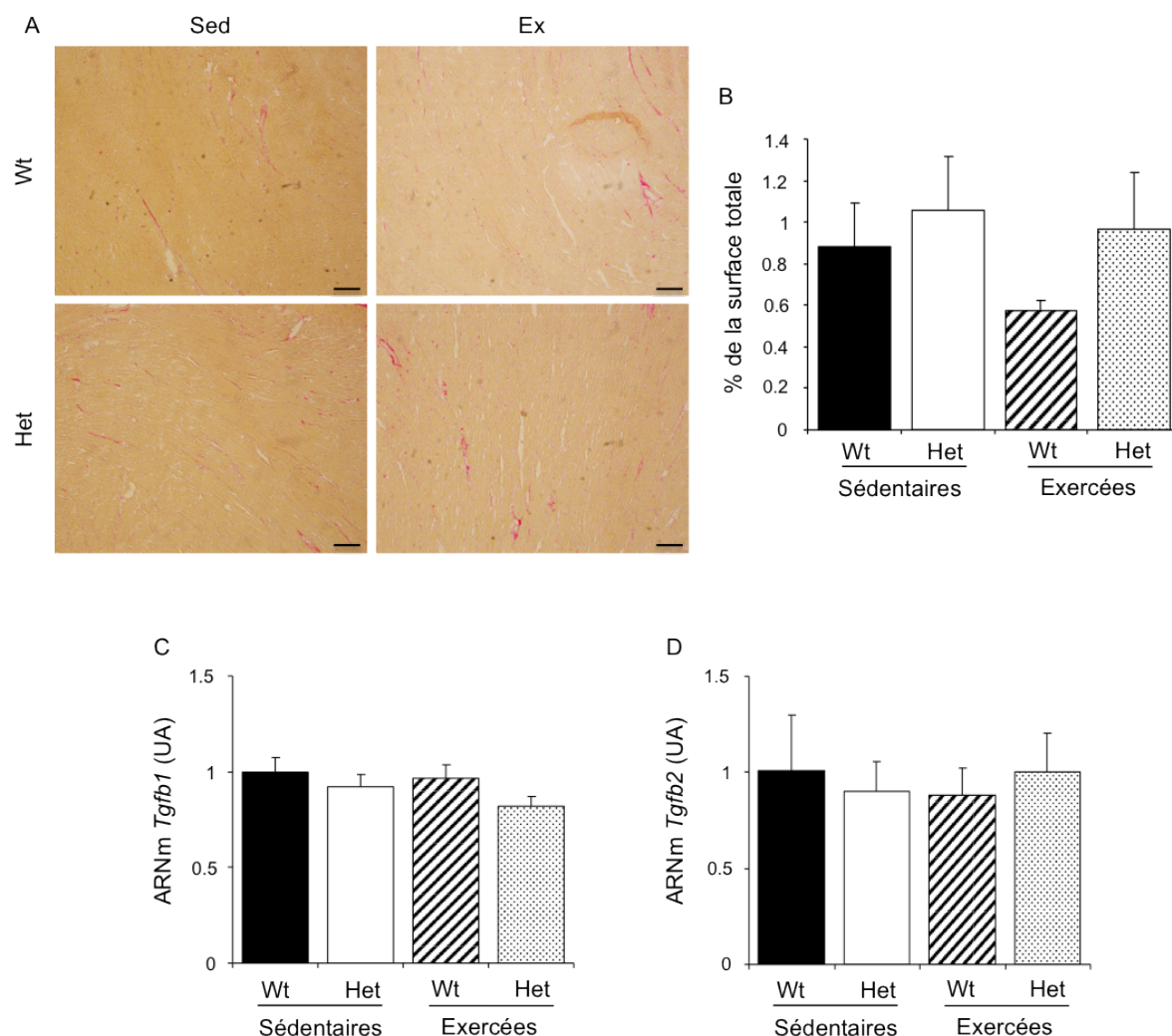


Figure 24. Remodelage de la matrice extracellulaire.

(A) Coupes de cœur colorées au rouge Sirius marquant le collagène (rouge). Barre d'échelle = 100 μ m.

(B) Quantification du contenu en collagène normalisé à la surface totale (n=3 dans chaque groupe). Moyenne \pm SEM.

(C-D) Niveau d'ARNm codant le *Transforming Growth Factor* β 1 (C) et β 2 (D). Moyenne \pm SEM. (n=4 Wt Sed et n=5 dans les autres groupes).

Pour évaluer la proportion de collagène de type 1 (plus rigide) et de type 3 (plus élastique) (Mukherjee & Sen, 1990), une étude en lumière polarisée va être réalisée. De façon concordante, le niveau d'expression des gènes codant les facteurs de croissance

pro-fibrotiques *Tgfb1* et *Tgfb2* (Transforming Growth Factor β) n'est pas différent dans les quatre groupes (Figure 24C et D). En complément, une étude d'expression des gènes codant des composants matriciels comme le collagène I (*Col1a1*, *Col1a2*) va être réalisée.

Il est à noter qu'aucune modification de tous ces paramètres fonctionnels et morphologiques n'a été observée chez les souris Wt exercées comparées aux Wt sédentaires.

Discussion

Il est incontestablement reconnu que l'exercice physique est bénéfique pour la physiologie cardiaque, tant en préventif qu'en rééducation après un accident cardiaque avec des effets positifs sur la qualité de vie et la mortalité des patients (Piepoli et al, 2011). L'exercice physique améliore, en effet, la fonction endothéliale (Whyte & Laughlin, 2010) et la fonction cardiaque (Goodman et al, 2005).

En revanche, il est plus difficile de faire une synthèse concernant l'effet cardiaque d'un exercice soutenu chez la souris, tant les protocoles utilisés sont différents et complexes. Il a en effet été décrit des protocoles de nage, de course sur tapis roulant et de course sur roue. La nature et l'intensité de l'exercice variant d'un protocole à l'autre (exercice fractionné, exercice continu, à plat ou avec différents degrés d'inclinaison du tapis...) il est difficile de stéréotyper leurs effets. Par exemple, d'un point de vue physiologique, il a en effet été décrit une hypertrophie cardiaque (Kemi et al, 2008; Kemi et al, 2002) en réponse à l'exercice chronique soutenu. Dans d'autres études en revanche, aucune modification morphologique cardiaque n'a été observée (Ericsson et al, 2010; Nakamura et al, 2002).

Pour notre étude, le protocole appliqué aux souris Wt et Het correspond à un exercice chronique épuisant sur tapis roulant. Les animaux doivent en effet soutenir un exercice correspondant à 81 à 87% de leur consommation maximale en oxygène (VO_2 max) (Fernando et al, 1993) de façon continue pendant toute la séance. Le stress myocardique consécutif à cet exercice a eu pour conséquence une anticipation de l'apparition de la dysfonction cardiaque et de la dilatation chez les souris Het, sans remodelage ni hypertrophie cardiaque et sans remodelage matriciel. Seule une augmentation de la proportion de noyaux allongés a été observée dans les cœurs des souris Het exercées.

Une étude du même type a été réalisée de façon concomitante chez les souris *Lmna*^{+/-}, développant une CMD proche de celle observée chez les souris Het mais de sévérité moindre (Chandar et al, 2010). Dans cette étude, des animaux de 12 semaines n'ayant pas encore développé de dysfonction cardiaque ont été soumis à un protocole de course modéré (17 m/min à 5° d'inclinaison, 40 min/session, 5 sessions/semaine pendant 6 semaines) ou à un protocole de course « épuisant » (15 à 22 m/min à 15° d'inclinaison, 40 min/session, 2 sessions/semaine pendant 6 semaines). Les résultats ont montré que, bien loin d'être plus sensibles au stress mécanique comme supposé, les souris *Lmna*^{+/-} ont vu leur fonction cardiaque se maintenir avec le protocole modéré. Ces effets bénéfiques n'ont en revanche pas été retrouvés avec le protocole soutenu mais leur fonction cardiaque n'a pas été aggravée par cet exercice intense.

Dans notre étude, le protocole que nous avons choisi peut être considéré comme plus intense que le protocole « épuisant » appliqué aux souris *Lmna*^{+/-}, puisque les animaux ont couru aux mêmes vitesses, pendant le même temps mais de façon plus répétée. Ceci explique sans doute l'effet délétère observé chez nos souris Het.

Les mécanismes physiopathologiques conduisant au déclenchement plus précoce des défauts cardiaques observables chez les souris Het restent inconnus. L'allongement des noyaux pourrait résulter d'un défaut de rigidité du réseau nucléocytoplasmique, comme observé par un « détachement » périnucléaire de la desmine dans le cœur des souris *Lmna*^{-/-} et *Lmna*^{+/-} (Chandar et al, 2010). De façon générale, la rigidité nucléaire et cytosquelettique des cellules exprimant un défaut des lamines A/C est altérée et se traduit par un allongement de la taille des noyaux et un défaut de transmission de la force conduisant à la CMD (Broers et al, 2004 ; Cupesi et al, 2010; Lammerding et al, 2004 ; Nikolova et al, 2004). De plus amples analyses sont nécessaires pour établir si une telle désorganisation du cytosquelette existe dans le cœur des souris Het et si l'exercice a eu un impact sur celle-ci. En complément d'études classiques en immunofluorescence sur coupes de cœur, un outil utile pour l'étude de la réponse du cytosquelette aux contraintes mécaniques est le tissu cardiaque reconstitué *in vitro* (EHTs). J'ai présenté ce système dans la partie I des résultats de ce mémoire. Nous avons utilisé cette approche pour évaluer l'impact de la lamine $\Delta K32$ sur les propriétés contractiles des cardiomyocytes. Ici, une expérience informative serait de préparer des EHTs avec des cardiomyocytes néonataux de souris Het ou de souris homozygotes *Lmna* ^{$\Delta K32/\Delta K32$} et d'évaluer l'effet d'un étirement cyclique ou d'une stimulation électrique

(*pacing*) afin d'évaluer la viabilité des cardiomyocytes, l'organisation du cytosquelette et la forme des noyaux face à ce stress mécanique contrôlé.

Nos résultats sont compatibles avec une étude clinique rétrospective réalisée sur 94 sujets porteurs de mutation du gène *LMNA* associée à une cardiolaminopathie qui a montré une association entre la pratique d'un sport de compétition, incluant la course à pieds, et la survenue d'événements cardiaques majeurs de type « mort subite » (Pasotti et al, 2008). Le risque est en effet augmenté d'un facteur 3,38 chez ces sujets comparés aux sujets porteurs de mutation ne pratiquant pas ce type d'activité physique intense. Les auteurs soulignent, de plus, la « perception » d'un effet négatif du sport de compétition sur l'évolution de la pathologie et déconseillent donc la pratique de ce type de sport chez les sujets porteurs de mutation *LMNA*.

L'impact de l'exercice sur le phénotype cardiaque des souris Het reste malgré tout limité. Une des limites des protocoles de course imposés dans le but d'induire un stress est la nature intermittente de ce stimulus, l'implication de nombreux paramètres métaboliques et fonctionnels, et la variabilité interindividuelle (Bernstein, 2003). Il a en effet été montré qu'en fonction des lignées génétiques, les performances des souris variaient du simple au double, les souris C57Bl/6J (fond génétique nos souris) étant les moins performantes en exercice imposé (Lerman et al, 2002). De plus, la « motivation » des animaux a aussi été mise en avant pour expliquer les différences de performances entre l'exercice spontané et l'exercice forcé, encore une fois les souris C57Bl/6J étant celles qui ont montré le plus de différence entre ces deux types d'exercice (Lerman et al, 2002). Ce point peut paraître quelque peu sur-interprété ou anecdotique mais il est particulièrement vrai pour ceux qui ont eu l'occasion de « faire courir » des souris. En effet, indépendamment de tout défaut phénotypique observable, certaines souris Wt refusaient de soutenir l'effort, quand d'autres s'y soumettaient aisément.

Ainsi, pour explorer de façon plus standardisée l'effet du stress mécanique sur le cœur, une étude de réponse cardiaque à une surcharge de pression induite par la constriction de l'aorte thoracique est à envisager chez les souris Het. D'autre part, une infusion d'agonistes β -adrénergiques comme l'isoprotérénol, induisant un stress myocardique indépendant d'une élévation de la post-charge, renseignerait sur la résistance mécanique du myocarde des souris Het.

De façon intéressante, aucun phénotype musculaire pathologique n'a été démasqué par le stress induit par l'exercice. L'effet délétère de la mutation $\Delta K32$ des lamines A/C semble donc ne s'exprimer qu'au niveau cardiaque chez les souris Het.

Résultats : Partie III
Recherche de mécanismes physiopathologiques précoces

A- Profil d'expression génique

B- Implication des voies MAP kinases

Profil d'expression génique

Problématique

Comme je l'ai indiqué dans l'introduction de ce manuscrit, les lamines A/C sont impliquées dans la régulation de l'expression des gènes et la régulation de nombreuses voies de signalisation. L'objectif de cette partie du projet était d'étudier l'expression différentielle des gènes dans le cœur de souris Wt et Het âgées de 10 semaines, avant l'apparition des premiers signes de dysfonction cardiaque afin de :

- déterminer s'il existe un profil d'expression génique spécifique à la mutation $\Delta K32$ ou si une signature moléculaire commune peut être mise en évidence entre les souris Het et les souris *Lmna*^{H222P/H222P} (Muchir et al, 2007b).
- identifier des voies de signalisation précoces impliquées dans la physiopathologie de l'atteinte cardiaque.

Pour cela nous avons analysé le profil d'expression de tous les ARNm, autrement appelé transcriptome, dans le cœur de souris Wt et Het mâles âgées de 10 semaines.

Méthodes d'étude utilisées

Les ARN totaux ont été extraits des cœurs de 8 souris Wt et 10 souris Het âgées de 10 semaines, chaque animal Het et son contrôle Wt étant issus de la même portée pour minimiser les variations géniques non spécifiques. Après amplification et marquage à la biotine, les ARN ont été hybridés sur une puce, autrement appelée « microarray ». Les puces se présentent sous la forme d'une lame sur laquelle sont fixées des petites sondes d'ADN dont la séquence est complémentaire à celle des ARNm cibles. Il existe différents types de puces pour l'étude du transcriptome. Sur certaines d'entre-elles (Affymetrix ou Agilent), deux échantillons d'ARN, correspondant à deux conditions biologiques différentes et marqués par deux fluorochromes différents, sont mélangés et déposés ensemble sur une lame. Ces puces sont dites « bi-couleur ».

Pour notre étude, nous avons utilisé une puce de type « mono-couleur » Illumina Mouse Whole Genome-6 v2 expression BeadChip. Elle contient 45281 sondes couvrant l'intégralité du génome murin. Contrairement aux autres puces, les sondes sont ici accrochées à la surface de microbilles fixées sur la lame. Ce système augmente le

nombre de sonde par unité de surface de la puce et permettrait ainsi une meilleure capture des ARNm. De plus, sur ce type de puce, un seul échantillon est déposé par lame et l'analyse se fait ensuite en comparant les lames, et donc les différents échantillons entre eux. Les différentes manipulations techniques ont été réalisées avec l'aide de Wassila Carpentier sur la plateforme P3S de la Pitié-Salpêtrière.

Après le scanne de la puce, les données recueillies ont été extraites grâce au logiciel BeadStudio et analysées par Nicolas Cagnard sur la plateforme de biostatistique de la faculté de Necker. Le plan d'analyse statistique de la puce a été le suivant :

- 1) Pas de soustraction du bruit de fond des puces. La soustraction du bruit de fond a une incidence sur la variabilité inter et intrapuce des données sur ce type de puce mono-couleur. Il est donc préférable de ne pas l'éliminer. Le niveau du bruit de fond est évalué grâce à des contrôles négatifs internes à la puce (sonde ne reconnaissant aucune cible et bille sans sonde). Le logiciel BeadStudio évalue ensuite la probabilité que le niveau de fluorescence émis par une sonde donnée soit supérieur à la fluorescence du bruit de fond. Si cette probabilité, appelée p value, est inférieure ou égale à 0,05, la sonde en question est considérée comme exprimée dans l'échantillon biologique.
- 2) Normalisation par la méthode des quantiles. Cette méthode permet de réduire les variations artefactuelles, mettant ainsi l'emphase sur les variations biologiques et elle est la plus couramment utilisée dans ce type d'analyse. Cette méthode suppose que la distribution de l'abondance des gènes est quasiment la même dans tous les échantillons. Elle rend ainsi identique la distribution des intensités des sondes pour tous les échantillons.
- 3) Analyse statistique non supervisée. Cette première analyse présente avant tout un intérêt technique puisqu'elle permet d'évaluer le facteur d'échelle du bruit de fond et d'appréhender la proportion de gènes exprimés dans les différents échantillons. Si le nombre de sondes exprimées est identique dans tous les échantillons, on peut considérer le bruit de fond et la qualité technique de l'expérience comme satisfaisante. De plus, cette analyse permet d'étudier l'homogénéité des groupes Wt et Het, et éventuellement d'écarter un échantillon dont le profil général d'expression serait trop éloigné des autres.

Pour cette analyse, différents critères de stringence peuvent être utilisés en fonction de la représentation des sondes dans les échantillons. Si une sonde donnée est exprimée dans tous les échantillons ($p \text{ value} \leq 0,05$), on parle de représentation de 100% pour cette sonde. Si elle est exprimée dans la moitié ou plus des échantillons, sa représentation n'est que de 50%.

Les échantillons peuvent donc être clusterisés sans critère de stringence (toutes les sondes exprimées sont alors prises en compte), avec une représentation de 50% ou 100%.

4) Analyse statistique supervisée de comparaison des groupes expérimentaux.

Après avoir défini les deux groupes expérimentaux Wt et Het, le ratio Het/Wt est calculé pour chaque sonde et un test statistique de Student évalue si la différence du niveau d'expression est significative pour chaque sonde. Le ratio minimum retenu pour l'analyse était de 1,5, soit une expression différentielle de 50% entre les souris Wt et Het. De la même manière que pour l'analyse non supervisée, des critères de stringence peuvent être appliqués dans cette analyse.

Après cette première étape d'analyse statistique, une analyse ontologique et fonctionnelle des sondes différentiellement exprimées dans le cœur des souris Het comparées aux Wt a été réalisée avec les logiciels *FunNet* et *String Database*. En parallèle, les résultats de la puce ont été vérifiés par q-PCR. Je reviendrai plus loin sur la stratégie que nous avons choisi d'utiliser pour cette analyse.

Résultats

Analyse supervisée

Après avoir validé les aspects techniques de l'expérience, nous avons réalisé une analyse supervisée avec deux critères de stringence : sans filtre (liste « All ») et avec 50% de représentation des sondes dans les échantillons (liste « P50 »). Cette analyse a montré que les profils d'expression génique étaient bien distincts entre les cœurs des souris Wt et Het (Figure 25A et B).

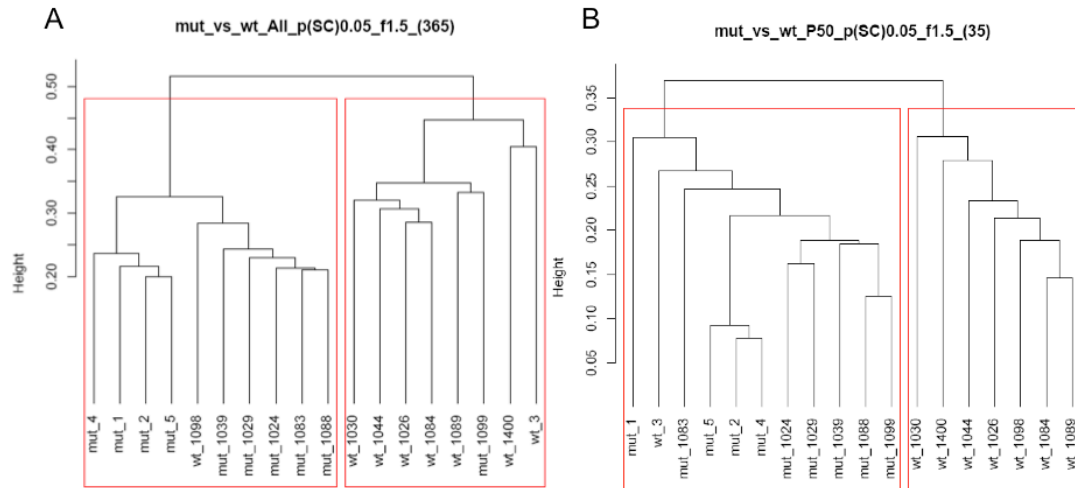


Figure 25. Répartition des animaux Wt et Het en fonction de leur profil d'expression génique.

Regroupement des animaux en fonction des profils d'expression des transcrits de la liste « All » (A) et de la liste « P50 » (B).

Dans l'analyse sans filtre de stingence, 365 transcrits sont différemment exprimés dans le cœur des souris Het : 157 transcrits sont surexprimés et 208 sont sous-exprimés chez les Het. Dans l'analyse avec 50% de représentation de transcrits, seuls 35 transcrits sont statistiquement exprimés de façon différente dans le cœur des animaux Het : 29 transcrits sont surexprimés et 6 sont sous-exprimés chez les Het (Tableau 9).

Tableau 9. Liste « P50 » des gènes différentiellement exprimés dans le cœur des souris Het.
 CH : chromosome, Score : valeur statistique du ratio. * gènes identifiés comme impliqués dans des fonctions ou pathologies cardiaques.

Gène	Protéine	CH	Annotation GO; Fonction ; Localisation	Score	Ratio Het/Wt
<i>Pde4dip*</i>	Phosphodiesterase 4D interacting protein ; Myomegalin	3	Enzyme binding ; myofibrilles, noyau, cytoplasme	0.030	2.56
<i>Trp53rk*</i>	Transformation related protein 53 regulating kinase	2	kinase ; membrane, noyau	0.007	2.33
<i>Gtse1*</i>	G two S phase expressed protein 1	15	Cytosquelette, microtubules	0.001	2.22
<i>Wars2*</i>	Tryptophanyl tRNA synthetase 2 (mitochondrial)	3	Traduction ; mitochondrie	0.005	2.13
<i>Ear4*</i>	eosinophil-associated ribonuclease A family, member 4	14	Endonuclease ; lysosome	0.025	2.08
<i>Tnc*</i>	Tenascin C	4	fibronectine, syndecan, integrin binding ; matrice extracellulaire	0.004	2.06
<i>D830027M14Rik</i>	inconnue	-	-	0.001	1.98
<i>Itgb1bp3*</i>	Integrin β 1 binding protein 3 ; muscle integrin binding protein (MIBP)	10	Ribosylnicotinamide kinase ; cytoplasmique	0.012	1.96
<i>Zfp553*</i>	Zinc finger protein 553	7	DNA binding, régulation de la transcription ; noyau	0.036	1.86
<i>Rnf208*</i>	Ring finger protein 208	2	Zinc binding ; -	0.004	1.85
<i>2310002L09Rik</i>	inconnue	-	-	0.002	1.85
<i>A930018I09Rik</i>	inconnue	-	-	0.002	1.77
<i>Igh-VJ558</i>	Immunoglobulin heavy chain (J558 family)	12	-	0.024	1.73
<i>Slc1a2*</i>	Solute carrier family 1 (glial high affinity glutamate transporter), member 2	2	Symport Glutamate/Na ⁺ ; membrane plasmique	0.019	1.71
<i>Rin1*</i>	Ras and Rab interactor 1	19	Activateur de GTPase, endocytose ; cytoplasme, cytosquelette, membrane	0.030	1.70
<i>Pacsin1*</i>	Protein kinase C and casein kinase substrate in neurons 1	17	kinase, organisation du cytosquelette, endocytose ; réseau trans-golgien	0.024	1.65

Gène	Protéine	CH	Annotation GO; Fonction ; localisation	Score	Ratio Het/Wt
<i>Dpep2</i>	Dipeptidase 2 (metallopeptidase)	8	métallopeptidase ; membrane	0.029	1.64
<i>E2f1*</i>	E2F transcription factor 1	2	Facteur de transcription, prolifération ; noyau	0.023	1.64
<i>Sfrs15*</i>	Serine/arginine rich splicing factor 15	-	-	0.047	1.64
<i>LOC384348</i>	inconnue	6	-	0.030	1.62
<i>G430064E20Rik</i>	inconnue	-	-	0.009	1.61
<i>Baalc*</i>	Brain and acute leukemia, cytoplasmic	15	- ; cytoplasme, noyau	0.039	1.60
<i>5830409B07Rik</i>	inconnue	4	-	0.008	1.58
<i>Pgm211*</i>	Phosphoglucomutase 2-like 1	7	glucose-1,6-biphosphate synthase ; cytosol	0.028	1.58
<i>scl0001356,1_58</i>	inconnue	-	-	0.041	1.57
<i>Kif22*</i>	Kinesin family member 22	7	Moteur moléculaire ; microtubule, noyau, fuseau mitotique	0.049	1.54
<i>H2-DMb2</i>	Histocompatibility 2, class II, locus Mb2	17	Présentation d'antigène ; membrane, lysosome	0.011	1.52
<i>Ear2</i>	eosinophil-associated, ribonuclease A family, member 2	14	Endonuclease ; noyau	0.014	1.52
<i>D830014E11Rik</i>	inconnue	5	-	0.028	1.51
<i>Clm3</i>	CMRF-35-like molecule 3	-	-	0.050	0.66
<i>Them4*</i>	Thioesterase superfamily member 4	3	thioestérase ; module phosphorylation d'Akt1	0.013	0.65
<i>Kctd14*</i>	Potassium channel tetramerisation domain containing 14	-	-	0.044	0.64
<i>scl0003985,1_232</i>	inconnue	-	-	0.017	0.63
<i>Car7*</i>	Carbonic anhydrase 7	8	carbonate déshydratase ; cytoplasme	0.046	0.61
<i>Cmya5*</i>	Cardiomyopathy associated 5, myospryn	13	Protéine binding ; Disque Z, interaction avec desmine, titine, alpha-actinine 2, dystrophine, PKA, calpaïne 3	0.015	0.50

Analyse *in silico* des résultats

Stratégie d'analyse différente des deux listes obtenues

Nous avons opté pour deux types différents d'analyse pour étudier les résultats des listes « All » et « P50 ». Au vue du grand nombre de transcrits détectés dans la liste « All », une analyse de type « ontologique » et « réseau d'interactions fonctionnelles » a été utilisée via les logiciels *FunNet* (<http://www.funnet.info>) et *String database* (<http://string-db.org>). Ces logiciels utilisent les bases de données d'annotations ontologiques pour déterminer s'il existe un « enrichissement » d'une classe de protéine (*FunNet*) ou pour construire des réseaux d'interaction fonctionnelle (*String database*), s'ils existent, entre les différentes protéines codées par les ARNm différenciellement exprimés dans les analyses de transcriptome.

Une analyse du même type a été faite à partir de la liste « P50 » via *String database*. Cette analyse a été complétée par une étude bibliographique pour identifier des « gènes d'intérêt » à partir des 35 ARNm identifiés.

Analyse de la liste « All »

Parmi les 157 transcrits surexprimés et les 208 transcrits réprimés dans le cœur des souris Het, seuls 95 et 122 transcrits respectivement, ont pu être identifiés comme associés à un gène. Les autres sont des transcrits de type « Riken » ou « LOC », correspondant à des transcrits identifiés par criblage de banques d'ARNm mais dont le gène est inconnu à l'heure actuelle. A partir de ceux deux listes de transcrits, le logiciel *FunNet* analyse les classes ontologiques pour identifier les fonctions moléculaires, les composants cellulaires et les processus biologiques auxquels appartiennent chaque protéine codée par ces transcrits, si elles ont été annotées précédemment. En plus, *FunNet* compare le nombre de transcrits différenciellement exprimés au nombre total de transcrits de chaque catégorie ontologique représentée sur la puce, et détermine ainsi, si certaines fonctions biologiques, cellulaires ou moléculaires sont particulièrement modifiées dans l'expérience. Les profils obtenus sont présentés sur la figure 26.

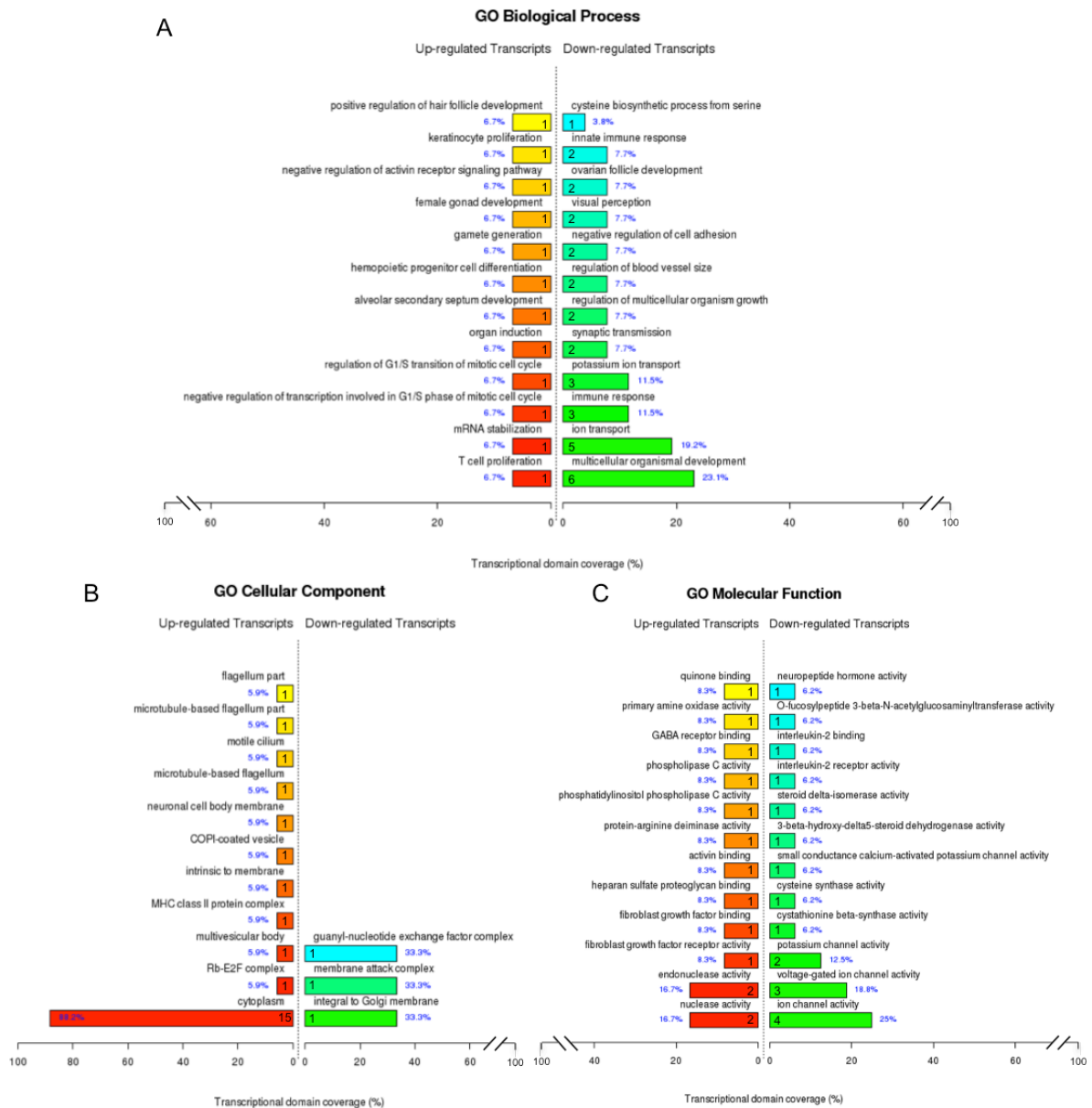


Figure 26. Analyses ontologiques réalisées avec le logiciel Funnet.

(A) Processus biologiques dérégulés dans le cœur des souris Het.

(B) Compartiments cellulaires auxquels appartiennent les transcrits dérégulés dans le cœur des souris Het.

(C) Fonctions moléculaires correspondant aux transcrits dérégulés dans le cœur des souris Het.

Les % indiquent l'enrichissement relatif de ces catégories parmi toutes les transcrits dérégulés dans le cœur des Het. Les chiffres indiquent le nombre de transcrits dérégulés dans le cœur des souris Het et annotés dans chaque catégorie.

L'analyse de ces profils indique qu'aucun processus biologiquement annoté n'est particulièrement altéré dans le cœur des souris Het de cet âge. En effet, seul un transcrit de chaque catégorie est surexprimé dans notre expérience (Figure 26A, colonne de gauche ; gènes « up-régulés »). On note un enrichissement très relatif des transcrits correspondant aux processus de développement (23,1%) et du transport ionique

(19,2%) parmi les transcrits réprimés (Figure X A, colonne de droite ; gènes « down-régulés »). En matière de compartimentation cellulaire, 88,2% des transcrits surexprimés annotés codent des protéines retrouvées dans le cytoplasme (Figure 26A, colonne de gauche). En concordance avec les résultats de l'analyse des processus biologiques, la fonction moléculaire des protéines codées par les principaux transcrits réprimés est de type « canal ionique » (Figure 26A, colonne de droite). Seuls 5 gènes ont été identifiés :

- *Cacng1* : code la sous-unité $\gamma 1$ du canal calcique voltage dépendant de type L (*calcium channel, voltage-dependent, gamma subunit 1*). Cette protéine est exprimée dans le cœur et le muscle squelettique chez la souris. Elle régule négativement la conductance calcique de la sous-unité $\alpha 1$ du canal et est ainsi impliquée dans le couplage excitation-contraction dans le muscle squelettique (Ahern et al, 2001 ; Magnusson et al, 2005).

- *Kcnn2* : code le canal à conductance potassique faible ou intermédiaire activé par le calcium (*potassium intermediate/small conductance calcium-activated channel, subfamily N, member 2*). Ce canal est exprimé dans les oreillettes et la diminution de son expression est responsable de la prolongation du potentiel d'action et de fibrillation atriale chronique chez l'homme (Li et al, 2009; Yu et al, 2012).

- *Kcnj15* : code le canal potassique rectifiant entrant (*potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 15*). Ce gène, codant le canal Kir4.2, est localisé dans la région chromosomique associée au syndrome de Down chez l'homme (Thiery et al, 2000). Ce locus a été associé à un syndrome de QT long dans une famille australienne (Summers et al, 2010).

- *Kcns2* : code le canal potassique voltage dépendant (*potassium voltage-gated channel, subfamily S, 2*). Ce gène, codant le canal Kir9.2, ne serait *a priori* pas exprimé dans le cœur chez la souris (Salinas et al, 1997). Ce canal n'est pas à proprement parlé un canal potassique en lui-même mais il régule l'activité du canal potassique Kv2.1 et du canal potassique Kv2.2, exprimés eux dans le cœur (Hwang et al, 1992).

- *Cnm1* : code la cycline M1. Cette protéine, localisée à la membrane plasmique des neurones de l'hippocampe chez la souris, contient quatre domaines transmembranaires. Par homologie avec la protéine bactérienne CorC, la cycline M1 serait impliquée dans le transport ionique chez les mammifères (Wang et al, 2004).

Comme je l'ai indiqué dans l'introduction de ce mémoire, les lamines A/C participent à la régulation de l'expression génique en modulant le positionnement de certaines régions chromatinienne à la périphérie nucléaire (Meaburn et al, 2007). Je me suis aussi intéressée à la localisation chromosomique des gènes dérégulés dans le cœur des souris Het. La souris possède 19 paires d'autosomes et une paire de gonosomes. La répartition chromosomique des transcrits est représentée sur la figure 27.

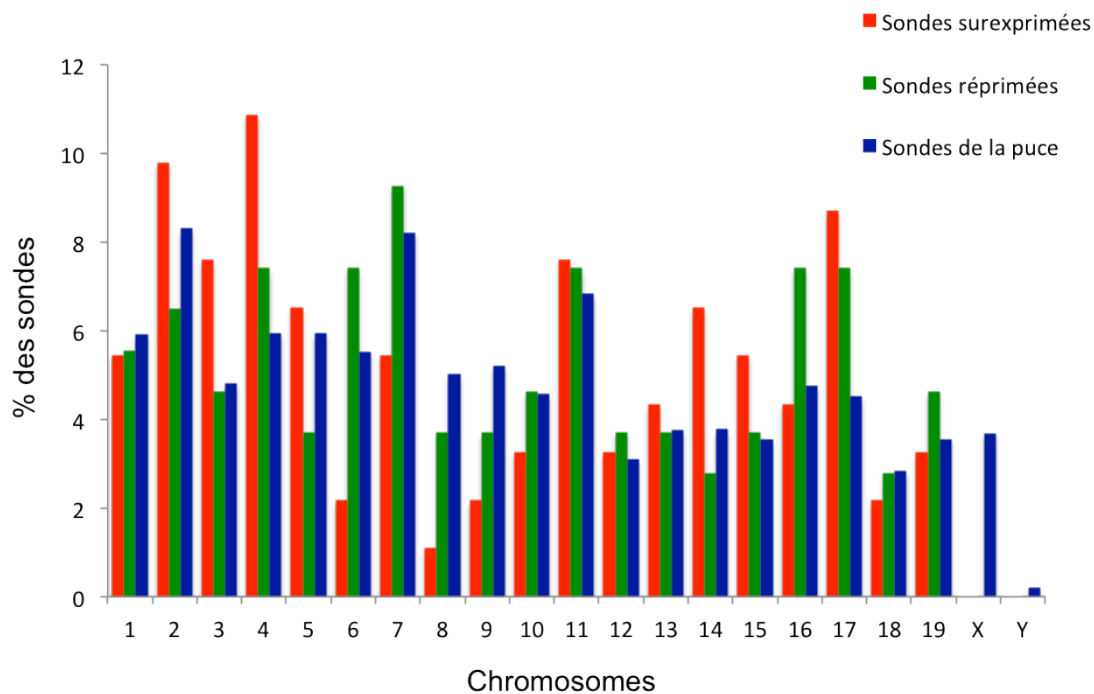


Figure 27. Répartition des transcrits surexprimés et réprimés dans le cœur des souris Het en fonction de leur position chromosomique, comparés à tous les transcrits de la puce.

Les résultats de cette analyse indiquent qu'aucun gène dérégulé dans le cœur des souris Het n'est localisé sur les chromosomes sexuels. Les gènes surexprimés sont principalement localisés sur les chromosomes 2, 3, 4 et 17. Les gènes réprimés eux sont principalement localisés sur les chromosomes 4, 6, 7, 16 et 17. Il est difficile d'aller plus loin dans cette analyse, étant donné le faible nombre de transcrits identifiés et annotés.

Analyse de la liste « P50 »

Les résultats de l'analyse de cette liste via le logiciel *String database* sont présentés figure 28.

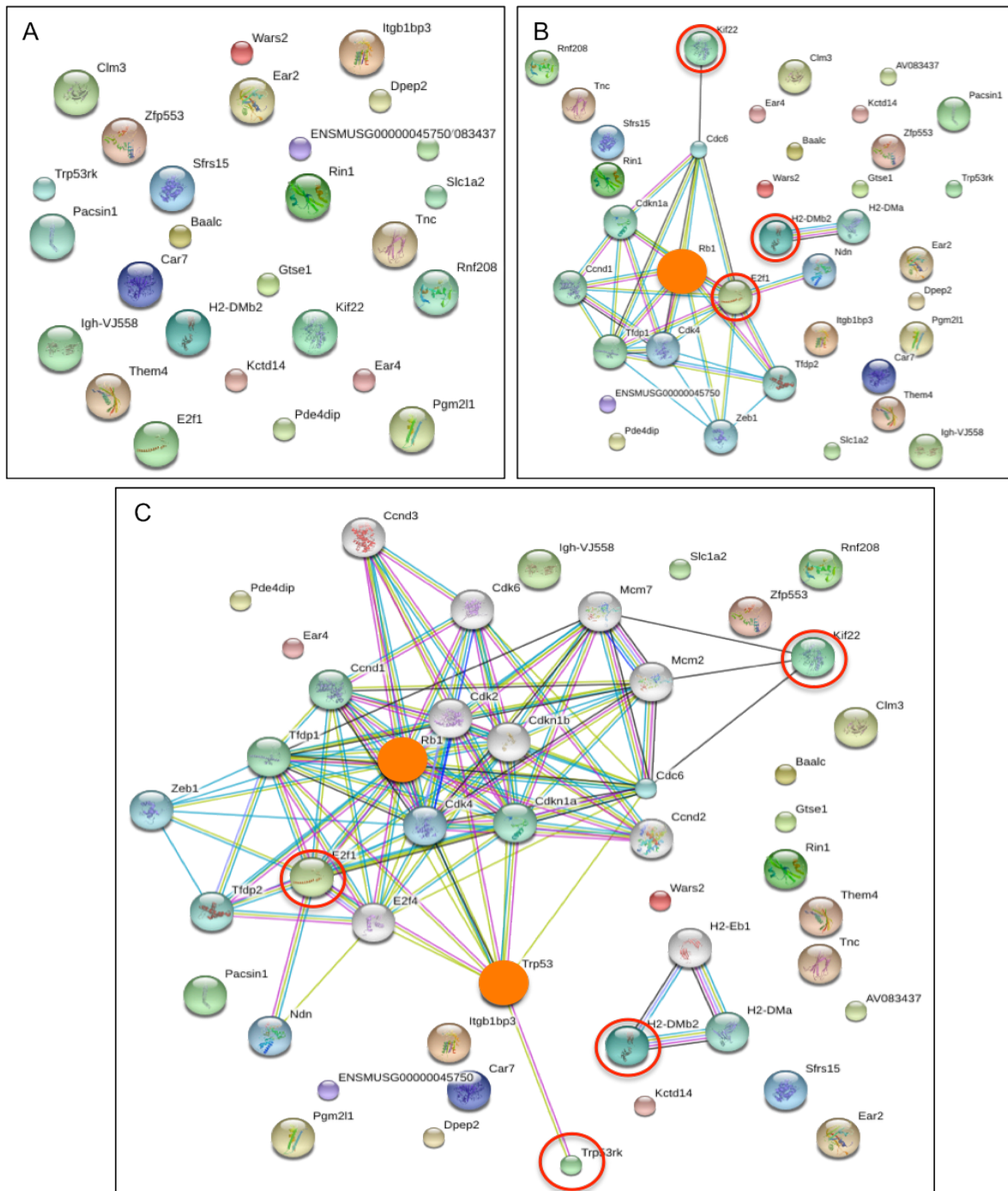


Figure 28. Réseau d'interactions fonctionnelles des gènes de la liste « P50; FC 1,5 » prédit par le logiciel String Database (<http://string-db.org>)

(A) Liste « brute » sans ajout de partenaires connus.

(B) Elargissement du réseau par l'ajout de 10 partenaires répertoriés dans les bases de données.

(C) Elargissement du réseau B par l'ajout de 10 partenaires supplémentaires répertoriés dans les bases de données. Sont cerclés de rouge les gènes identifiés par la puce et faisant partie du réseau.

Le panel A montre qu'aucune interaction fonctionnelle directe n'a été décrite entre les protéines codées par ces 35 transcrits dérégulés dans le cœur des souris Het. En élargissant le « cercle » des interactions (panel B), il apparaît que deux de ces protéines (Kif22 et E2f1, cerclé de rouge dans le panel B) appartiennent à un réseau fonctionnel

centré sur la protéine Rb1 (cercle orange sur le panel B). En élargissant encore, la protéine Trp53 (autrement appelée p53) forme l'autre « nœud » central d'un réseau parallèle et interagissant avec le réseau de la protéine Rb1. Cette protéine p53 est notamment régulée par Trp53rk, une kinase dont le transcrit est surexprimé dans le cœur des souris Het dans cette étude (Tableau 9).

Nous avons recherché si les gènes dérégulés dans le cœur des souris Het avaient déjà été montrés comme différentiellement exprimés dans d'autres contextes pathologiques cardiaques. Pour cela, nous avons interrogé la base de données GEO profiles (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geoprofiles>), rassemblant les données d'études de profils d'expression. Sur les 35 gènes de notre étude, 21 gènes ont été impliqués dans des modèles d'hypertrophie ou de cardiomyopathies, ou dans des voies de signalisation régulant la fonction cardiaque (signalés par une * dans le tableau 9). On peut citer notamment des études sur des cardiomyocytes néonataux traités à la phényléphrine ou étirés (Frank et al, 2008), sur l'hypertension (Schroen et al, 2007), sur l'hypertrophie cardiaque induite par l'exercice (Galindo et al, 2009), sur des cardiomyopathies dilatée (Barth et al, 2006; Kittleson et al, 2005), ischémiques (Andersson et al, 2006; Harpster et al, 2006; Lachtermacher et al, 2010), induite par l'isoprotérénol (Galindo et al, 2009), par la déficience en facteurs de transcription spécifiques (Mef2A, FOG2) (Durham et al, 2006; Zhou et al, 2009), par pacing (Ojaimi et al, 2007)... Ces gènes sont aussi dérégulés en réponse à l'activation de voies MAPK (surexpression de p38 chez le rat, de Ras activée ou de MKK3b chez la souris, activant respectivement les voies ERK et p38) (Mitchell et al, 2006; Tenhunen et al, 2006), ou encore dans des modèles de dystrophies musculaires associées à une cardiomyopathie comme chez la souris *mdx* (déficiente en dystrophine) (Porter et al, 2004; Reynolds et al, 2008), la souris *Emd*^{y/-} (Muchir et al, 2007a) ou la souris *Lmna*^{H222P/H222P} (Muchir et al, 2007b). Enfin, *Pacsin1* et *Pgm2l1* sont surexprimés dans les processus de régénération cardiaque après amputation d'un fragment de cœur chez le poisson-zèbre (Sleep et al, 2010).

Le degré de variation d'expression de ces gènes est variable d'une étude à l'autre.

Validation technique de la puce

En parallèle de l'analyse *in silico*, nous avons analysé la fiabilité technique des résultats de la puce. Pour ce faire, nous avons choisi d'analyser par qPCR le niveau d'expression de 11 gènes de la liste « P50 » dont le niveau de variation était parmi les plus hauts ou les plus bas (entre 1,54 et 2,56 et entre 0,50 et 0,54), avec un score statistique moyen à élevé ($0,049 \leq p \leq 0,004$) : *Kif22*, *Gste1*, *E2f1*, *Tnc*, *D830027M14Rik*, *Pde4dip*, *Itgb1bp3* (*MIBP*), *Trp53rk*, *Rin1*, *Kcct14*, *Cyma5*. Les résultats, présentés figure 29, se sont révélés décevants.

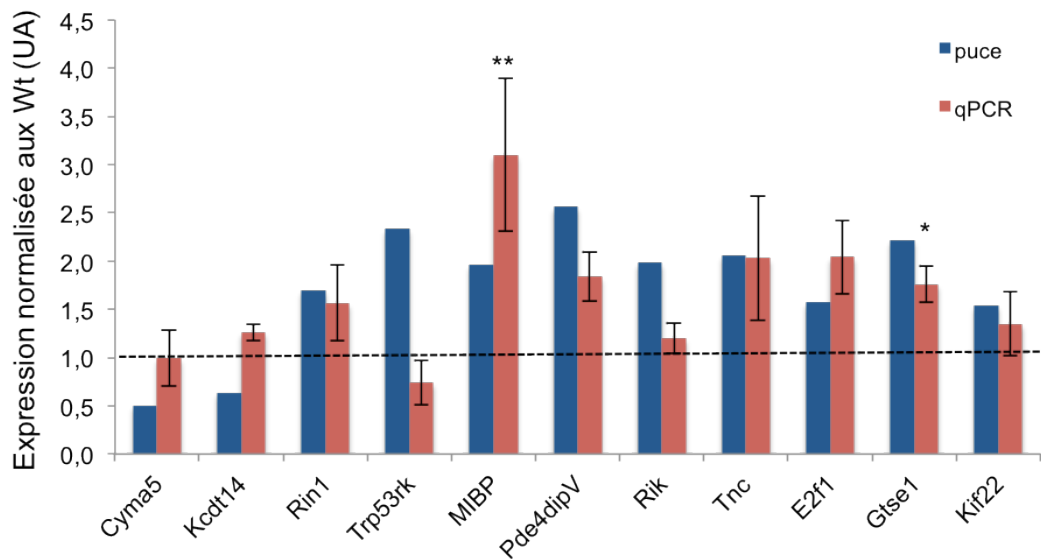


Figure 29. Niveau d'expression dans le cœur des souris Het des gènes choisis pour la validation technique de la puce.

Les niveaux d'expression sont normalisés au niveau d'expression dans le cœur des souris Wt et la ligne en pointillé indique le niveau d'expression des gènes dans le cœur des souris Wt. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ comparé aux souris Wt. Moyenne \pm SEM. (n=3 dans chaque groupe)

En effet, nous n'avons pas reproduit les variations observées sur la puce. Les niveaux d'expression de certains gènes sont très hétérogènes. Il est à noter que l'échantillonnage reste assez faible et demande à être complété. En revanche, l'expression de *Gtse1* et *MIBP* (Muscle Integrin Binding Protein) s'est révélée effectivement modifiée dans le cœur des souris Het.

Gtse1 est une protéine associée aux microtubules (Utrera et al, 1998). Elle est induite par p53 et en réponse à des dommages de l'ADN (Utrera et al, 1998) et inhibe l'action de p53 en interagissant directement et empêchant ainsi la localisation nucléaire de p53 (Monte et al, 2003). Elle joue donc un rôle anti-apoptotique.

MIBP, aussi appelé Itgb1bp3 ou NRK2 (Nicotinamide Riboside Kinase) est une protéine kinase spécifiquement exprimée dans le muscle strié squelettique et cardiaque. Elle s'associe aux intégrines et est impliquée dans la voie de biosynthèse du NAD (Nicotinamide Adénine Dinucléotide). *MIBP* est fortement exprimé dans les cellules souches embryonnaires et est réprimé pendant la différenciation en cardiomyocytes (Barberi et al, 2005 ; Cao et al, 2008). Dans le cœur adulte, son induction est liée à l'altération de la biogénèse mitochondriale (Dufour et al, 2007) et à l'ischémie (Lachtermacher et al, 2010).

De façon intéressante, *MIBP* est aussi surexprimé dans le cœur des souris *Lmna*^{H222P/H222P} (Muchir et al, 2007b), dans le cœur des souris déficientes en émerine (Muchir et al, 2007a) et dans un modèle de cardiomyopathie dilatée due à la déplétion du facteur de transcription SRF (*Serum Response Factor*, N. Diguët et M. Merisckay, données non publiées). Dans le cœur des souris *Lmna*^{H222P/H222P} âgées de 10 semaines, présentant les premiers signes de dysfonction cardiaque, l'expression de *MIBP* est augmentée d'un facteur 20 comparée aux souris Wt.

MIBP est surexprimé d'un facteur 2,3 et 10,5 dans le cœur des souris Het âgées de 10 et 57 semaines, respectivement (Figure 30). Cependant, la variabilité des niveaux d'expression est plus grande chez les souris Het de 57 semaines que chez les souris Het de 10 semaines, expliquant l'absence de significativité du résultat à 57 semaines.

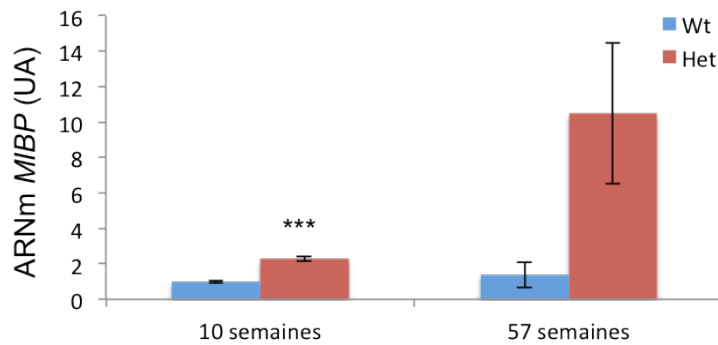


Figure 30. Niveau d'expression de *MIBP* dans le cœur des souris Het et Wt âgées de 10 et 57 semaines.

*** $p < 0,01$. Moyenne \pm SEM. (n=13 souris Het et 11 souris Wt à 10 semaines, n= 5 souris Het et Wt à 57 semaines)

Discussion

Cette étude n'a pas mis en évidence de signature moléculaire claire dans le cœur de souris Het avant l'apparition des signes de dysfonction cardiaque. Ceci pourrait s'expliquer par l'âge des animaux. Une étude similaire réalisée plus tardivement apporterait sans doute plus d'informations. Un âge plus propice pour identifier les premiers mécanismes pathologiques liés à la mutation serait l'âge de 17 semaines, âge correspondant aux souris étudiées dans la partie II des résultats. On peut en effet supposé qu'à cet âge, précédant d'environ 5 semaines l'apparition des premiers signes de dysfonction cardiaque, les mécanismes délétères sont déjà à l'œuvre dans le cœur des animaux Het.

Une autre explication à ce manque de résultats est d'ordre technique. L'utilisation de ce type de puces mono-couleur Illumina est assez récent et encore limité. Dans les études d'analyse de transcriptome publiées, le nombre d'études utilisant des puces Illumina est dix fois inférieur à celui d'études utilisant des puces Affymetrix. Malgré les analyses statistiques standardisées et les contrôles internes, on ne peut pas exclure un biais lié au bruit de fond dans ce type de techniques. De plus, un problème récurrent lié aux analyses transcriptomiques est que l'analyse *in silico* des résultats dépend grandement de la richesse et de la qualité d'annotation ontologique des sondes (Figure 31). Ainsi, plus le nombre de gènes dérégulés appartenant à la même catégorie ontologique est important, plus la puissance sera grande. Les analyses transcriptomiques sont donc, à mon sens, plus adaptées pour mettre en évidence des différences majeures entre différentes

populations biologiques que pour identifier des variations fines, liés au stade précoce chez nos souris Het.

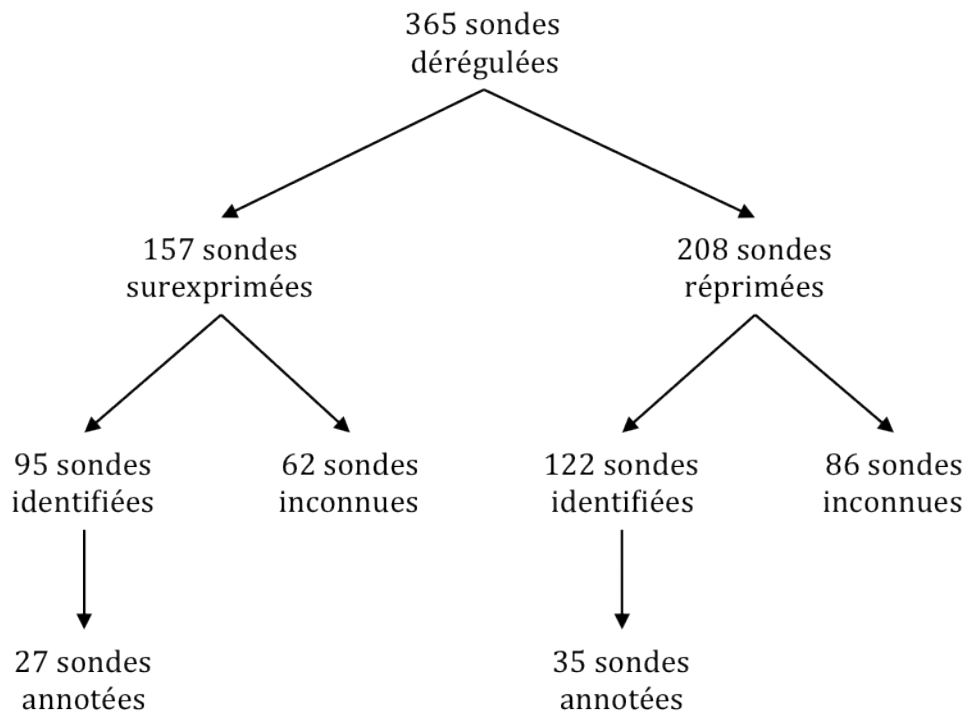


Figure 31. Arbre d'identification et d'annotation des 365 transcrits de la liste « All ».

L'identification des sondes a été faite à partir du nom des gènes grâce au logiciel *Source* (<http://smd.stanford.edu/cgi-bin/source/sourceSearch>). L'annotation a été faite grâce au logiciel *FunNet*.

Cependant, quelques informations intéressantes ont émergé de cette analyse :

1) L'analyse *in silico* de la liste « All » a révélé que la catégorie moléculaire principalement réprimée dans le cœur des souris Het, bien que modeste, correspond à des canaux ioniques potassiques et calciques. Une dysfonction de ces canaux a été impliquée dans des pathologies rythmiques comme le syndrome de QT long ou la fibrillation atriale. En revanche, aucun défaut rythmique ou conducteur n'a été observé chez les souris Het par l'enregistrement ECG sur animaux conscients. Ces résultats de niveau d'expression sont à valider par qPCR mais s'ils se confirment, une étude électrocardiographique plus fine sur des enregistrements plus longs réalisés par télémétrie permettrait peut-être d'observer des anomalies discrètes du rythme chez les souris Het.

2) L'analyse *in silico* de la liste « P50 », plus stringente que la première liste, a révélé que quatre gènes surexprimés dans le cœur des souris Het (*Kif22*, *E2f1*, *Gtse1*, *Trp53rk*) peuvent être associés de façon plus ou moins directe aux voies de signalisation des protéines Rb et p53, deux protéines dites suppresseur de tumeur. Ces deux facteurs de transcription sont impliqués dans la transcription de gènes régulant l'arrêt du cycle cellulaire, l'apoptose, la réparation de l'ADN et la sénescence.

Ces résultats sont particulièrement intéressants dans le contexte d'une mutation des lamines A/C conduisant à une atteinte cardiaque. En effet, comme je l'ai indiqué dans l'introduction de ce mémoire, la protéine Rb interagit directement avec les lamines au niveau du nucléoplasme. Au niveau cardiaque, Rb est impliqué dans la différenciation cardiogénique (Papadimou et al, 2005) et l'altération de la voie Rb/E2F conduit à des défauts myocardiques létaux (Cloud et al, 2002 ; Ziebold et al, 2001). La phosphorylation de Rb et l'activation de E2F sont, de plus, nécessaires au développement de l'hypertrophie de cardiomyocytes en culture (Hinrichsen et al, 2008). En revanche, les souris déficientes pour Rb développent une réponse hypertrophique plus importante que les souris sauvages en réponse à une constriction de l'aorte thoracique (Angelis et al, 2008). Ces études soulignent l'importance de Rb dans le développement et la réponse adaptative du cœur.

p53 joue un rôle clé dans l'adaptation cellulaire en réponse à une large variété de *stimuli* de stress comme l'hypoxie, le stress oxydatif ou infectieux... Dans le système cardiovasculaire en particulier, il est impliqué dans le développement de l'insuffisance cardiaque, l'athérosclérose, l'angiogenèse, la sénescence cellulaire et le métabolisme, notamment (Fujita & Ishikawa, 2011). Une méta-analyse réalisée à partir de 7 études d'expression génique de cœurs de patients souffrant de cardiomyopathie dilatée a révélé que les principaux gènes dérégulés appartenaient à la voie de signalisation de p53 (Asakura & Kitakaze, 2009). De plus, p53 est augmenté et associé à des processus d'apoptose dans les cardiomyocytes de biopsies myocardiques provenant de patients en insuffisance cardiaque transplantés (Song et al, 1999). L'augmentation et l'activation de p53 apparaissent donc comme délétères pour la fonction cardiaque.

Ces deux voies sont à explorer plus en détails dans le cœur des souris Het.

3) Comme je l'ai indiqué plus haut, MIBP, aussi appelé Itgb1bp3 ou NRK2 (Nicotinamide Riboside Kinase) est une protéine kinase spécifiquement exprimée dans le muscle strié squelettique et cardiaque. Elle s'associe aux intégrines (Li et al, 1999) et est impliquée dans la voie de biosynthèse du NAD (Nicotinamide Adénine Dinucléotide). Ce cofacteur des réactions d'oxydo-réduction est aussi utilisé par les PARP (Poly-ADP-Ribosyl Polymérase), impliquées dans la réparation de l'ADN et l'apoptose (Chen et al, 2004); et les Sirtuines, enzymes déacétylases, impliquées dans la longévité, la transcription et le blocage de la réponse hypertrophique (Alcendor et al, 2007 ; Sundaresan et al, 2009). Les PARP et les Sirtuines sont aussi impliquées dans le remodelage chromatinien (Ghosh et al, 2010). La surexpression de MIBP pourrait donc être liée à une surconsommation de NAD par ces enzymes pour répondre à un stress cellulaire ou des dommages de l'ADN dans le cœur des souris Het. Pour valider cette hypothèse, il serait nécessaire de mesurer le niveau de NAD et d'évaluer d'éventuels défauts de l'ADN dans le cœur des souris Het.

Alternativement, l'induction de MIBP pourrait s'inscrire dans des processus de remodelage métabolique précoces dans le cœur des souris Het. En effet, le NAD est un cofacteur essentiel à la glycolyse et au métabolisme oxydatif. Toutes les analyses réalisées sur les souris Het n'ont pas mis en évidence de défaut métabolique chez ces animaux. En revanche, les souris homozygotes *Lmna*^{ΔK32/ΔK32} montrent des désordres métaboliques majeurs (hypoglycémie sévère, absence de tissu adipeux sous-cutané...) conduisant au décès précoce (Bertrand et al, 2012). On ne peut donc pas exclure que les lamines A/C mutées joueraient un rôle discret mais délétère sur le métabolisme cardiaque, prélude au changement métabolique associé à l'insuffisance cardiaque.

Enfin, l'induction de MIBP pourrait être intégrée dans des processus de mécanotransduction dans le cœur des souris Het. Il a été montré que MIBP, en interagissant avec les intégrines et la paxilline joue un rôle dans la régulation des complexes d'adhésion cellule-matrice et participe ainsi à la morphogenèse chez le poisson-zèbre (Goody et al, 2010) et à la différenciation myogénique des myoblastes C2C12 de souris (Li et al, 1999). L'équipe de M. Merisckay a montré que MIBP est localisé au niveau des disques intercalaires dans le cœur de souris adulte et est augmenté dans la cardiomyopathie dilatée induite par la délétion du facteur SRF (Diguett

et al, 2011 ; données non publiées). Cependant, à l'heure actuelle, le rôle de MIBP dans la physiologie cardiaque reste très peu connu.

Implication des voies MAP kinases

Problématique

Comme indiqué en introduction, l'activation des voies MAPK ERK1/2 et JNK a été mise en évidence dans le cœur des souris *Lmna*^{H222P/H222P} et des souris *Emd*^{-/y}, deux modèles développant une CMD. La question s'est posée quant à l'activation de ces voies dans le cœur des souris *Lmna*^{ΔK32}, constituant ainsi un mécanisme canonique à l'origine de la CMD liée à des défauts de l'enveloppe nucléaire.

Méthodes d'étude utilisées

L'activation des voies MAPK se fait par phosphorylation. Une fois activées, ces kinases phosphorylent à leur tour leurs cibles et régulent notamment l'expression de gènes à induction précoce ou *immediate early genes*.

Dans notre étude, l'évaluation du niveau d'activation des voies ERK1/2 et JNK1 a été évaluée à deux échelons de la cascade de signalisation.

1) Le degré d'activation de ces kinases a été évalué directement par Western blot. La proportion de ERK1/2 et JNK1 phosphorylées a été quantifiée grâce à l'utilisation d'anticorps reconnaissant spécifiquement les sites phosphorylés de ces protéines et rapportée au signal des formes totales de ERK1/2 et JNK1.

2) L'activation transcriptionnelle de certaines cibles en aval de ERK1/2 et JNK1 a été évaluée par PCR quantitative. J'ai mesuré le niveau d'expression de quatre gènes cibles communs des deux voies : *Elk1*, *Elk4*, *c-jun* et *JunD*. Les protéines Elk1 et Elk4 font partie de la famille des facteurs du complexe ternaire ou TCF (Ternary Complex Factor). Ces protéines s'associent au facteur SRF et induisent la transcription de gènes dont le promoteur contient un élément de réponse au sérum (SRE), comme c'est le cas du gène *c-fos* par exemple (Dalton & Treisman, 1992 ; Herrera et al, 1989). Les protéines c-jun et JunD s'associent au facteur c-fos et forment le complexe transcriptionnel AP-1 (Activating Protein-1) (Hai & Curran, 1991).

Comme pour le reste des analyses faites sur les souris Wt et Het, ces études ont été réalisées dans le cœur et le muscle *gastrocnemius* de souris âgées de 10, 30 et 57 semaines pour les raisons précédemment évoquées.

Afin d'évaluer une activation de ces voies chez les souris homozygotes *Lmna*^{ΔK32/ΔK32} (Hom), j'ai aussi analysé des cœurs de souris Wt, Het et Hom âgées de 2 semaines.

Résultats

Activation des MAP kinases

Les résultats de quantification des westerns blot présentés figure 32 n'ont pas révélé d'activation statistiquement significative de ERK1, représentée par le ratio ERK1 phosphorylé (p-ERK1) sur ERK1 total, dans le cœur des souris Het et Hom comparées aux souris Wt âgées de 2 semaines (p=0.125, ANOVA à un critère).

Ceci peut s'expliquer par le petit échantillonnage biologique utilisé pour cette expérimentation (3 et 4 animaux par groupe). Cependant, on note une tendance à l'augmentation de ce ratio, bien que modeste (x2.2), chez les souris Hom comparées aux souris Wt (p=0.054, Student t-test). Ce résultat est à confirmer sur d'autres échantillons.

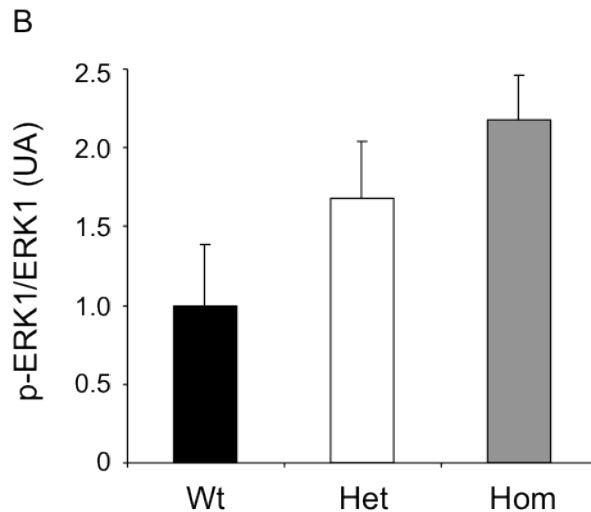
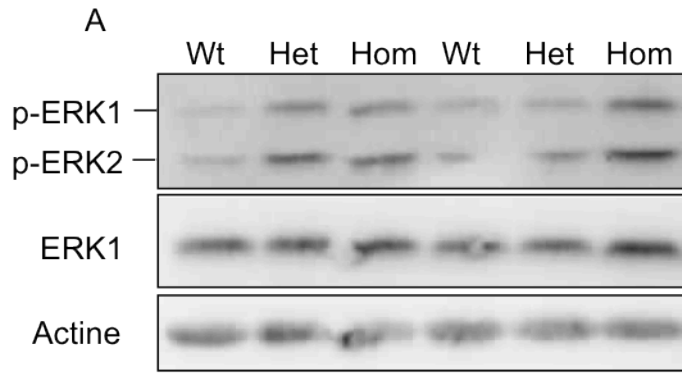


Figure 32. Activation de la voie ERK1 dans le cœur des souris Wt, Het et Hom âgées de 2 semaines.

(A) Western blot montrant le niveau de ERK1/2 phosphorylé et ERK1 total. L'actine est utilisée comme contrôle.

(B) Quantification du western blot. Moyenne \pm SEM. (n=3 Wt, 4 Het et 4 Hom).

En revanche, l'activation de la voie ERK1 dans le cœur d'animaux Het de 10 semaines est nette (x1.9) (Figure 33A et B). Elle est cependant transitoire puisque le niveau revient à celui observé dans le cœur des souris Wt à 30 et 57 semaines. Le niveau d'activation de ERK1 est positivement corrélé à la fonction cardiaque des animaux Het (Figure 33C).

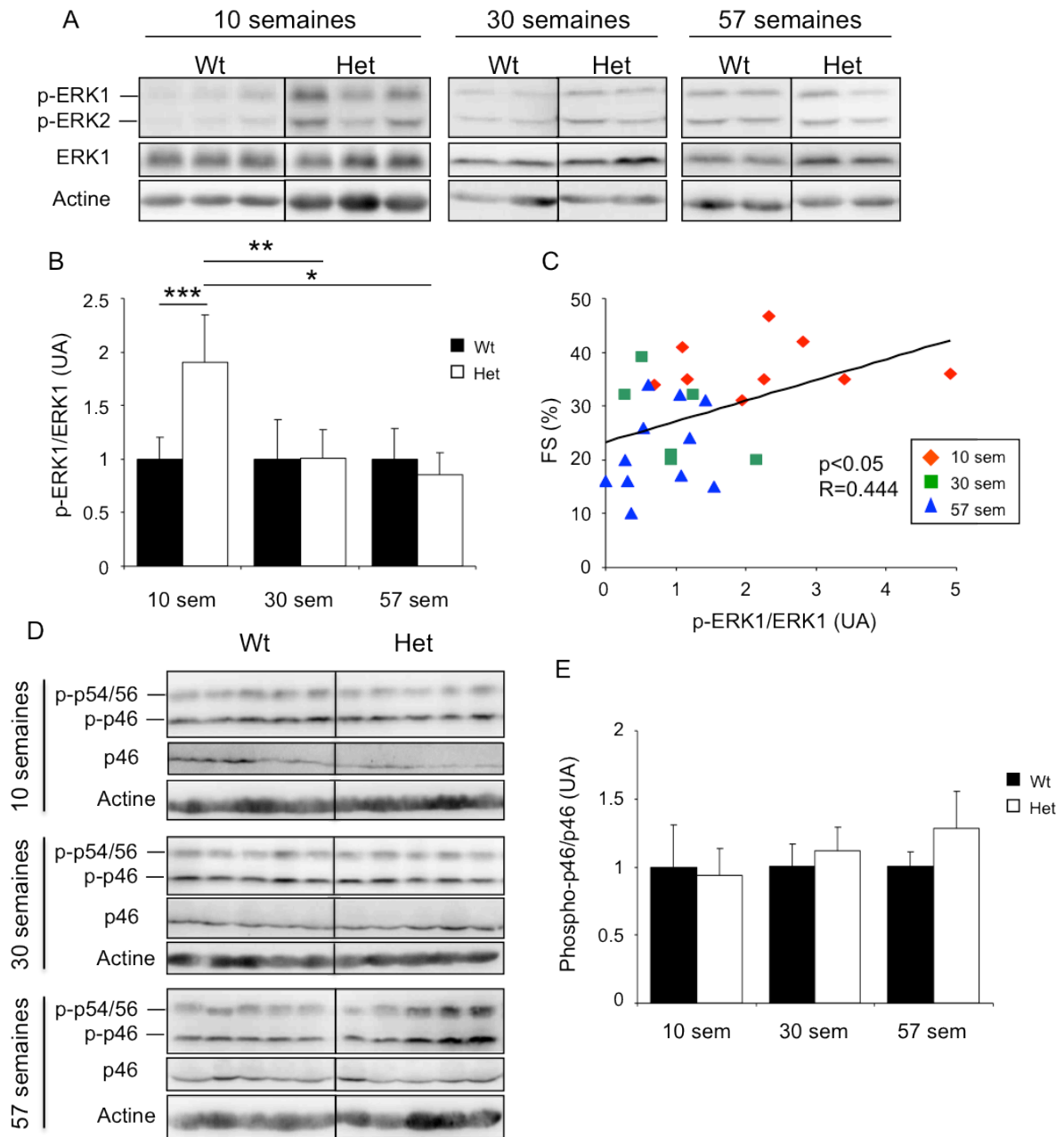


Figure 33. Activation des voies MAP kinases ERK1/2 et JNK dans le cœur des souris Wt et Het âgées de 10, 30 et 57 semaines.

(A) Western blot montrant ERK1/2 phosphorylé et ERK1 total. (B) Quantification du western blot. Moyenne \pm SEM. (n=9 à 10 sem, n=6 à 30 sem et n=13 à 57 sem). Analyse statistique ANOVA à 2 critères, Holm-Sidak test pour comparaison multiple. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. (C) Corrélation positive entre le niveau d'activation de la voie ERK1 et la fonction cardiaque (valeurs p-ERK1/ERK1 normalisées au Wt du même âge; FS: fraction de raccourcissement) (n=9 à 10 sem, n=6 à 30 sem, n=13 à 57 sem). Test de corrélation de Pearson.

(D) Western blot montrant JNK phosphorylé (p-p54/56 et p-p46) et JNK isoforme p46 total. (E) Quantification du signal phospho-p46 / p46. Moyenne \pm SEM. (n=7 à 10 sem, n=6 à 30 sem et n=6 à 57 sem). L'actine est utilisée comme contrôle pour les western blots.

De façon intéressante, aucune activation de cette kinase n'a pu être mise en évidence dans le muscle *gastrocnemius* des souris Het quelque soit l'âge testé (Figure 34). Il est à

noter la grande variabilité des niveaux de phosphorylation de ERK1/2 dans le muscle *gastrocnemius* aux différents âges, peut-être due à un problème de préparation des échantillons.

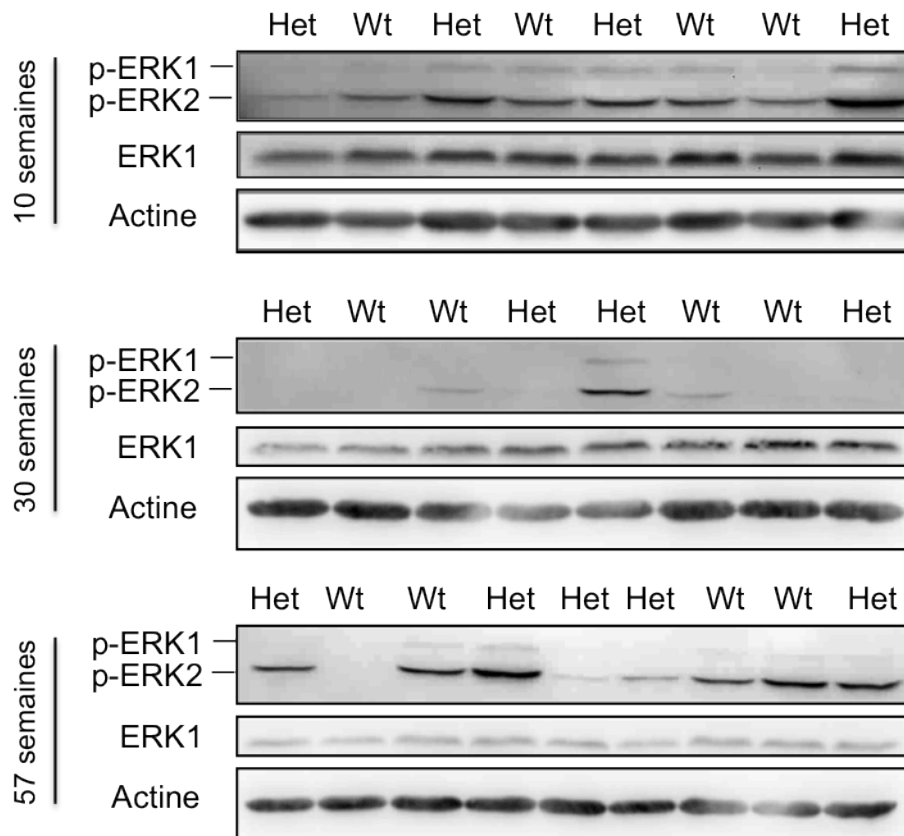


Figure 34. Analyse de la voie MAP kinases ERK1/2 dans le muscle *gastrocnemius* des souris Wt et Het âgées de 10, 30 et 57 semaines.

Western blot montrant le niveau de ERK1/2 phosphorylé et ERK1 total. L'actine est utilisée comme contrôle.

Aucune activation de la voie JNK n'a été observée dans le cœur des souris Het quelque soit l'âge (Figure 33D et E).

Transcription des gènes cibles

L'activation de ERK1/2 à 10 semaines ne se traduit cependant pas par une augmentation de l'expression des *immediate early genes* *Elk1*, *Elk4*, *c-jun* et *JunD* (Figure 35), même s'il existe une tendance à l'augmentation du niveau d'ARNm *Elk1* à cet âge. De façon surprenante, en revanche, l'expression des gènes *Elk1* et *JunD* est statistiquement

augmentée dans le cœur des souris Het âgées de 57 semaines comparés aux souris Wt du même âge ($p=0.016$ et $p=0.034$, respectivement), lorsque l'activation de ERK1/2 est revenue au niveau des cœurs Wt. Ceci semble être du à la légère diminution du niveau d'expression de *Elk1* et *JunD* dans le cœur des souris Wt de cet âge, plutôt qu'à l'augmentation à proprement parler des niveaux d'expression dans le cœur des souris Het. Le niveau d'expression de *Elk4* et *c-jun* n'est pas différent dans le cœur des souris Het et Wt, malgré une tendance à l'augmentation de l'expression de *c-jun* dans le cœur des souris Het âgées de 57 semaines.

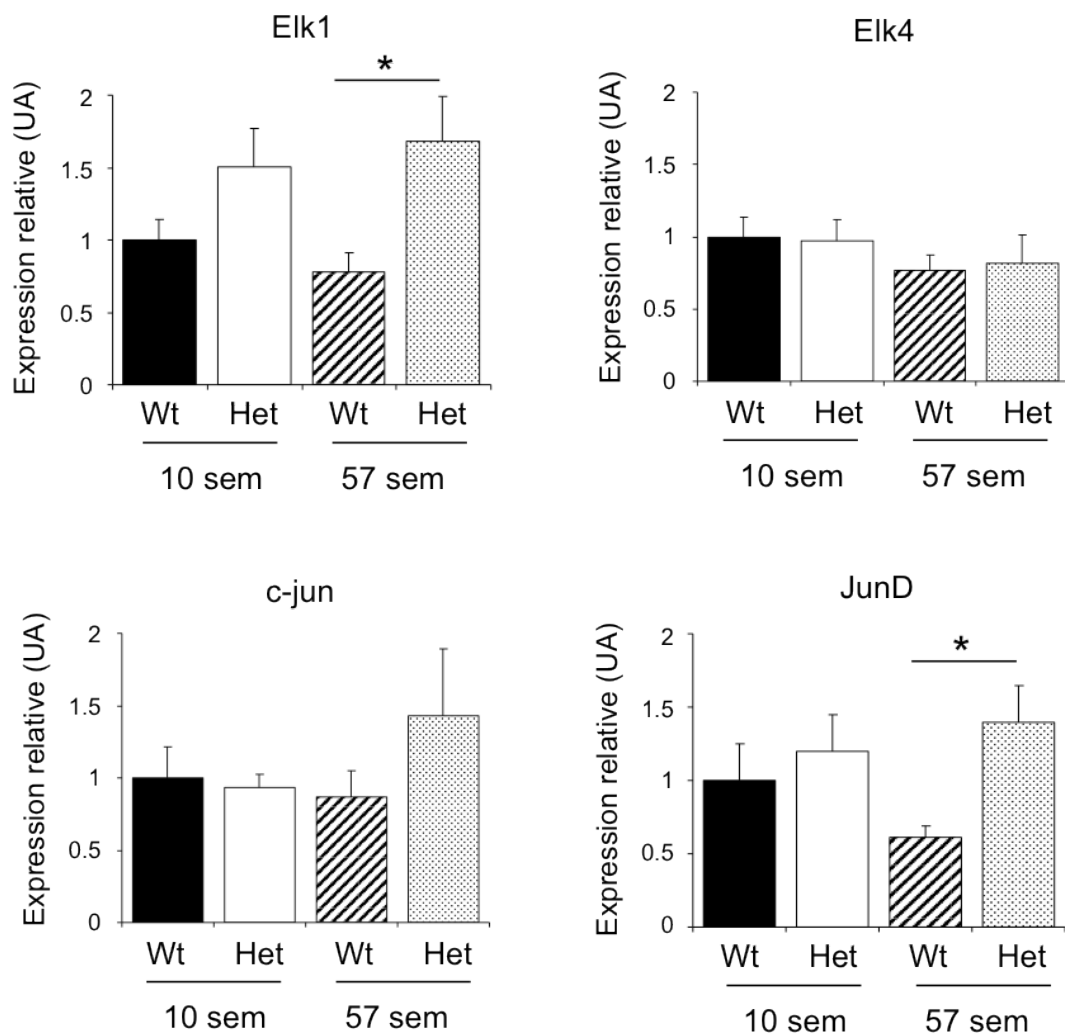


Figure 35. Niveau d'expression de gènes régulés par les voies MAP kinases dans le cœur des souris Wt et Het âgées de 10, 30 et 57 semaines.

Moyenne \pm SEM. (n=6 à 10 sem et n=5 à 57 sem). Analyse statistique ANOVA à 2 critères, Holm-Sidak test pour comparaison multiple. * $p<0.05$

Discussion

Comme dans le cœur des souris *Lmna*^{H222P/H222P} (Muchir et al, 2007b) une activation spécifiquement cardiaque de la voie MAPK ERK1/2 a été mise en évidence dans le cœur des souris *Lmna*^{ΔK32}. Le niveau d'activation de ERK1/2 dans le cœur des souris Het est du même ordre que dans le cœur des souris *Lmna*^{H222P/H222P} et *Lmna*^{H222P/+}.

Cependant, l'ensemble des résultats indique que le profil d'activation des voies MAPK dans le cœur des souris Het est distinct de celui des souris *Lmna*^{H222P/H222P} et *Lmna*^{H222P/+}. La voie JNK n'est, en effet, pas activée dans le cœur des souris Het et l'expression des gènes *Elk1*, *Elk4*, *c-jun* et *JunD* n'est pas augmentée en réponse à l'activation de la voie ERK1/2 dans le cœur des souris Het âgées de 10 semaines, contrairement à ce qui est observé dans le cœur des animaux des souris *Lmna*^{H222P/H222P} (Muchir et al, 2007b).

Ce profil d'activation cardiaque chez les souris Het est plus proche de celui décrit chez les souris *Emd*^{-/y} où l'activation cardiaque de la voie ERK1/2 est environ deux fois supérieure aux souris Wt mais où la voie JNK n'est pas dérégulée (Muchir et al, 2007a).

De plus, les gènes *Elk1* et *Elk4* ne sont pas surexprimés dans le cœur des souris *Emd*^{-/y}.

Se pose alors la question d'une corrélation entre la sévérité de l'atteinte cardiaque et le profil d'activation de ces voies MAPK. En effet, les souris *Emd*^{-/y} ne présentent pas de dysfonction contractile cardiaque mais une légère prolongation de la conduction atrio-ventriculaire (Ozawa et al, 2006), alors que les souris *Lmna*^{H222P/H222P} développent une cardiomyopathie dilatée plus sévère que celle observée chez les souris Het (Arimura et al, 2005). Bien que séduisante, cette hypothèse est contredite par le phénotype des souris *Lmna*^{H222P/+} qui montrent la même activation de la voie ERK1/2 que les souris *Lmna*^{H222P/H222P} mais ne développent aucun signe pathologique cardiaque ou très tardivement (après l'âge de deux ans) (Arimura et al, 2005; Muchir et al, 2007b).

L'activation cardiaque de la voie ERK1/2 tend à être plus importante chez les souris Hom que chez les souris Het. Si cette tendance se confirme, il pourrait donc exister un « effet-dose » des lamines A/C ΔK32 dans le cœur des souris. Nous avons en effet montré que la quantité de lamines A/C ΔK32 ne représente que 8,4% du total des lamines dans le cœur des souris Het âgées de 10 semaines (Partie I des résultats), alors que les souris

Hom expriment environ 20% de lamines mutées dans tous les tissus (Bertrand et al, 2012).

Il a été montré que ERK1/2 interagit avec le domaine coil2 des lamines A/C lorsqu'elles sont incorporées dans la lamina nucléaire (Gonzalez et al, 2008). La mutation $\Delta K32$, bien que localisée dans le domaine N-terminal des lamines A/C, pourrait perturber cette interaction. En effet, il a été montré que chez *C. elegans*, la délétion de la lysine 46 (résidu homologue de la lysine 32 des mammifères) perturbe l'assemblage latéral des protofilaments au sein de la lamina (Bank et al, 2011). Ainsi, l'exposition du domaine coil2 à ses partenaires protéiques comme ERK1/2 pourrait être modifiée par la mutation.

Alternativement, la localisation différente des lamines $\Delta K32$ dans les noyaux de souris Hom pourrait modifier leur interaction avec ERK1/2 et en moduler ainsi l'activité. Nous avons montré que chez les souris Hom, les lamines mutées ne s'assemblent pas correctement au sein de la lamina mais restent en partie dans le nucléoplasme. Là, elles interagissent avec le facteur de transcription SREBP et perturbent sa fonction dans le foie, limitant l'induction de ces cibles transcriptionnelles et induisant des défauts métaboliques chez les souris Hom (Bertrand et al, 2012). Un mécanisme similaire pourrait exister entre les lamines $\Delta K32$ et ERK1/2 dans le cœur et expliquerait donc le défaut d'activation des gènes cibles de ERK1/2. Ceci reste bien sûr à explorer par des immunomarquages par exemple.

Enfin, l'induction des gènes cibles de ERK1/2 dépend aussi du type de *stimulus* à l'origine de l'activation de cette MAPK. Par exemple, il a été montré *in vitro* que Elk1 et Elk4 ne répondent pas aux mêmes signaux inducteurs. Elk1 peut être induit par le TNF α , l'interleukine 10, en réponse aux UV... En revanche, Elk4 ne semble être activé que par des *stimuli* mitotiques (Shaw & Saxton, 2003). Une autre différence entre Elk1 et Elk4 est le niveau d'activation des MAPK nécessaire à leur induction : Elk1 répond à des concentrations d'agonistes 50 fois inférieures à celles nécessaires pour induire Elk4 *in vitro* (Bevan et al, 1998). Ces observations pourraient expliquer en partie la différence de profil d'expression entre ces deux facteurs dans le cœur des souris Het.

De plus, l'activation transcriptionnelle des gènes *Elk 1*, *Elk4* et *c-jun* en réponse à l'activation de ERK1/2 est aussi dépendante du type cellulaire étudié. En effet, l'invalidation du gène *Emd* par ARN interférence conduit à l'activation de ERK1/2 et à

l'augmentation d'expression de *Elk1*, *Elk4* et *c-jun* dans les cellules Hela, alors que seul le niveau d'ARN *c-jun* est augmenté dans les myoblastes C2C12 (Muchir et al, 2009b).

Comme je l'ai exposé dans l'introduction de ce mémoire, l'activation des voies MAP kinases apparait comme un mécanisme commun observé dans le cœur de patients porteurs de mutations des lamines A/C (Muchir et al, 2012) et dans différents modèles de cardiomyopathie liée à des modifications des lamines A/C (mutations ou déplétion) ou à une absence de l'émerine. Les mécanismes conduisant à cette activation restent à élucider. Plusieurs hypothèses peuvent cependant être avancées pour expliquer l'activation de cette voie dans le cœur des souris Het.

1) Les défauts de la lamina nucléaire sont associés à des anomalies du cytosquelette de desmine et d'actine notamment. Ces modifications perturbent la « mécanosensation » et induisent une plus grande « sensibilité » des cellules aux contraintes mécaniques (Chandar et al, 2010 ; Cupesi et al, 2010; Lammerding et al, 2005 ; Lammerding et al, 2004 ; Nikolova et al, 2004). L'activation de ERK1/2 pourrait donc s'inscrire dans un processus de remodelage compensatoire visant à contrecarrer cette fragilité. La signalisation ERK1/2 joue en effet un rôle important de l'établissement de l'hypertrophie cardiaque en réponse à différents *stimuli* mécaniques ou chimiques (Kehat et al, 2011 ; Rose et al, 2010). Son rôle serait donc plutôt bénéfique dans le contexte d'un cœur fragilisé. Cette hypothèse est appuyée par l'observation des souris surexprimant une forme active de MEK1 dans le cœur, protéine kinase activatrice de ERK1/2. Ces souris ont une meilleure fonction contractile que les souris Wt et développent une hypertrophie marquée sans signe de décompensation (Bueno et al, 2000).

De plus, la corrélation positive entre l'activation de ERK1 et la fonction cardiaque dans le cœur des souris Het semble suggérer que l'activation de la voie est bénéfique chez les souris Het.

En revanche, en l'état actuel, nos résultats ne nous permettent pas d'exclure que la signalisation ERK1/2 ait un rôle délétère dans le cœur des Het, participant à un remodelage inadéquat du myocarde, comme c'est le cas dans le cœur des souris *Lmna*^{H222P/H222P} (Muchir et al, 2012 ; Muchir et al, 2009a ; Wu et al, 2011). Seul le traitement des souris Het âgées de 10 semaines avec des inhibiteurs de la voie ERK1/2

(PD98059 ou Selumitinib) permettrait de distinguer un effet protecteur ou délétère de cette voie dans le cœur des souris Het.

3) Plus qu'une activation, l'augmentation de la part de ERK1/2 phosphorylée pourrait résulter d'un défaut de désactivation plutôt que d'une activation directe de la voie. Les lamines A/C, de par leur interaction physique avec p-ERK1/2 (Gonzalez et al, 2008; Ivorra et al, 2006), pourrait en effet servir de plateforme moléculaire « protégeant » p-ERK1/2 de l'action de phosphatases (comme PP2A) et empêchant ainsi sa déphosphorylation. Un mécanisme similaire a été observé dans le nerf sciatique lésé où des fragments du coil2 de la vimentine, protéine de la famille des filaments intermédiaires, interagissent avec p-ERK1/2 et empêche sa déphosphorylation (Perlson et al, 2006). Cette protection face aux phosphatases est rendue possible par le masquage des sites phosphorylés de p-ERK1/2.

En revanche, si ce mécanisme est séduisant, il n'explique pas l'induction transitoire de p-ERK1/2 observée dans le cœur des souris Het.

J'ai montré qu'il n'y a pas d'induction précoce de l'expression des gènes cibles mais il reste cependant à déterminer si ces cibles sont activées au niveau protéique (phosphorylées) et si la forme phosphorylée de ERK1/2 est bien transloquée dans le noyau. Il a en effet été montré que des mutations des lamines A/C associées à des syndromes progéroïdes perturbent l'import nucléaire (Busch et al, 2009; Kelley et al, 2011). Un défaut de translocation nucléaire expliquerait l'absence d'induction des cibles transcriptionnelles de ERK1/2. D'autre part, les 4 gènes testés sont loin d'offrir une représentation exhaustive des cibles de ERK1/2 décrites à ce jour (Yoon & Seger, 2006). L'activation de ERK1/2 pourrait s'exercer probablement aussi sur d'autres de ses partenaires comme des composants du cytosquelette tels que la dystrophine, la paxilline, la protéine Tau associée aux microtubules ou la FAK (Focal Adhesion Kinase) associée à la signalisation des intégrines, des facteurs de transcription important dans la réponse adaptative cardiaque comme GATA4, NFAT, p53...(Yoon & Seger, 2006).

La voie ERK1/2, et les voies MAPK plus généralement, ont été impliquées dans un grand nombre de pathologies cardiaques (cf. Introduction de ce mémoire). Elles conduisent à un panel innombrable de réponses physiologiques différentes. L'intensité de l'activation

des voies MAPK mais aussi la nature du *stimulus* inducteur et la régulation spatio-temporelle de cette activation permettent sans doute d'expliquer les différences observées entre les différents modèles reproduisant des mutations des lamines A/C.

DISCUSSION GENERALE

Discussion générale

Les laminopathies du muscle strié (LMS) représentent la forme majoritaire de laminopathies. Elles affectent les muscles squelettiques et/ou le muscle cardiaque. La cardiomyopathie dilatée avec troubles du rythme et de la conduction est une manifestation clinique majeure des LMS. D'évolution agressive, elle met en péril la survie de ces patients.

L'ensemble de mes travaux de thèse visaient à caractériser le phénotype cardiaque et musculaire d'un modèle murin d'EDMD sévère, la souris hétérozygote *Lmna*^{ΔK32/+}, et à étudier les mécanismes physiopathologiques à l'origine de ce phénotype. Ma thèse s'est divisée en trois projets : le phénotypage des souris Het et l'étude de l'implication du système ubiquitine-protéasome dans la stabilité des lamines A/C mutées ; l'étude de la réponse du myocarde et des muscles squelettiques des souris Het face à un stress induit par l'exercice ; la recherche de mécanismes physiopathologiques précoces par l'étude du profil cardiaque d'expression génique et de l'implication des voies MAP Kinases dans le cœur des souris Het. Nous avons étudié les souris Het à différents âges dans les différents projets (10, 17, 22, 30 et 57 semaines). Ceci nous a permis d'établir l'enchaînement séquentiel des événements moléculaires et fonctionnels à l'origine de la CMD des souris Het.

Après avoir résumé ici l'histoire naturelle de la cardiomyopathie dilatée chez les souris Het, j'en discuterai les résultats majeurs acquis au cours de ma thèse à la lumière des données actuelles de la littérature.

Histoire naturelle de la cardiomyopathie chez les souris Het

Première phase : la fonction cardiaque est normale chez les souris Het âgées de 10 semaines.

Dans le cœur des souris Het âgées de 10 semaines, les noyaux myocardiques sont allongés, l'espace intermembranaire nucléaire est élargi, mais les lamines A/C sont correctement localisées à l'enveloppe nucléaire. En revanche, le niveau protéique des lamines A/C est diminué de moitié et seuls 8,4% de lamines A/C mutées ΔK32 sont

défectées dans le cœur des souris Het. Les lamines A/C mutées sont en effet dégradées par le système ubiquitine-protéasome (UPS) (cf. Partie I des résultats).

L'haploinsuffisance des lamines n'a pas de répercussion fonctionnelle à cet âge, la fonction et les dimensions ventriculaires gauches des souris Het âgées de 10 semaines sont normales. Cependant, des processus de remodelage discret sont déjà mis en place, comme en témoigne l'augmentation modérée de l'expression du transcrit codant le peptide natriurétique cérébral (*Nppb*). D'un point de vue moléculaire, la voie ERK1/2 est activée et l'expression des gènes *Itgb1bp3* (codant MIBP) et *Gtse1* est augmentée dans le cœur des souris Het. L'implication des protéines codées par ces gènes dans la physiopathologie cardiaque chez les souris Het n'est pas encore très claire mais pourrait s'inscrire dans des processus de remodelage métabolique, de réparation de l'ADN et/ou d'apoptose (cf. Partie III des résultats).

Deuxième phase : l'apparition d'altérations fonctionnelles cardiaques chez les souris Het âgées de 22 à 30 semaines.

A 22 semaines, les souris Het commencent à montrer les premiers signes de dysfonction contractile cardiaque, associés à une progression du remodelage myocardique comme le montre l'induction de l'expression de la chaîne lourde β de la myosine (*Myh7*). La dysfonction contractile est accrue par le stress induit par l'exercice (cf. Partie II des résultats).

A 30 semaines, la dysfonction contractile est installée mais la dilatation ventriculaire reste modérée. Le remodelage myocardique apparaît plus prononcé avec l'augmentation du niveau de tubuline d'un facteur 1,8 dans le cœur des souris Het (donnée non montrée), traduisant probablement un remodelage du cytosquelette de microtubules. En revanche, la voie ERK1/2 n'est plus activée. Les noyaux des cardiomyocytes présentent des anomalies structurelles importantes avec parfois des ruptures de l'enveloppe nucléaire. Le niveau des lamines A/C est toujours diminué de moitié, suggérant que l'haploinsuffisance des lamines et la présence, même faible, de lamines mutées joue un rôle délétère sur la fonction cardiaque et la morphologie nucléaire chez les souris Het. En parallèle, la fonction de l'UPS est altérée dans le cœur des souris Het à cet âge.

Troisième phase : l'aggravation de la dysfonction cardiaque, dilatation ventriculaire gauche et insuffisance cardiaque chez les souris Het âgées de 57 semaines.

A 57 semaines, la dysfonction contractile s'est aggravée et est associée à une dilatation ventriculaire. Les souris Het sont en insuffisance cardiaque congestive pour la plupart. La structure du myocarde et des noyaux est très altérée. Le remodelage myocardique apparaît majeur avec l'augmentation de l'expression des transcrits codant la chaîne lourde β de la myosine, le peptide natriurétique cérébral et l'augmentation du niveau de tubuline d'un facteur 3,2 dans le cœur des souris Het (donnée non montrée). L'expression du transcrite codant MIBP est toujours élevée dans le cœur des souris Het. La proportion de lamines $\Delta K32$ est toujours de l'ordre de 8% dans le cœur des souris Het mais le niveau cardiaque total des lamines A/C est augmenté d'un facteur 1,5 à 2, en lien avec l'altération de l'UPS dans le cœur des souris Het. La quantité de lamines $\Delta K32$ a donc quasiment doublé dans le cœur des souris Het âgées de 57 semaines comparées aux souris Het âgées de 10 semaines. Nous avons montré, en parallèle, que l'accumulation de lamines $\Delta K32$ après l'inhibition de l'UPS semble être délétère pour le tissu cardiaque *in vitro* (EHT).

L'ensemble de nos résultats suggèrent donc fortement l'existence d'un mécanisme physiopathologique double dans le cœur des souris Het : l'haploinsuffisance fragiliserait le cœur et l'effet dominant négatif des lamines $\Delta K32$, avec sans doute un effet seuil, précipiterait la décompensation cardiaque et la survenue de l'insuffisance cardiaque congestive, conduisant au décès chez les souris Het.

En parallèle, toutes les études réalisées sur le muscle squelettique ont indiqué que la mutation $\Delta K32$ des lamines A/C n'affecte pas la morphologie ou la fonction musculaire. Le muscle squelettique apparaît normal chez les souris Het et n'est pas vulnérable au stress mécanique induit par l'exercice intense chez les souris Het, et ce malgré une diminution stable de l'ordre de 60% du niveau total des lamines A/C (cf. Partie I des résultats).

Comment expliquer la différence de sensibilité du muscle squelettique et du cœur dans les LMS ?

Dans l'introduction de ce mémoire, j'ai présenté le concept selon lequel les LMS seraient des cardiomyopathies associées ou non à des défauts musculaires squelettiques. Comprendre la différence de sensibilité du cœur et des muscles squelettiques aux mutations du gène *LMNA* reste, à mon sens, un enjeu majeur de l'étude des laminopathies affectant le muscle strié.

Bien qu'ils soient tous deux de type strié, il existe des différences majeures entre le cœur et le muscle squelettique : 1) l'organisation morphologique, conduisant à un mode de contraction différent ; 2) le positionnement des noyaux au sein des cellules et 3) le potentiel régénératif, entre autres.

1) La contraction myocardique ne se fait pas sur un plan linéaire mais s'apparente à une torsion, la base et l'apex du cœur tournant dans des sens opposés. L'image la plus appropriée pour décrire la contraction cardiaque est celle d'une « serpillère qu'on essore » (Taber et al, 1996). Cette observation s'explique par une structure anatomique particulière du myocarde ventriculaire. Une étude de dissection d'un cœur entier a, en effet, montré que le myocarde ventriculaire est formé d'une seule bande de tissu contractile, enroulée sur elle-même pour former les deux ventricules (Torrent-Guasp et al, 2001). Cette observation a été confirmée *in vivo* par l'analyse de la contraction cardiaque à thorax fermé grâce aux techniques de sonomicrométrie (Castella et al, 2005). Cette technique est basée sur la mesure du temps de transit d'un signal ultrasonique entre deux quartz piézo-électriques. Les ultrasons produits par l'excitation d'un des cristaux piézo-électriques sont détectés à leur arrivée sur l'autre cristal à l'aide d'un sonomicromètre. Le temps de transit entre les deux cristaux est converti en distance. Grâce à l'implantation de ces cristaux dans toute l'épaisseur du myocarde, cette méthode permet de mesurer des dimensions ventriculaires et des épaisseurs myocardiques, reflétant la contraction ou le raccourcissement cardiaque chez l'animal.

Le muscle squelettique est, quant à lui, composé de faisceaux de fibres parallèles et sa contraction produit un raccourcissement linéaire du muscle, selon l'axe des faisceaux de myofibrilles. Cette organisation est clairement observable en microscopie sur des coupes transversales de muscle (Schiaffino et al, 1970).

Il est donc facilement concevable que les contraintes multidirectionnelles appliquées aux cardiomyocytes soient bien différentes de celles unidirectionnelles appliquées aux fibres musculaires. Ainsi, tout défaut mécanique cellulaire comme ceux induits par des perturbations du cytosquelette ou du nucléosquelette n'aura pas les mêmes conséquences sur un cardiomyocyte ou sur une fibre musculaire. De telles perturbations du cytosquelette de desmine et d'actine, notamment, sont observées dans des cellules issues de souris déficientes en lamines A/C (MEF et cardiomyocytes de souris *Lmna*^{-/-} et *Lmna*^{+/-}) ou au niveau myocardique chez les souris *Lmna*^{-/-} et *Lmna*^{+/-}, et les souris exprimant des lamines A/C mutées (souris *Lmna*^{N195K/N195K}) (Broers et al, 2004 ; Chandar et al, 2010 ; Lammerding & Lee, 2005 ; Lammerding et al, 2004 ; Mounkes et al, 2005 ; Nikolova et al, 2004 ; Nikolova-Krstevski et al, 2011). Les souris *Lmna*^{+/-} et *Lmna*^{N195K/N195K} développent une atteinte cardiaque isolée, aussi l'architecture du cytosquelette musculaire n'a pas été étudiée dans ces modèles. Chez nos souris Het, l'organisation du cytosquelette des cardiomyocytes et des fibres musculaires reste à analyser. Des résultats préliminaires indiquent que les niveaux d'expression de la desmine et de l'actine sont stables avec l'âge dans le cœur des souris Het (données non montrées). Ceci ne présage cependant pas de l'architecture de ces réseaux. En revanche, une augmentation progressive du contenu cardiaque en tubuline a été observée dans le cœur des souris Het, suggérant que le réseau microtubulaire pourrait être altéré avec la progression de la CMD. Ce phénomène de densification du réseau de microtubules a déjà été rapporté dans plusieurs modèles animaux d'hypertrophie (chat, chien, rat) et semble précipiter la décompensation hypertrophique et l'apparition de l'insuffisance cardiaque (Cooper, 2006; Watkins et al, 1987).

2) Les différences architecturales que je viens d'évoquer se traduisent aussi dans le positionnement des noyaux au sein des cellules cardiaques et musculaires. Les noyaux des cardiomyocytes sont localisés en position centrale des cellules. Les *myonuclei* sont en revanche « repoussés » à la périphérie des fibres et occupent une position sous-sarcolemmale. Ainsi, les contraintes mécaniques s'appliquant sur ces noyaux via le complexe LINC sont de nature différente. Les noyaux des souris Het présentent des anomalies structurelles importantes (élargissement de l'espace intermembranaire, rupture de l'enveloppe, disparité de taille...) et s'aggravant avec la progression de la

CDM. Ce type d'altérations est aussi retrouvé dans d'autres modèles de cardiomyopathies liées à des défauts nucléaires (délétion de la nesprin-1, souris *Lmna*^{-/-} et *Lmna*^{+/-}, souris *Emd*^{-/y}, souris *Lmna*^{N195K/N195K} (Chandar et al, 2010 ; Gnocchi et al, 2011 ; Mounkes et al, 2005; Ozawa et al, 2006 ; Puckelwartz et al, 2010 ; Zhang et al, 2007b).

Une analyse est nécessaire pour déterminer si ces défauts nucléaires sont aussi observés dans le muscle squelettique des souris Het.

Une des limites souvent avancées quant à l'utilisation de modèles animaux pour reproduire une pathologie musculaire est d'une part la station quadrupède et d'autre part la sédentarité des animaux. Pour évaluer si l'absence de défauts musculaire observables chez les souris Het était liée à la sédentarité des animaux, les souris ont été soumises à un protocole d'exercice chronique épuisant (Partie II des résultats). Bien que de rythme très soutenu, cet exercice n'a démasqué aucune pathologie musculaire, indiquant que la sédentarité n'est pas un facteur « masquant » des défauts musculaires chez la souris Het.

3) Il est bien connu que le cœur et le muscle sont très éloignés en terme de capacités régénératives. Le dogme est de considérer que le cœur ne se régénère pas (ou très peu) alors que le muscle à des capacités de régénération très importantes, même si elles diminuent avec l'âge (Mouly et al, 2005).

Grâce à la mesure de la concentration de ¹⁴C incorporé dans l'ADN des cardiomyocytes, Bergman *et al.* ont montré que le taux de renouvellement des cardiomyocytes dans le cœur adulte est de l'ordre de 1% par an à l'âge de 25 ans et diminue progressivement pour n'être plus que de 0,45% à l'âge de 75 ans chez l'homme (Bergmann et al, 2009). En revanche, dans le muscle normal de rat adulte, le taux de renouvellement des *myonuclei* est de l'ordre de 1 à 2% par semaine (Schmalbruch & Lewis, 2000). Même s'il est délicat de comparer ces deux observations, elles supportent toutefois l'idée que la régénération du muscle squelettique est bien meilleure que celle du cœur. Ainsi, de façon schématique, tout défaut conduisant à une mort cellulaire sera donc moins bien « corrigée » dans le cœur que dans le muscle squelettique.

Les capacités régénératives des cellules progénitrices cardiaques n'ont pas été étudiées dans le champ des laminopathies. Cependant, des altérations de la capacité myogénique

des cellules satellites, cellules souches résidentes du muscle squelettique (Zammit et al, 2006), ont été mises en évidence dans des modèles cellulaires et animaux d'EDMD (*Emd^{-/-}*, *Lmna^{-/-}*, mutation de Nesprine1...) (Gnocchi et al, 2008), induisant des défauts de sortie du cycle cellulaire, des délais d'expression de facteurs myogéniques comme MyoD et des défauts de régénération musculaire (Frock et al, 2006 ; Melcon et al, 2006 ; Zhang et al, 2007b). De plus, le nombre de cellules satellites est diminué dans le muscle EDL des souris *Lmna^{-/-}* (Gnocchi et al, 2011). Des observations similaires non publiées chez les souris *Lmna^{H222P/H222P}* indiquent que le nombre de cellules satellites est diminué dans le muscle *soleus*, muscle le plus atteint dans ce modèle, suggérant une régénération accrue ou un problème d'auto-renouvellement de ces cellules. Ce défaut de cellules progénitrices, extrapolé aux cellules cardiaques, laisse supposer que la régénération myocardique ou le renouvellement naturel des cardiomyocytes pourrait être défectueux dans le cœur des souris présentant des défauts des lamines A/C. Je reviendrai sur ce point dans la suite de la discussion.

Le pouvoir myogénique des cellules satellites issues de muscles des souris Het n'a pas encore été investigué. Il serait intéressant d'analyser le nombre de ces cellules dans le muscle de souris Het et de tester leur capacité régénérative en réponse à un dommage sévère que constitue par exemple une injection dans la patte de souris Het de substances toxiques comme la cardiotoxine ou la notexine.

Le cœur des souris Het est-il sénescence ?

L'insuffisance cardiaque est souvent la conséquence de la perte de cardiomyocytes. La perte de cardiomyocytes par apoptose est impliquée dans la physiopathologie des atteintes cardiaques. L'accélération de la mort cellulaire est aussi observée dans le myocarde « vieillissant » et a été proposée comme un mécanisme contribuant à la diminution des performances hémodynamiques et à l'augmentation du risque d'insuffisance cardiaque chez le sujet âgé. Dans le contexte des laminopathies, l'apoptose spécifique des cellules du tissu conducteur cardiaque a été montré comme jouant un rôle majeur dans l'apparition d'arythmies et de troubles de conduction chez les souris *Lmna^{+/-}* (Wolf et al, 2008). En revanche, l'apoptose cardiomyocytaire ne constitue pas un processus majeur dans le cœur des souris *Lmna^{+/-}* (Chandar et al, 2010). Ce paramètre n'a pas encore été évalué dans le cœur des souris Het.

Contrairement à l'apoptose qui élimine les cellules endommagées du tissu, la sénescence cellulaire est un processus incluant des changements morphologiques et fonctionnels sans élimination de la cellule. Les cardiomyocytes sénescents contribuent à l'insuffisance cardiaque liée à l'âge par leur dysfonction et en conduisant à un remodelage inadapté du myocarde (Sussman & Anversa, 2004).

Un des moyens de compenser la perte fonctionnelle de tissu contractile est remplacer les cardiomyocytes perdus soit par division de cardiomyocytes existants, soit en recrutant et différenciant des cellules souches cardiaques. Comme je l'ai évoqué plus haut, la capacité régénérative du cœur normal est très limitée.

Une question se pose dans le contexte de la cardiolaminopathie : puisque l'apoptose des cardiomyocytes n'est pas un processus majeur dans le cœur des souris *Lmna*^{+/-}, le cœur de souris présentant des défauts de lamines A/C est-il sénescents ? Le renouvellement des cardiomyocytes vieillissants ou sénescents, bien que faible en conditions normales, est-il défectueux dans le cœur de ces souris ? Ceci pourrait-il expliquer les défauts contractiles observés ?

Trois hypothèses pourraient expliquer l'altération de la régénération du myocarde dans un contexte pathologique: (a) la prolifération et/ou la différenciation des cellules souches cardiaques seraient atténuées; (b) la capacité des cellules souches cardiaques à migrer dans le cœur serait diminué, de par une altération du tissu de type fibrotique par exemple, limitant la diffusion de facteurs attractants ou la migration des cellules elles-mêmes; (c) le nombre de cellules fonctionnellement « compétentes » diminuerait avec l'âge par l'arrêt de la prolifération, la sénescence et/ou l'apoptose de ces cellules.

Comme je l'ai indiqué plus haut, les cellules souches du muscle squelettique, les cellules satellites montrent des altérations dans un contexte laminopathique. Au delà des cellules satellites, d'autres cellules souches adultes sont aussi altérées dans le contexte de mutations des lamines A/C (cellules souches de l'épiderme (Espada et al, 2008 ; Rosengarten et al, 2011), cellules souches mésenchymateuses humaines (Scaffidi & Misteli, 2008)). Aussi, un nouveau concept a émergé récemment concernant la fonction des lamines A/C dans les tissus : les lamines A/C joueraient le rôle de modulateur intrinsèque du vieillissement des cellules souches adultes (Pekovic & Hutchison, 2008). Le contrôle de l'homéostasie des cellules souches dans les tissus tels que l'équilibre

entre la prolifération, la différenciation, l'apoptose et la sénescence est étroitement lié à l'efficacité de la réparation tissulaire et à la régénération. Il a été proposé que des mutations des lamines A/C perturbent l'équilibre entre prolifération et la différenciation des cellules souches adultes, conduisant à une régénération moins efficace des tissus (Gotzmann & Foisner, 2006 ; Vlcek & Foisner, 2007a). Il y a plusieurs voies de signalisation jouant un rôle central dans l'homéostasie des cellules souches adultes, qui sont liées à des fonctions des lamines de type A et à leurs partenaires de liaison, tels que les voies Rb/E2F et Rb/MyoD, la voie p53 ou encore les voies MAPK, parmi d'autres.

La protéine Rb a un rôle bien connu dans l'induction de l'arrêt de la prolifération à la suite de dommages de l'ADN et dans la prévention de l'accumulation de ces dommages qui, autrement, donnerait lieu à des cassures bicaténares et à de l'instabilité génomique (Bosco et al, 2004). Dans les fibroblastes et les cellules musculaires squelettiques, la dérégulation de la voie de signalisation Rb/E2F conduit à des perturbations du cycle cellulaire, avec une entrée rapide des cellules en phase S mais un ralentissement de la progression de la phase S et un arrêt du cycle en phase G2, probablement du à des phénomènes de réplication incomplète ou des dommages de l'ADN (Novitch et al, 1996 ; Pekovic et al, 2007). D'autres études ont montré que la différenciation musculaire de myoblastes transfectés avec des lamines A mutées est altérée, en lien avec une incapacité à sortir du cycle cellulaire et à exprimer des facteurs myogéniques tardifs tels que la myogénine. Ces altérations sont liées à une hyperphosphorylation de Rb (Favreau et al, 2004). Il a donc été proposé qu'une dérégulation de cette voie Rb/E2F et/ou Rb/MyoD dans des cellules exprimant des lamines A/C mutées conduise à un épuisement et à une sénescence prématurée des cellules souches de part une augmentation de leur prolifération et/ou une accumulation de défauts de l'ADN.

Des changements d'expression, d'activité et de phosphorylation de p53 sont caractéristiques de l'état sénescence (Reinhardt & Schumacher, 2012). Une hyperactivation de cette voie induite par l'augmentation de dommages de l'ADN a été rapportée chez les souris *Zmpste24^{-/-}* et *Lmna^{-/-}*, présentant des phénotypes de vieillissement accéléré (Liu et al, 2005; Varela et al, 2005) ou dans des fibroblastes humains déplétés en lamines A/C ou exprimant des lamines A mutantes associées à des phénotypes de HGPS (Kudlow et al, 2008 ; Moiseeva et al, 2011).

L'activation dans des fibroblastes primaires humains et murins du proto-oncogène Ras, situé en amont de la voie d'activation des MAPK MEK/ERK, conduit à la sénescence prématurée de ces cellules associée à une accumulation des protéines p53 et p16 (Serrano et al, 1997). De façon intéressante, l'activation des voies MAPK, et de ERK1/2 en particulier, a été démontrée comme délétère dans un contexte de laminopathie du muscle strié (Muchir et al, 2007b ; Muchir et al, 2012) et l'inhibition de la voie MEK/ERK dans des myoblastes C2C12 de souris exprimant une mutation des lamines associée à l'EDMD améliore leur différenciation *in vitro* (Favreau et al, 2008). Ainsi, l'activation des voies MAPK pourrait jouer un rôle dans l'établissement de la cardiomyopathie en induisant une sénescence prématurée des cardiomyocytes et/ou des cellules souches cardiaques.

Les résultats que nous avons acquis sur la signalisation dans le cœur des souris Het indiquent que la voie ERK1/2, d'une part et potentiellement les voies Rb/E2F et p53 d'autre part seraient dérégulées chez les souris Het âgées de 10 semaines et avant l'apparition des premiers signes de dysfonction cardiaque. Ces différentes voies étant notamment impliquées dans la sénescence cellulaire, des processus de sénescence précoce pourraient être activés dans le cœur des souris Het.

De plus, comme je l'ai exposé dans la partie III des résultats de ce mémoire, la protéine MIBP est impliquée dans le métabolisme du NAD, un cofacteur important pour les protéines PARP participant aux réparations de l'ADN. Les dommages de l'ADN sont particulièrement liés à la mise en place d'un phénotype sénescence des cellules.

Il est donc nécessaire d'explorer plus en détails le phénotype cellulaire du cœur des souris Het, en recherchant des indices de sénescence comme par exemple un raccourcissement des télomères (Liu, 1999), une expression de la beta-galactosidase ou l'expression de gènes impliqués dans la sénescence comme p21, p53 et p16 par exemple (Shay et al, 1991).

Enfin, s'il s'avère que le cœur des souris Het présente un phénotype sénescence, il serait intéressant de contrecarrer cette sénescence par l'activation de voies protectrices telle que la voie IGF1/Akt (Torella et al, 2004), en traitant les animaux avec de l'IGF1 (Insulin Growth Factor-1) ou en leur injectant un adénovirus codant pour ce facteur trophique.

L'augmentation d'expression d'IFG1 et l'activation en aval de Akt ont démontré des effets bénéfiques en terme de prolongation des capacités prolifératives des cellules satellites (Chakravarthy et al, 2000) et des cellules souches cardiaques, limitant les défauts cardiaques liés à l'âge chez la souris (Torella et al, 2004).

Les laminopathies sont-elles des pathologies de la mécanosensation ?

L'hypothèse mécanique des laminopathies que j'ai présentée en introduction de ce mémoire propose que les lamines A/C jouent un rôle primordial dans la résistance mécanique du noyau et que des défauts de la lamina nucléaire, induits par des mutations des protéines qui la composent, sont susceptibles de fragiliser le noyau et la cellule. Les cellules seraient alors plus sensibles à l'apoptose, en particulier dans les tissus soumis à des contraintes mécaniques fortes.

En accord avec cette hypothèse, la plupart des tissus atteints dans les laminopathies (muscles squelettiques, système cardiovasculaire, os, peau, tissu adipeux) sont des tissus dans lesquels les cellules et les noyaux, en particulier, sont soumis à des contraintes mécaniques fortes et nécessitent d'avoir des propriétés de résistance mais aussi d'élasticité. Les cellules doivent aussi être en mesure de répondre de façon adéquate aux contraintes qui s'exercent sur elles, en d'autres termes, elles doivent être « mécanosensibles ». La mécanosensation et la mécanotransduction, définies comme la transformation de forces mécaniques en signaux biochimiques pour rendre compte aux cellules des changements de leur environnement, sont particulièrement importantes pour la morphogenèse de ces tissus et leur maintien (Jaalouk & Lammerding, 2009). C'est le cytosquelette via ses liaisons avec la matrice extracellulaire, qui est le chef d'orchestre de la mécanotransduction, en apportant aux cellules une « pré-tension » ou « tenségrité » nécessaire pour répondre aux contraintes mécaniques extrinsèques (Wang et al, 2009).

Les contraintes de cisaillement appliquées sur les cellules endothéliales de la paroi de vaisseaux ainsi que les contraintes circonférentielles s'appliquant sur les cellules endothéliales et musculaires lisses vasculaires exercent un effet protecteur face à l'athérosclérose (Hahn & Schwartz, 2009). Des altérations de ces tissus sont observées

chez les patients atteints de HGPS et de FPLD (Al-Shali & Hegele, 2004). Les cellules épithéliales de la peau ont une organisation particulière de par leur rôle de barrière (Reichelt, 2007). Elles sont polarisées et les jonctions qu'elles établissent entre-elles nécessitent un cytosquelette parfaitement solide mais élastique, formant une couche cellulaire hermétique à l'extérieur. Des défauts de l'épiderme sont observés chez les souris *Lmna*^{L530P/L530P}, modèle de syndrome progéroïde (Mounkes et al, 2003) et chez les patients souffrant de HGPS (Pereira et al, 2008).

Un autre tissu dans lequel le rôle de la mécanosensation est primordial dans le maintien tissulaire est le tissu osseux. Le tissu osseux est compact et constitué de couches concentriques de matrice osseuse calcifiée, au centre desquelles de petites cavités appelées « lacunes » sont formées à intervalles réguliers. Ces lacunes contiennent les ostéocytes, cellules osseuses principales, et sont reliées entre elles par des canalicules, un réseau de canaux d'interconnexion. La gravité et les forces de compression générées par les contractions musculaires résultent en de petites déformations de l'os. Ces microdéformations induisent des gradients de pression qui permettent l'écoulement du fluide interstitiel à travers le réseau de canalicules. La pression relative induite par ce flux stimulerait le remodelage osseux localisé afin d'optimiser les propriétés physiques de l'os par le biais de processus de mécanotransduction (Burger & Klein-Nulend, 1999). L'absence de forces s'exerçant sur le tissu osseux, en situation de microgravité par exemple, conduisent à une perte de masse osseuse (Klein-Nulend et al, 2003). Une ostéolyse est aussi observée chez les patients atteints de HGPS et dans les modèles murins de progéria (Bergo et al, 2002 ; Mounkes et al, 2003 ; Yang et al, 2005). L'absence de lamines A/C, obtenue par ARN interférence dans des cellules souches mésenchymateuses, affecte la différenciation en ostéoblastes de ces cellules (Akter et al, 2009). Ce résultat pourrait expliquer les défauts osseux observés chez les souris *Lmna*^{-/-} (Li et al, 2011b).

Dans les adipocytes, l'accumulation de lipides dans une grosse vacuole centrale induit des contraintes mécaniques fortes sur le noyau, qui est repoussé en périphérie des cellules et prend une forme ovoïde aplatie dans le tissu sous-cutané chez l'homme. Ce processus est associé à une réorganisation importante de la lamina nucléaire, du complexe LINC et du cytosquelette de vimentine, d'actine et de microtubules au cours de la différenciation adipogénique (Verstraeten et al, 2011). Ainsi tout défaut de réorganisation du nucléo-cytosquelette (absence de lamines A/C ou présence de

progérine par exemple) serait délétère pour la différenciation adipogénique expliquant en partie la lipoatrophie observée chez les souris *Lmna*^{-/-} (Cutler et al, 2002), chez les patients atteints FPLD et de HGPS (Verstraeten et al, 2008).

La mécanotransduction est particulièrement complexe dans le cœur de part les nombreux types de charges mécaniques qui sont appliquées sur les cardiomyocytes. Le cytosquelette est le principal moyen de détection, d'intégration et de coordination des réponses cellulaires aux modifications de charge et d'environnement. Les changements du « microenvironnement » des cardiomyocytes, comme la composition de la matrice extracellulaire, les cellules voisines et la rigidité du tissu sont détectés par des protéines de structure spécialisées et intégrées au cytosquelette, comme les costamères et les complexes des intégrines (complexes associée a la dystrophine et aux sarcoglycanes, kinases liées aux intégrines, protéines MLP, Mélusine...), les jonctions adhérentes (complexe cadhérine/ β -caténine), le complexe multiprotéique du disque Z (MLP, CARP...) ou la titine (plateforme pour FHL1, ERK1/2...) par exemple (Buyandelger et al, 2011). Ces protéines mécanosensibles induisent le remodelage du cytosquelette afin de s'adapter aux nouvelles conditions environnementales des cardiomyocytes. Le cytosquelette propage également des signaux mécaniques pour l'adaptation d'autres fonctions au sein du cardiomyocyte, telles que la signalisation, l'excitabilité, la contractilité et l'expression des gènes (McCain & Parker, 2011).

Comme je l'ai déjà plusieurs fois exposé dans ce mémoire, le cytosquelette des cellules dans lesquelles les lamines A/C sont absentes ou dysfonctionnelles, est altéré. Les défauts de mécanotransduction de ces cellules ne sont plus à prouver. Il a en effet été montré que les cellules déficientes en lamines A/C sont incapables d'exprimer des gènes mécanosensibles *Iex-1* et *Egr-1* en réponse à un étirement cyclique (Broers et al, 2004 ; Lammerding et al, 2005; Lammerding et al, 2004). En parallèle, des défauts de mécanotransduction ont aussi été mis en évidence *in vivo* chez les souris *Lmna*^{-/-} et *Lmna*^{+/-}, corroborant ce qui était connu sur les cellules *Lmna*^{-/-}. Dans le cœur des souris *Lmna*^{-/-} un défaut de transmission de la force résultant d'une distorsion du réseau de desmine a été observé (Nikolova et al, 2004). Cette altération de la transmission de force est aussi visible chez les souris *Lmna*^{+/-}, qui ne développent qu'une réponse

hypertrophique limitée en réponse à une constriction de l'aorte thoracique (Cupesi et al, 2010).

Le cœur des souris Het est-il « mécanosensible » ?

Plusieurs de nos résultats indiqueraient que des processus de mécanotransduction sont à l'œuvre dans le cœur des souris Het :

- Le gène codant la protéine MIBP est surexprimé dans le cœur des souris Het dès l'âge de 10 semaines. MIBP, aussi appelé *Itgb1bp3* (*Integrin Beta 1 Binding protein 3*), en interagissant avec les intégrines et la paxilline joue un rôle dans la régulation des complexes d'adhésion cellule-matrice et participe ainsi à la morphogénèse chez le poisson-zèbre (Goody et al, 2010) et à la différenciation myogénique des myoblastes C2C12 de souris (Li et al, 1999). Son rôle dans le cœur reste peu connu mais pourrait refléter une fonction signalétique de mécanotransduction au niveau des complexes du sarcolemme.

- La voie ERK1/2 est activée dans le cœur de souris Het. L'activation de la voie MAPK ERK1/2 est connue pour amorcer des processus d'hypertrophie cardiaque en réponse à de nombreux stimuli, dont le stress mécanique (Kehat et al, 2011 ; Rose et al, 2010).

- Des résultats préliminaires indiquent que le gène *Fhl1* codant la protéine *Four and a Half LIM domain 1*, est surexprimé dans le cœur des souris Het âgées de deux semaines (données non présentées). FHL1 est une protéine interagissant avec la titine et ERK1/2 au niveau de la bande I des sarcomères. Chez la souris, l'absence de FHL1 diminue l'activation des MAPK et la réponse hypertrophique en réponse à une constriction de l'aorte thoracique (Sheikh et al, 2008). FHL1 pourrait former un senseur d'étirement avec les MAPK et la portion N2B de la titine, et ainsi modulerait la mécanosensation au niveau des cardiomyocytes. En réponse à un étirement elle serait transloquée au noyau et modulerait l'activité de facteurs de transcription comme NFATc-1, dans le muscle squelettique (Cowling et al, 2008). De plus, des mutations du gène *FHL1* sont impliquées dans des cardiomyopathies hypertrophiques (Friedrich et al, 2012) et dans l'EDMD (Gueneau et al, 2009).

- Enfin, le niveau de tubuline augmente progressivement dans le cœur des souris Het, semblant indiquer un remodelage du cytosquelette de microtubules associé à des processus hypertrophiques myocardiques (Cooper, 2006; Watkins et al, 1987).

Les cardiomyocytes des souris Het ne semblent donc pas être dépourvus de réponses de mécanotransduction. En revanche, ces mécanismes n'apparaissent pas suffisants ou sont incomplets pour contrecarrer les effets de la mutation, en particulier en réponse à un stress mécanique, comme celui induit par l'exercice chronique épuisant (Partie II des résultats). Le cœur des souris Het décompense rapidement en insuffisance cardiaque congestive.

Comment expliquer la dysfonction du système ubiquitine-protéasome dans le cœur des souris Het ?

Les lamines A/C $\Delta K32$ sont dégradées par le système ubiquitine-protéasome (UPS) dans le cœur et le muscle des souris Het. Ceci représenterait un mécanisme protecteur pour limiter son effet négatif sur les lamines A/C sauvages (Wt). On peut en effet supposer qu'il se forme des dimères « mixtes » de lamines, il cohabiterait ainsi des dimères de lamines Wt/Wt, Wt/ $\Delta K32$ et $\Delta K32/\Delta K32$ dans les cellules des souris Het. Comme je l'ai indiqué dans le manuscrit soumis pour publication, chez *C. elegans* la délétion de la lysine 46, acide aminé chargé homologue de la lysine 32 des mammifères, perturbe la formation du réseau de lamines A/C *in vitro* (Bank et al, 2011). Aussi, la délétion de la lysine 32 pourrait perturber l'assemblage des lamines mutées mais aussi des lamines Wt interagissant avec elles dans le cœur des souris Het. Une étude visant à étudier l'assemblage de filaments de desmine mutées dans le domaine N-terminal de la « tête » de la protéine a montré que la desmine mutée ne s'assemble pas correctement, formant des filaments agrégés, et qu'elle exerce un effet dominant négatif sur l'assemblage du réseau lorsqu'elle est mélangé à de la desmine Wt (ratio 1:1) (Sharma et al, 2009). La structure des filaments intermédiaires étant très conservée entre les différentes familles (Herrmann et al, 2009), il est concevable que la lamine ait un effet similaire dans les tissus des souris Het. Une étude du même type est actuellement en cours pour évaluer l'impact des lamines A/C $\Delta K32$ sur l'assemblage des lamines A/C Wt.

La dysfonction de l'UPS a été mise en évidence dans le cœur des souris Het par l'accumulation de protéine Ub-GFP, protéine rapportrice de l'activité de ce système *in vivo*. L'accumulation de protéine Ub-GFP dans le cœur des souris Het est modeste (d'un facteur 1,5) comparé aux souris Wt et signe donc une dysfonction modérée de l'UPS chez

les souris âgées de 30 semaines. Il reste à établir si cette dysfonction s'aggrave avec l'âge et la progression de la cardiomyopathie dilatée chez les souris Het. Toutefois, cette altération, bien que limitée, de l'UPS est suffisante pour conduire à une augmentation de l'ordre de 1,5 à 2 fois de la quantité globale des lamines A/C, et donc une augmentation de la quantité de lamines A/C $\Delta K32$ dans le cœur des souris Het âgées de 57 semaines. Notre hypothèse est que la quantité de lamines A/C $\Delta K32$ atteindrait alors un seuil « critique » augmentant ces effets délétères sur la fonction cardiaque.

Plusieurs questions restent posées quant à l'origine de la dysfonction de l'UPS dans le cœur des souris Het :

- La dysfonction vient-elle d'une surcharge de travail imposée à l'UPS, le système est-il dépassé ?

Le système UPS a été impliqué dans toutes les pathologies cardiaques, comme je l'ai exposé dans l'introduction de ce mémoire. Sa dysfonction est très souvent associée à un stress myocardique imposant une synthèse et une dégradation protéiques importantes (hypertrophie, ischémie, protéines mutées...) (Schlossarek & Carrier, 2011).

Aussi, la dégradation continue de lamines A/C $\Delta K32$ dans le cœur des souris Het pourrait altérer la fonction normale de l'UPS. Un mécanisme de ce type a été suggéré pour expliquer la dysfonction de l'UPS dans la cardiomyopathie liée à une surcharge en desmine (Liu et al, 2006b) et dans la cardiomyopathie hypertrophique liée à des mutations de la protéine C cardiaque (MyBPC) (Sarikas et al, 2005).

Des données obtenues sur des cardiomyocytes néonataux de souris homozygotes *Lmna* $\Delta K32/\Delta K32$ en culture indiquent que le niveau de protéines ubiquitinées est 2,5 supérieur au niveau de protéines ubiquitinées des cardiomyocytes néonataux de souris Wt, suggérant une inadéquation de la dégradation dans ces cellules. L'étude de la fonction de l'UPS devra être approfondie dans les tissus des souris *Lmna* $\Delta K32/\Delta K32$ pour étudier si le taux de dégradation très important chez ces animaux (80% des lamines A/C sont dégradés) est à l'origine d'une altération de l'UPS.

Il a été montré qu'en cas d'accumulation de protéines ubiquitinées en lien avec une fonction défectueuse de l'UPS, il y a une prise en charge du « surplus » de protéines ubiquitinées non dégradées par le système de dégradation autophagique. Chez les souris

Lmna^{H222P/H222P} l'observation de vacuoles de type autophagique à proximité des noyaux suggère que le système autophagique est dysfonctionnel dans le cœur de ces animaux. Cette dysfonction a été confirmée *in vitro* dans des fibroblastes embryonnaires issus de ces mêmes souris (Park et al, 2009). En revanche, le système autophagique n'est apparemment pas altéré dans le cœur de nos souris Het. A l'exception du stade terminal, l'observation du myocarde en microscopie électronique n'a pas révélé d'accumulation particulière de vacuoles autophagiques clairement identifiables. De plus, le ratio LC3-II/LC3-I n'est pas altéré dans le cœur des souris Het. Bien qu'utile, la mesure du ratio LC3-II/LC3-I n'est pas suffisante pour avoir une vision claire du fonctionnement autophagique. Pour avoir une vision claire de la fonction de l'autophagie dans le cœur des souris Het, il faudrait en plus mesurer le niveau des protéines Beclin-1 et p62/sequestosome-1. Beclin-1 est une protéine nécessaire à la nucléation des membranes, première étape de la formation d'autophagosomes (Tanida, 2011). p62 est une protéine faisant l'intermédiaire entre les protéines ubiquitinées et la protéine LC3 pour séquestrer les protéines ubiquitinées non dégradées dans des autophagosomes (Ding et al, 2007; Pankiv et al, 2007).

- L'UPS est-il altéré par des mécanismes secondaires induits par la présence de la mutation ?

Il a été suggéré que les lamines joueraient un rôle de tampon pour les espèces réactives de l'oxygène, protégeant ainsi du stress oxydatif d'autres protéines nucléaires moins abondantes et dont le rôle est plus critique (Sieprath et al, 2012). En revanche, le pouvoir tampon des lamines reste malgré tout limité. La présence de lamines A/C mutées ou l'accumulation de prélamine A dans différentes laminopathies comme la FPLD sont associées à un stress oxydatif cellulaire majoré (Verstraeten et al, 2009). Un déséquilibre oxydatif a aussi été mis en évidence dans l'EDMD (Pekovic et al, 2011), une atteinte cardiaque (Charniot et al, 2007), l'HGPS (Viteri et al, 2010) par exemple. Bien qu'il y ait visiblement un lien entre la dysfonction des lamines A/C et des perturbations de l'homéostasie oxydo-réductrice, les mécanismes à l'origine de ces altérations restent inconnus. En revanche, il a été prouvé que le stress oxydant a des effets délétères sur de nombreuses fonctions cellulaires et participe aux dommages de l'ADN, à la sénescence et à l'apoptose (Richter & von Zglinicki, 2007). En particulier, l'UPS est sensible aux

modifications de type oxydatif. Un stress oxydatif induit par du peroxyde d'oxygène H_2O_2 conduit à la dissociation des particules 20S et 19S du protéasome 26S, induisant la perte des activités protéolytiques de ce système (Aiken et al, 2011). De plus, les particules 19S et 20S sont susceptibles d'être modifiées par le stress oxydatif. Il a été montré qu'elles peuvent être altérées par carbonylation, *cross-linkage*, S-glutathionylation. Toutes ces modifications oxydatives sont associées à une altération de la fonction du protéasome 26S (Aiken et al, 2011). Ainsi, une explication, bien que spéculative à ce stade, serait que la dysfonction de l'UPS observée dans le cœur des souris Het pourrait être en partie liée à un déséquilibre du statut oxydatif des cellules. Ceci reste bien entendu à explorer dans le cœur des souris Het.

D'autre part, la fonction de l'UPS diminue avec l'âge en raison d'une diminution d'expression des différentes sous-unités, de leur modifications post-traductionnelles, d'une diminution des activités protéolytiques, et de la formation complexes de protéines liées entre-elles (*crossed-linked proteins*) (Vernace et al, 2007b). Une autre cause d'altération de la fonction de l'UPS avec l'âge est la diminution des niveaux d'ATP disponibles pour réaliser toutes les réactions d'assemblage du complexe 26S, d'ubiquitination, de dés-ubiquitination et de dégradation des substrats (Vernace et al, 2007a). Ainsi, des processus de « vieillissement » cardiaque prématuré chez les souris Het, comme je l'ai discuté plus haut, pourraient participer à l'altération de l'UPS.

De façon intéressante, le niveau total de lamines A/C est diminué de l'ordre de 60% dans le muscle squelettique des souris Het, et ce tout au long de leur vie, sans qu'aucune anomalie de ce tissu n'est pu être mise en évidence. Nous n'avons pas encore évalué le ratio de lamines A/C $\Delta K32$ existant dans le muscle, ni la fonction de l'UPS dans le muscle squelettique de ces souris mais ces analyses renseigneraient sans doute sur les spécificités cardiaques de l'UPS dans la dégradation des lamines A/C $\Delta K32$, et pourquoi pas, sur la spécificité cardiaque de l'atteinte liée à cette mutation.

L'activité de l'UPS peut être augmentée *in vivo* par l'expression, via l'injection d'un adénovirus, de la sous-unité activatrice PA28 α (Li et al, 2011a). Il serait tentant d'envisager de moduler l'activité du protéasome chez les souris Het afin de diminuer au maximum le niveau de lamines A/C $\Delta K32$ existant dans le cœur, cependant le niveau de

lamines A/C nécessite d'être finement régulé pour maintenir l'homéostasie et la fonction cardiaque. Aussi, une activation plus grande de l'UPS et donc une diminution du niveau global des lamines A/C reproduirait la situation des souris *Lmna*^{+/-} voire des souris *Lmna*^{-/-}, qui développent des pathologies cardiaques, entre autres (Chandar et al, 2010 ; Cupesi et al, 2010; Nikolova et al, 2004 ; Wolf et al, 2008).

Quels facteurs spécifiques interagissent avec le domaine N-terminal des lamines A/C?

Le niveau de lamines A/C est certes diminué dans le cœur des souris mais elles apparaissent bien localisées. Ceci contraste avec ce qui est observé dans les cellules des souris homozygotes *Lmna*^{ΔK32/ΔK32} chez lesquelles les lamines A/C ΔK32 sont principalement localisées dans le nucléoplasme (Bertrand et al, 2012). Cette différence suggère un rôle des lamines A/C Wt dans la localisation correcte des lamines A/C ΔK32 à l'enveloppe nucléaire chez les souris Het. En revanche, on ne peut exclure que les lamines A/C ΔK32 soient présentes dans le nucléoplasme des cellules Het, comme dans les cellules Homozygotes, mais restent non détectables en immunomarquage de part leur très faible quantité. Quoi qu'il en soit, les résultats d'immunomarquage indiquent que les complexes membranaires de l'enveloppe nucléaire (nesprine 1, SUN1 et 2, lamines B1) sont bien localisés dans les noyaux cardiaques des souris Het, suggérant que le complexe LINC serait préservé.

Outre un défaut de rigidité et/ou d'élasticité, que j'ai suggéré plus haut, on peut donc envisager que des interactions avec certains facteurs spécifiques soient en jeu. Les domaines d'interaction des lamines A/C avec certains de leurs partenaires sont connus et résident principalement dans la partie hélicoïdale ou la partie C-terminale des lamines (Marmioli et al, 2009; Zastrow et al, 2004). Hormis pour l'assemblage des filaments, la partie N-terminale des lamines A/C a été peu étudiée d'un point de vue fonctionnel. En termes d'interactions spécifiques, peu de chose ont été faites et les partenaires protéiques de ce domaine particulier restent largement inconnus. Très récemment, la protéine MLIP (Muscle A-type Lamin Interacting Protein) a été identifiée par un crible double-hybride comme étant la première protéine interagissant directement avec la partie N-terminale des lamines A/C (acides aminés 1 à 130)

(Ahmady et al, 2011). MLIP est spécifique des amniotes et son expression est enrichie dans les muscles lisses et striés squelettiques et cardiaques. Sa délétion hétérozygote conduit à une cardiomyopathie dilatée chez la souris (P. Burgon, données non publiées). Ainsi, MLIP apparaît comme un partenaire important des lamines A/C et pourrait avoir un rôle dans l'établissement de la cardiomyopathie dilatée chez les souris Het *Lmna*^{AK32/+}. L'étude de la fonction de MLIP permettra sans doute de mettre en évidence des mécanismes physiopathologiques spécifiques aux mutations du domaine N-terminal des lamines A/C.

Conclusion et perspectives

Mes travaux de thèse ont permis de caractériser le phénotype des souris *Lmna*^{ΔK32/+}, premier modèle murin reproduisant une mutation existant chez des patients, à développer une cardiomyopathie dilatée à l'état hétérozygote.

Ces souris constituent donc un bon modèle pour tester de nouvelles approches thérapeutiques (thérapie génique et approches pharmacologiques) et pour avancer sur la compréhension des rôles multiples et complexes des lamines A/C dans le cœur et le muscle squelettique.

Si j'ai montré que les mécanismes physiopathologiques cardiaques sont complexes chez la souris Het, faisant intervenir des processus combinés d'haploinsuffisance et de peptide « poison », beaucoup reste à faire pour comprendre comment les lamines mutées exercent leur effet négatif spécifiquement sur le myocarde.

Les deux aspects que j'approfondirais en particulier sont :

1) Pourquoi et comment le stress induit par l'exercice a-t-il conduit à une anticipation de l'apparition de la dysfonction cardiaque chez les souris Het ? Les données de la littérature et celles que j'ai acquises au cours de ma thèse sur la « fragilité » cardiaque au stress mécanique restent très descriptives. Il a été mis en évidence un défaut d'activation de gènes « mécanosensibles » mais les mécanismes exacts restent à déterminer. Je propose donc d'étudier plus finement l'effet des lamines ΔK32 endogène dans des systèmes plus simples *in vitro*. Une étude de la réponse des myoblastes provenant d'un patient porteur de la mutation ΔK32 est en cours au laboratoire. En parallèle, il serait très utile d'étudier la fonction contractile d'EHTs produits à partir de cellules cardiaques issues de souris *Lmna*^{ΔK32/ΔK32} et *Lmna*^{ΔK32/+}, ainsi que leurs réponses en terme de mécanotransduction après un étirement ou des contractions forcées (pacing).

2) Existe-t-il d'autres partenaires protéiques spécifiques du domaine N-terminal des lamines A/C dont l'expression serait spécifiquement cardiaque ? Si oui, quelle part jouent-ils dans l'établissement du phénotype des souris Het ? Cette question étant

centrale pour moi, j'ai choisi d'approfondir cet aspect après ma thèse, par l'étude du rôle cardiaque de la protéine MLIP.

COMPLEMENTS DE MATERIELS ET METHODES

Sacrifices et prélèvements

Les animaux sont sacrifiés par une injection intrapéritonéale d'un mélange Kétamine (80 mg/kg)/Xylazine (15 mg/kg), anesthésique administré à une dose létale (6 µl/g).

Pour les études histologiques, le cœur a été prélevé et plongé dans une solution de KCl 1,3M - PBS 1X pour l'arrêter en diastole. Ils ont ensuite été montés sur bloc de liège avec de la gomme adragante (6 g de Tragant Keimarm dans 150 ml d'eau distillée) puis congelés dans de l'isopentane refroidi à l'azote liquide avant d'être conservés à -80°C.

Pour les études biochimiques et moléculaires, le cœur et les muscles sont prélevés et conservés à 4°C dans du tampon d'extraction protéique (SDS 2%, sucrose à 250 mM, urée à 75 mM, dithiothreitol à 1 mM, Tris-HCl à 50 mM pH 7.5) additionné d'inhibiteurs de protéase (Aprotinine à 25µg/ml et Leupeptine à 20µg/ml) avant que les protéines ou les ARN ne soient extraits de ce tissu frais. Certains échantillons ont été congelés à l'azote liquide et conservés à -80°C avant que les protéines ou les ARN ne soient extraits.

Histologie et immunomarquages

Des sections transversales de 7µm d'épaisseur sont réalisées au cryostat sur les tissus congelés. Les coupes sont colorées à l'hématéine/éosine pour une analyse générale de la structure du tissu (solution d'éosine 10 secondes, rinçage à l'eau courante, solution d'hématéine 30 secondes, rinçage, déshydratation à l'alcool et au xylène, puis montage). Pour visualiser le collagène, des coupes de cœur sont colorées au Rouge Sirius (fixation PAF 4%, glutaralhédyde 0,2% pendant 10 min, Rouge Sirius 15 min, rinçage acide acétique 15%, déshydratation et montage). Pour les marquages immunofluorescents, les coupes sont fixées comme indiqué dans le tableau 10. Après rinçage au PBS1X, le blocage est réalisé avec de la BSA 5% IgG free (Albumine de veau fœtal) dans du PBS1X pendant 30min. Les coupes sont incubées pendant 1h30 avec les anticorps primaires dilués dans du PBS1X-BSA 5% (sauf indication contraire). Après rinçage au PBS1X, les coupes sont incubées pendant 30min avec les anticorps secondaires dilués au 1/500 dans du PBS1X-BSA 5%, à l'obscurité. Le montage est ensuite réalisé avec du Vectashield contenant du DAPI. Les proportions de fibrose, l'aire des cardiomyocytes et la longueur des noyaux sont quantifiées par le logiciel NIS.

Tissu cardiaque reconstitué

Les tissus cardiaques reconstitués ou EHT (*Engineered Heart Tissue*) ont été générés comme décrit précédemment (Hansen et al, 2010). Les cellules cardiaques obtenues après dissociation enzymatique de coeurs de rat nouveaux nés (5.10^5 cellules/EHT) sont mélangées à du fibinogène de boeuf, de l'aprotinine et du milieu DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*). Pour chaque EHT, à 100 μ l de ce mélange sont ajoutés 3 μ l de thrombine puis coulés entre deux postes de silicone, dans une petite rigole en agarose servant de "moule" pour la polymérisation des EHTs. Après 2 heures d'incubation à 37°C, 7% CO₂, les EHTs sont transférés dans une nouvelle plaque de 24 puits avec 1,5 ml de milieu de culture (DMEM). Les EHTs sont transduits, au moment de la préparation du mélange initial, avec un AAV (Adeno-Associated Virus) sérotype 6 codant pour la Flag-Wt-prélamine A humaine ou la Flag- Δ 32-prélamine A humaine avec 3000 génomes viraux par cellule. Les EHTs sont maintenus dans ces conditions de culture pendant 17 jours. A J17, les EHTs ont été traités pendant 24 heures avec 500 nM d'époxomicine, un inhibiteur spécifique du protéasome.

La mesure des propriétés contractiles des EHTs a été réalisée à J8, J11, J13, J15, J17 et J18 par un système de vidéoscopie optique. L'analyse des pics de contractions permet de déterminer la force générée par les EHTs, leurs vitesses de contraction et de relaxation grâce au logiciel développé dans le laboratoire de T. Eschenhagen (Hambourg).

Pour les analyses d'immunofluorescence, les EHTs entiers sont fixés dans de l'Histofix (Roth) sur une nuit (ON) à 4°C. Le blocage est réalisé grâce à une solution de Trix 0,05 M, pH7,4, 10% de sérum de veau fœtal, 1% de sérum albumine bovine et 0,5% de Triton X-100, pendant 24 heures à 4°C. Les incubations avec les anticorps primaires et secondaires sont réalisées selon les conditions indiquées dans le tableau 10 pendant 24 heures à 4°C. L'observation a été réalisée avec un microscope confocal.

Western blot

Les protéines sont extraites à partir de tissus frais ou congelés. Les tissus frais ou congelés sont broyés par la technique FastPrep System (ThermoSavant) dans du tampon d'extraction protéique. Les concentrations protéiques sont déterminées par la méthode colorimétrique de Pierce en utilisant le kit BC Assay (Uptima), en comparant les échantillons à une gamme étalon de BSA de 0,06 à 2 μ g/ μ l. Entre 10 et 60 μ g d'extrait

protéique sont dénaturés à 96°C pendant 5 min dans du tampon de charge Laemmli 1X (SDS 2%, Tris à 65 mM pH 6,8, glycérol 10%, bleu de bromophénol 0,025%, β -mercaptoéthanol 10%) puis maintenus à 4°C jusqu'au dépôt sur gel. Les échantillons sont séparés par migration à 20mA sur un gel SDS-PAGE 10 ou 15%. Les protéines sont transférées sur membrane de nitrocellulose placée dans du tampon de transfert (tampon de migration additionné de 10% d'isopropanol) à 400 mA pendant 2 heures à +4°C. L'efficacité du transfert est vérifiée par coloration de la membrane au Rouge Ponceau (0,1% Ponceau S dans 5% d'acide acétique). Les membranes sont ensuite saturées pendant une heure à température ambiante dans du PBS 1x - Tween 0,1% - lait 5% (PBST-lait) puis incubées à +4°C sur la nuit. Les dilutions et spécificités des anticorps utilisés sont indiquées dans le tableau 10, ils sont généralement dilués dans du PBST-lait 5%, sauf mention contraire. Après 3 rinçages de 5 minutes en PBST, les membranes sont incubées une heure à température ambiante avec des anticorps secondaires (Dako A/S ou Jackson) couplés à la peroxydase du raifort (HRP). Tous les anticorps secondaires sont dilués au 1/2000 dans du PBST-lait 5% pour les anticorps Dako, et 1/40000 ou 1/25000 respectivement pour les anticorps anti-lapin et anti-souris de chez Jackson. Après 3 rinçages de 5 minutes en PBST, l'activité peroxydase est révélée avec du luminol (Immobilon™ Western. Millipore Corporation). La chémiluminescence émise par ces réactifs est visualisée par caméra GBox SynGene avec le logiciel d'acquisition GeneSnap. L'intensité du signal a été quantifiée grâce au logiciel MultiGauge V2.3.

PCR quantitative

Les tissus frais ou congelés sont broyés par la technique FastPrep System (ThermoSavant) dans du tampon d'extraction. Les ARN totaux sont ensuite extraits en utilisant le kit Qiagen RNeasy Fibrous Tissue, selon les instructions du fabricant. Les concentrations d'ARN sont mesurées à l'aide d'un Nanodrop. La transcription inverse est réalisée grâce au kit Invitrogen Superscript III à partir de 250 ng d'ARN total et de « Random Hexamers », permettant l'amplification de tous les ARN, pas seulement les ARNm. L'absence de contamination par de l'ADN génomique est vérifiée par PCR classique en utilisant les amorces *Nppa*, dessinées pour s'hybrider sur deux exons différents. Les ADNc sont dilués au 1/10 et amplifiés par PCR quantitative en utilisant le mix suivant : SyBr Green 1X (Roche) (ou TaqMan hydrolysis Mix), primers (et sondes) aux concentrations indiquées dans le tableau 11 et 2 μ l d'ADNc dilué, pour un volume

final de 20 μ l. L'efficacité d'amplification est calculée à partir d'une gamme étalon sur un échantillon « calibrateur » (Wt) et la spécificité d'amplification est vérifiée par l'analyse des courbes de fusion des produits amplifiés.

Analyse statistique

La significativité des valeurs a été testée sur le logiciel SigmaStat 3.1. par t-test de Student ou Analyse de Variance (ANOVA) et test comparatif de Holm-Sidak. Les valeurs de p inférieures à 0,05 ont été considérées comme statistiquement significatives.

Tableau 10. Anticorps utilisés et conditions d'utilisation en western blot et immunomarquage.

Anticorps	Référence	Conditions d'utilisation en western blot	Conditions d'utilisation en immunomarquage
Lamines A/C N18	Santa Cruz Biotechnology sc-6215 (monoclonal de souris)	-	Dilution : 1/100 Fixation : PAF 4%, 10 min, RT
Lamines A/C H110	Santa Cruz Biotechnology sc-20681 (polyclonal de lapin)	Dilution : 1/2000, ON, 4°	-
Lamines B1	Santa Cruz Biotechnology sc-6216 (polyclonal de chèvre)	-	Dilution : 1/100 Fixation : acétone, 10 min, -20°
Emerine	Fait par G. Morris (polyclonal de lapin)	Dilution : 1/1000, ON, 4°	-
Actine	Sigma Aldrich A2066 (polyclonal de lapin)	Dilution : 1/1000, ON, 4°	-
Sous-unité β 5	Fait par X. Wang (polyclonal de lapin)	Dilution : 1/5000, ON, 4°	-
FLAG-M2	Sigma Aldrich (monoclonal de souris)	F1804 Dilution : 1/1000, ON, 4°	A8592 Dilution : 1/250
GFP	Santa Cruz Biotechnology sc-8334 (polyclonal de lapin)	Dilution : 1/1000, ON, 4°	-
Nesprine 1	MANNES 1E (monoclonal IgG1 de souris)	-	Dilution : 1/100 Fixation : PAF 4%, 10 min, RT
SUN1	Fait par S. Shackelton 2298 (polyclonal de lapin)	-	Dilution : 1/200 Fixation : PAF 4%, 10 min, RT
Vinculine	Sigma Aldrich V-9131 (monoclonal de souris)	Dilution : 1/1000, ON, 4°	Dilution : 1/250, BSA 2% Fixation : aucune
LC3	Cell Signaling Technology 2775 (polyclonal rabbit)	Dilution : 1/1000, lait 1%, ON, 4°	-
p-ERK1/2	Cell Signaling Technology 9101 (polyclonal rabbit)	Dilution : 1/400, ON, 4°	-
ERK1	Santa Cruz Biotechnology sc-93 (polyclonal rabbit)	Dilution : 1/1000, ON, 4°	-
p-JNK	Cell Signaling Technology 9251 (polyclonal rabbit)	Dilution : 1/500, BSA 5%, ON, 4° échantillons soniqués	-
JNK	Santa Cruz Biotechnology sc-571 (polyclonal rabbit)	Dilution : 1/500, BSA 5%, ON, 4° échantillons soniqués	-
MyBPc	Fait par Linke (polyclonal de lapin)	-	Dilution : 1/200
Mono et poly-ubiquitine	Enzo Lifesciences FK2 (monoclonal de souris)	Dilution : 1/5000, ON, 4°	-

Tableau 11. Séquences des amorces et conditions d'utilisation utilisées pour l'analyse en q-PCR.

ADNc cible	Amorces	Séquence (5' - 3')	Température d'hybridation, Concentration finale des amorces
<i>Nppa</i>	For	AGCTTCCACCGAAGATAAC	60°C 0,5 µM
	Rev	TCGTGATAGATGAAGGCAG	
<i>Nppb</i>	For	GTCAGTCGTTTGGGCTGTAAC	60°C 0,5 µM
	Rev	AGACCCAGGCAGAGTCAGAA	
<i>Myh7</i>	For	GACCAGACCCCAGGCAAGGG	65°C 0,5 µM
	Rev	GCCAACTTTCCTGTTGCCCC	
<i>Myh6</i>	For	GGAGTGCTTCGTGCCTGATG	60°C 0,5 µM
	Rev	CTTGTCGAACTTGGGTGGGT	
<i>Egr1</i>	For	CCTATGAGCACCTGACCACA	60°C 0,5 µM
	Rev	TCGTTTGGCTGGGATAACTC	
<i>Iex1</i>	For	GGCGCCAGCTACCAACCGAG	60°C 0,5 µM
	Rev	GACCGGGGGCGCAGTAATGG	
<i>Tgfb1</i>	For	CACCATCCATGACATGAACC	60°C 0,5 µM
	Rev	AGTCAATGTACAGCTGCCGC	
<i>Tgfb2</i>	For	GAAGACCCCACATCTCCTGC	60°C 0,5 µM
	Rev	AGGCAGCAATTATCCTGCAC	
<i>Lmna</i>	For	GCCAGCTCTACCCCACTGT	60°C 0,5 µM
	Rev	CAGACTCAGTGATGCCAAGG	
<i>Lmna Wt</i>	Sonde d'hydrolyse	TGCAGGAGAAGGAGGACCTGC	0,1 µM
<i>Lmna ΔK32</i>	Sonde d'hydrolyse	CTGCAGGAGGAGGACCTGCAGG	0,1 µM
<i>Elk1</i>	For	CTGCTCCCCACACATACCTT	65°C 0,2 µM
	Rev	GAGAGGCCATCCCACTGAT	
<i>Elk4</i>	For	TTTTGGAGCACTCTCAGCCCCTTT	60°C 0,5 µM
	Rev	TGAACGGGCCATGACTGTTGAGTA	

<i>c-jun</i>	For	TTGAAAGCGCAAAACTCCGAGC	65°C 0,5 µM
	Rev	TGCAACTGCTGCGTTAGCATGAGT	
<i>JunD</i>	For	CGACCAGTACGCAGTTCCTC	65°C 0,5 µM
	Rev	AACTGCTCAGGTTGGCGTAG	
<i>Cmya5</i>	For	ACATTCACAAAGACCACGAG	60°C 0,25 µM
	Rev	TCCTAATTGAACCTTAACAGC	
<i>Kcdt14</i>	For	AGGTGCCACAGAGTACGTTC	60°C 0,25 µM
	Rev	GGCATGTCTTCCAAAATCTTGACC	
<i>Rin1</i>	For	ACCAGAATGGCAGCAAAGCTC	60°C 0,25 µM
	Rev	TCATATCCCTTCTTTGCACACC	
<i>Tnc</i>	For	TTGTTTGGCCTCACTCCCGAA	60°C 0,25 µM
	Rev	TTTAGCCCCTCTCTCGCTTG	
<i>Trp53rk</i>	For	CGCGTTTTCCGTGGCCGCTTCCAG	60°C 0,25 µM
	Rev	CCGCGCCTCCAGCTCCGGGTG	
<i>Pde4dip</i>	For	TGTCTTGATTGATGTGAGCCT	60°C 0,25 µM
	Rev	AAGTCCCCTTCCCAACATGC	
<i>Itgb1bp3</i>	For	CATCTCAGGACCAGTCACCT	60°C 0,25 µM
	Rev	CTGTTGGTCAGGGTGGTCTT	
<i>Rik</i>	For	GTATCTGGCTCAACCCTCTG	60°C 0,25 µM
	Rev	AAATACAAACAGAAGCAATCCC	
<i>Kif22</i>	For	ACATTGCTCCTGAAAGACGTT	60°C 0,25 µM
	Rev	CGGTTAATCACCTCCTTGGAC	
<i>Gtse1</i>	For	TCTGATGTGGCCTTAGACCTG	60°C 0,25 µM
	Rev	ACCACTCAGACACGAGCAG	
<i>E2f1</i>	For	TCCTGAGACCCAACTACAAGC	60°C 0,25 µM
	Rev	CAATGGGGCCTTGTTTGCTCT	
<i>Rplp0</i>	For	CTCCAAGCAGATGCAGCAGA	60°C 0,5 µM
	Rev	ATAGCCTTGCGCATCATGGT	

Bibliographie

Abedin M, Tintut Y, Demer LL (2004) Mesenchymal stem cells and the artery wall. *Circ Res* **95**: 671-676

Aebi U, Cohn J, Buhle L, Gerace L (1986) The nuclear lamina is a meshwork of intermediate-type filaments. *Nature* **323**: 560-564

Ahern CA, Powers PA, Biddlecome GH, Roethe L, Vallejo P, Mortenson L, Strube C, Campbell KP, Coronado R, Gregg RG (2001) Modulation of L-type Ca²⁺ current but not activation of Ca²⁺ release by the gamma1 subunit of the dihydropyridine receptor of skeletal muscle. *BMC Physiol* **1**: 8

Ahmady E, Deeke SA, Rabaa S, Kouri L, Kenney L, Stewart AF, Burgon PG (2011) Identification of a novel muscle A-type lamin-interacting protein (MLIP). *J Biol Chem* **286**: 19702-19713

Aiken CT, Kaake RM, Wang X, Huang L (2011) Oxidative stress-mediated regulation of proteasome complexes. *Mol Cell Proteomics* **10**: R110 006924

Akter R, Rivas D, Geneau G, Drissi H, Duque G (2009) Effect of lamin A/C knockdown on osteoblast differentiation and function. *J Bone Miner Res* **24**: 283-293

Al-Shali KZ, Hegele RA (2004) Laminopathies and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **24**: 1591-1595

Alcendor RR, Gao S, Zhai P, Zablocki D, Holle E, Yu X, Tian B, Wagner T, Vatner SF, Sadoshima J (2007) Sirt1 regulates aging and resistance to oxidative stress in the heart. *Circ Res* **100**: 1512-1521

Alsheimer M, Benavente R (1996) Change of karyoskeleton during mammalian spermatogenesis: expression pattern of nuclear lamin C2 and its regulation. *Exp Cell Res* **228**: 181-188

Andersson KB, Florholmen G, Winer LH, Tonnessen T, Christensen G (2006) Regulation of neuronal type genes in congestive heart failure rats. *Acta Physiol (Oxf)* **186**: 17-27

Angelis E, Garcia A, Chan SS, Schenke-Layland K, Ren S, Goodfellow SJ, Jordan MC, Roos KP, White RJ, MacLellan WR (2008) A cyclin D2-Rb pathway regulates cardiac myocyte size and RNA polymerase III after biomechanical stress in adult myocardium. *Circ Res* **102**: 1222-1229

Arbustini E, Pilotto A, Repetto A, Grasso M, Negri A, Diegoli M, Campana C, Scelsi L, Baldini E, Gavazzi A, Tavazzi L (2002) Autosomal dominant dilated cardiomyopathy with atrioventricular block: a lamin A/C defect-related disease. *J Am Coll Cardiol* **39**: 981-990

Arimura T, Helbling-Leclerc A, Massart C, Varnous S, Niel F, Lacene E, Fromes Y, Toussaint M, Mura AM, Keller DI, Amthor H, Isnard R, Malissen M, Schwartz K, Bonne G (2005) Mouse model carrying H222P-Lmna mutation develops muscular dystrophy and

dilated cardiomyopathy similar to human striated muscle laminopathies. *Hum Mol Genet* **14**: 155-169

Arimura T, Sato R, Machida N, Bando H, Zhan DY, Morimoto S, Tanaka R, Yamane Y, Bonne G, Kimura A (2010) Improvement of left ventricular dysfunction and of survival prognosis of dilated cardiomyopathy by administration of calcium sensitizer SCH0013 in a mouse model. *Journal of the American College of Cardiology* **55**: 1503-1505

Arola AM, Sanchez X, Murphy RT, Hasle E, Li H, Elliott PM, McKenna WJ, Towbin JA, Bowles NE (2007) Mutations in PDLIM3 and MYOZ1 encoding myocyte Z line proteins are infrequently found in idiopathic dilated cardiomyopathy. *Mol Genet Metab* **90**: 435-440

Arslan M, Qin Z, Buehler MJ (2011) Coiled-coil intermediate filament stutter instability and molecular unfolding. *Comput Methods Biomech Biomed Engin* **14**: 483-489

Asakura M, Kitakaze M (2009) Global gene expression profiling in the failing myocardium. *Circ J* **73**: 1568-1576

Asher G, Lotem J, Sachs L, Kahana C, Shaul Y (2002) Mdm-2 and ubiquitin-independent p53 proteasomal degradation regulated by NQO1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 13125-13130

Attali R, Warwar N, Israel A, Gurt I, McNally E, Puckelwartz M, Glick B, Nevo Y, Ben-Neriah Z, Melki J (2009) Mutation of SYNE-1, encoding an essential component of the nuclear lamina, is responsible for autosomal recessive arthrogyriposis. *Hum Mol Genet* **18**: 3462-3469

Balasubramanian S, Mani S, Shiraishi H, Johnston RK, Yamane K, Willey CD, Cooper Gt, Tuxworth WJ, Kuppaswamy D (2006) Enhanced ubiquitination of cytoskeletal proteins in pressure overloaded myocardium is accompanied by changes in specific E3 ligases. *J Mol Cell Cardiol* **41**: 669-679

Bank EM, Ben-Harush K, Wiesel-Motiuk N, Barkan R, Feinstein N, Lotan O, Medalia O, Gruenbaum Y (2011) A laminopathic mutation disrupting lamin filament assembly causes disease-like phenotypes in *Caenorhabditis elegans*. *Mol Biol Cell* **22**: 2716-2728

Barberi T, Willis LM, Socci ND, Studer L (2005) Derivation of multipotent mesenchymal precursors from human embryonic stem cells. *PLoS Med* **2**: e161

Barresi R, Di Blasi C, Negri T, Brugnoli R, Vitali A, Felisari G, Salandi A, Daniel S, Cornelio F, Morandi L, Mora M (2000) Disruption of heart sarcoglycan complex and severe cardiomyopathy caused by beta sarcoglycan mutations. *J Med Genet* **37**: 102-107

Barrowman J, Hamblet C, George CM, Michaelis S (2008) Analysis of prelamin A biogenesis reveals the nucleus to be a CaaX processing compartment. *Mol Biol Cell* **19**: 5398-5408

Barth AS, Kuner R, Bunes A, Ruschhaupt M, Merk S, Zwermann L, Kaab S, Kreuzer E, Steinbeck G, Mansmann U, Poustka A, Nabauer M, Sultmann H (2006) Identification of a

common gene expression signature in dilated cardiomyopathy across independent microarray studies. *Journal of the American College of Cardiology* **48**: 1610-1617

Barth PG, Scholte HR, Berden JA, Van der Klei-Van Moorsel JM, Luyt-Houwen IE, Van 't Veer-Korthof ET, Van der Harten JJ, Sobotka-Plojhar MA (1983) An X-linked mitochondrial disease affecting cardiac muscle, skeletal muscle and neutrophil leucocytes. *J Neurol Sci* **62**: 327-355

Baumeister W, Walz J, Zuhl F, Seemuller E (1998) The proteasome: paradigm of a self-compartmentalizing protease. *Cell* **92**: 367-380

Becane HM, Bonne G, Varnous S, Muchir A, Ortega V, Hammouda EH, Urtizbera JA, Lavergne T, Fardeau M, Eymard B, Weber S, Schwartz K, Duboc D (2000) High incidence of sudden death with conduction system and myocardial disease due to lamins A and C gene mutation. *Pacing Clin Electrophysiol* **23**: 1661-1666

Bello NF, Lamsoul I, Heuze ML, Metais A, Moreaux G, Calderwood DA, Duprez D, Moog-Lutz C, Lutz PG (2009) The E3 ubiquitin ligase specificity subunit ASB2beta is a novel regulator of muscle differentiation that targets filamin B to proteasomal degradation. *Cell Death Differ* **16**: 921-932

Benedetti S, Menditto I, Degano M, Rodolico C, Merlini L, D'Amico A, Palmucci L, Berardinelli A, Pegoraro E, Trevisan CP, Morandi L, Moroni I, Galluzzi G, Bertini E, Toscano A, Olive M, Bonne G, Mari F, Caldara R, Fazio R, Mammi I, Carrera P, Toniolo D, Comi G, Quattrini A, Ferrari M, Previtali SC (2007) Phenotypic clustering of lamin A/C mutations in neuromuscular patients. *Neurology* **69**: 1285-1292

Bergmann O, Bhardwaj RD, Bernard S, Zdunek S, Barnabe-Heider F, Walsh S, Zupicich J, Alkass K, Buchholz BA, Druid H, Jovinge S, Frisen J (2009) Evidence for cardiomyocyte renewal in humans. *Science* **324**: 98-102

Bergo MO, Gavino B, Ross J, Schmidt WK, Hong C, Kendall LV, Mohr A, Meta M, Genant H, Jiang Y, Wisner ER, Van Bruggen N, Carano RA, Michaelis S, Griffey SM, Young SG (2002) Zmpste24 deficiency in mice causes spontaneous bone fractures, muscle weakness, and a prelamin A processing defect. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 13049-13054

Bernstein D (2003) Exercise assessment of transgenic models of human cardiovascular disease. *Physiol Genomics* **13**: 217-226

Bertrand AT, Chikhaoui K, Ben Yaou R, Bonne G (2011a) [Laminopathies: one gene, several diseases]. *Biol Aujourd'hui* **205**: 147-162

Bertrand AT, Chikhaoui K, Yaou RB, Bonne G (2011b) Clinical and genetic heterogeneity in laminopathies. *Biochem Soc Trans* **39**: 1687-1692

Bertrand AT, Renou L, Papadopoulos A, Beuvin M, Lacene E, Massart C, Ottolenghi C, Decostre V, Maron S, Schlossarek S, Cattin ME, Carrier L, Malissen M, Arimura T, Bonne G (2012) DelK32-lamin A/C has abnormal location and induces incomplete tissue maturation and severe metabolic defects leading to premature death. *Hum Mol Genet* **21**: 1037-1048

Bevan N, Scott S, Shaw PE, Lee MG, Marshall FH, Rees S (1998) Nociception activates Elk-1 and Sap1a following expression of the ORL1 receptor in Chinese hamster ovary cells. *Neuroreport* **9**: 2703-2708

Bhattacharyya A, Basra SS, Sen P, Kar B (2012) Peripartum cardiomyopathy: a review. *Tex Heart Inst J* **39**: 8-16

Bienengraeber M, Olson TM, Selivanov VA, Kathmann EC, O'Coilain F, Gao F, Karger AB, Ballew JD, Hodgson DM, Zingman LV, Pang YP, Alekseev AE, Terzic A (2004) ABCC9 mutations identified in human dilated cardiomyopathy disrupt catalytic KATP channel gating. *Nat Genet* **36**: 382-387

Bione S, Maestrini E, Rivella S, Mancini M, Regis S, Romeo G, Toniolo D (1994) Identification of a novel X-linked gene responsible for Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Nat Genet* **8**: 323-327

Birks EJ, Latif N, Enesa K, Folkvang T, Luong le A, Sarathchandra P, Khan M, Ovaas H, Terracciano CM, Barton PJ, Yacoub MH, Evans PC (2008) Elevated p53 expression is associated with dysregulation of the ubiquitin-proteasome system in dilated cardiomyopathy. *Cardiovasc Res* **79**: 472-480

Bogoyevitch MA, Kobe B (2006) Uses for JNK: the many and varied substrates of the c-Jun N-terminal kinases. *Microbiol Mol Biol Rev* **70**: 1061-1095

Boito CA, Melacini P, Vianello A, Prandini P, Gavassini BF, Bagattin A, Siciliano G, Angelini C, Pegoraro E (2005) Clinical and molecular characterization of patients with limb-girdle muscular dystrophy type 2I. *Arch Neurol* **62**: 1894-1899

Bonne G, Carrier L, Bercovici J, Cruaud C, Richard P, Hainque B, Gautel M, Labeit S, James M, Beckmann J, Weissenbach J, Vosberg HP, Fiszman M, Komajda M, Schwartz K (1995) Cardiac myosin binding protein-C gene splice acceptor site mutation is associated with familial hypertrophic cardiomyopathy. *Nat Genet* **11**: 438-440

Bonne G, Di Barletta MR, Varnous S, Becane HM, Hammouda EH, Merlini L, Muntoni F, Greenberg CR, Gary F, Urtizbera JA, Duboc D, Fardeau M, Toniolo D, Schwartz K (1999) Mutations in the gene encoding lamin A/C cause autosomal dominant Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Nat Genet* **21**: 285-288

Boriani G, Gallina M, Merlini L, Bonne G, Toniolo D, Amati S, Biffi M, Martignani C, Frabetti L, Bonvicini M, Rapezzi C, Branzi A (2003) Clinical relevance of atrial fibrillation/flutter, stroke, pacemaker implant, and heart failure in Emery-Dreifuss muscular dystrophy: a long-term longitudinal study. *Stroke* **34**: 901-908

Bosco EE, Mayhew CN, Hennigan RF, Sage J, Jacks T, Knudsen ES (2004) RB signaling prevents replication-dependent DNA double-strand breaks following genotoxic insult. *Nucleic Acids Res* **32**: 25-34

Bose S, Mason GG, Rivett AJ (1999) Phosphorylation of proteasomes in mammalian cells. *Mol Biol Rep* **26**: 11-14

Brauch KM, Karst ML, Herron KJ, de Andrade M, Pellikka PA, Rodeheffer RJ, Michels VV, Olson TM (2009) Mutations in ribonucleic acid binding protein gene cause familial dilated cardiomyopathy. *Journal of the American College of Cardiology* **54**: 930-941

Brodsky GL, Muntoni F, Miodic S, Sinagra G, Sewry C, Mestroni L (2000) Lamin A/C gene mutation associated with dilated cardiomyopathy with variable skeletal muscle involvement. *Circulation* **101**: 473-476

Broers JL, Machiels BM, van Eys GJ, Kuijpers HJ, Manders EM, van Driel R, Ramaekers FC (1999) Dynamics of the nuclear lamina as monitored by GFP-tagged A-type lamins. *J Cell Sci* **112 (Pt 20)**: 3463-3475

Broers JL, Peeters EA, Kuijpers HJ, Endert J, Bouten CV, Oomens CW, Baaijens FP, Ramaekers FC (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

Broers JL, Ramaekers FC, Bonne G, Yaou RB, Hutchison CJ (2006) Nuclear lamins: laminopathies and their role in premature ageing. *Physiol Rev* **86**: 967-1008

Brower GL, Gardner JD, Forman MF, Murray DB, Voloshenyuk T, Levick SP, Janicki JS (2006) The relationship between myocardial extracellular matrix remodeling and ventricular function. *Eur J Cardiothorac Surg* **30**: 604-610

Bueno OF, De Windt LJ, Tymitz KM, Witt SA, Kimball TR, Klevitsky R, Hewett TE, Jones SP, Lefer DJ, Peng CF, Kitsis RN, Molkentin JD (2000) The MEK1-ERK1/2 signaling pathway promotes compensated cardiac hypertrophy in transgenic mice. *Embo J* **19**: 6341-6350

Burger EH, Klein-Nulend J (1999) Mechanotransduction in bone--role of the lacuno-canalicular network. *Faseb J* **13 Suppl**: S101-112

Burkett EL, Hershberger RE (2005) Clinical and genetic issues in familial dilated cardiomyopathy. *Journal of the American College of Cardiology* **45**: 969-981

Busch A, Kiel T, Heupel WM, Wehnert M, Hubner S (2009) Nuclear protein import is reduced in cells expressing nuclear envelopathy-causing lamin A mutants. *Exp Cell Res* **315**: 2373-2385

Bushby KM, Beckmann JS (2003) The 105th ENMC sponsored workshop: pathogenesis in the non-sarcoglycan limb-girdle muscular dystrophies, Naarden, April 12-14, 2002. *Neuromuscul Disord* **13**: 80-90

Buyandelger B, Ng KE, Miodic S, Gunkel S, Piotrowska I, Ku CH, Knoll R (2011) Genetics of mechanosensation in the heart. *J Cardiovasc Transl Res* **4**: 238-244

Caille N, Thoumine O, Tardy Y, Meister JJ (2002) Contribution of the nucleus to the mechanical properties of endothelial cells. *J Biomech* **35**: 177-187

Calo L, De Ruvo E, Sette A, Sciarra L, Scioli R, Sebastiani F, Topai M, Iulianella R, Navone G, Lioy E, Gaita F (2007) Tachycardia-induced cardiomyopathy: mechanisms of heart failure and clinical implications. *J Cardiovasc Med (Hagerstown)* **8**: 138-143

Calvo F, Teijeira S, Fernandez JM, Teijeiro A, Fernandez-Hojas R, Fernandez-Lopez XA, Martin E, Navarro C (2000) Evaluation of heart involvement in gamma-sarcoglycanopathy (LGMD2C). A study of ten patients. *Neuromuscul Disord* **10**: 560-566

Campisi J (2005) Aging, tumor suppression and cancer: high wire-act! *Mech Ageing Dev* **126**: 51-58

Canagarajah BJ, Khokhlatchev A, Cobb MH, Goldsmith EJ (1997) Activation mechanism of the MAP kinase ERK2 by dual phosphorylation. *Cell* **90**: 859-869

Cao F, Wagner RA, Wilson KD, Xie X, Fu JD, Drukker M, Lee A, Li RA, Gambhir SS, Weissman IL, Robbins RC, Wu JC (2008) Transcriptional and functional profiling of human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes. *PLoS One* **3**: e3474

Cao H, Hegele RA (2000) Nuclear lamin A/C R482Q mutation in canadian kindreds with Dunnigan-type familial partial lipodystrophy. *Hum Mol Genet* **9**: 109-112

Capanni C, Mattioli E, Columbaro M, Lucarelli E, Parnaik VK, Novelli G, Wehnert M, Cenni V, Maraldi NM, Squarzone S, Lattanzi G (2005) Altered pre-lamin A processing is a common mechanism leading to lipodystrophy. *Hum Mol Genet* **14**: 1489-1502

Castella M, Buckberg GD, Saleh S, Gharib M (2005) Structure function interface with sequential shortening of basal and apical components of the myocardial band. *Eur J Cardiothorac Surg* **27**: 980-987

Castellano G, Affuso F, Di Conza P, Fazio S (2008) Myocarditis and dilated cardiomyopathy: possible connections and treatments. *J Cardiovasc Med (Hagerstown)* **9**: 666-671

Caux F, Dubosclard E, Lascols O, Buendia B, Chazouilleres O, Cohen A, Courvalin JC, Laroche L, Capeau J, Vigouroux C, Christin-Maitre S (2003) A new clinical condition linked to a novel mutation in lamins A and C with generalized lipoatrophy, insulin-resistant diabetes, disseminated leukomelanodermic papules, liver steatosis, and cardiomyopathy. *J Clin Endocrinol Metab* **88**: 1006-1013

Chakravarthy MV, Abraha TW, Schwartz RJ, Fiorotto ML, Booth FW (2000) Insulin-like growth factor-I extends in vitro replicative life span of skeletal muscle satellite cells by enhancing G1/S cell cycle progression via the activation of phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signaling pathway. *J Biol Chem* **275**: 35942-35952

Chandar S, Yeo LS, Leimena C, Tan JC, Xiao XH, Nikolova-Krstevski V, Yasuoka Y, Gardiner-Garden M, Wu J, Kesteven S, Karlsdotter L, Natarajan S, Carlton A, Rainer S, Feneley MP, Fatkin D (2010) Effects of mechanical stress and carvedilol in lamin A/C-deficient dilated cardiomyopathy. *Circ Res* **106**: 573-582

Chaouch M, Allal Y, De Sandre-Giovannoli A, Vallat JM, Amer-el-Khedoud A, Kassouri N, Chaouch A, Sindou P, Hammadouche T, Tazir M, Levy N, Grid D (2003) The phenotypic

manifestations of autosomal recessive axonal Charcot-Marie-Tooth due to a mutation in Lamin A/C gene. *Neuromuscul Disord* **13**: 60-67

Charniot JC, Bonnefont-Rousselot D, Marchand C, Zerhouni K, Vignat N, Peynet J, Plotkine M, Legrand A, Artigou JY (2007) Oxidative stress implication in a new phenotype of amyotrophic quadricipital syndrome with cardiac involvement due to lamin A/C mutation. *Free Radic Res* **41**: 424-431

Chen L, Lee L, Kudlow BA, Dos Santos HG, Sletvold O, Shafeghati Y, Botha EG, Garg A, Hanson NB, Martin GM, Mian IS, Kennedy BK, Oshima J (2003) LMNA mutations in atypical Werner's syndrome. *Lancet* **362**: 440-445

Chen M, Zsengeller Z, Xiao CY, Szabo C (2004) Mitochondrial-to-nuclear translocation of apoptosis-inducing factor in cardiac myocytes during oxidant stress: potential role of poly(ADP-ribose) polymerase-1. *Cardiovasc Res* **63**: 682-688

Chen PL, Riley DJ, Chen Y, Lee WH (1996) Retinoblastoma protein positively regulates terminal adipocyte differentiation through direct interaction with C/EBPs. *Genes Dev* **10**: 2794-2804

Chen Q, Liu JB, Horak KM, Zheng H, Kumarapeli AR, Li J, Li F, Gerdes AM, Wawrousek EF, Wang X (2005) Intrasarcolemmal amyloidosis impairs proteolytic function of proteasomes in cardiomyocytes by compromising substrate uptake. *Circ Res* **97**: 1018-1026

Cloud JE, Rogers C, Reza TL, Ziebold U, Stone JR, Picard MH, Caron AM, Bronson RT, Lees JA (2002) Mutant mouse models reveal the relative roles of E2F1 and E2F3 in vivo. *Mol Cell Biol* **22**: 2663-2672

Coffinier C, Chang SY, Nobumori C, Tu Y, Farber EA, Toth JI, Fong LG, Young SG (2010a) Abnormal development of the cerebral cortex and cerebellum in the setting of lamin B2 deficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 5076-5081

Coffinier C, Jung HJ, Li Z, Nobumori C, Yun UJ, Farber EA, Davies BS, Weinstein MM, Yang SH, Lammerding J, Farahani JN, Bentolila LA, Fong LG, Young SG (2010b) Direct synthesis of lamin A, bypassing prelamin A processing, causes misshapen nuclei in fibroblasts but no detectable pathology in mice. *J Biol Chem* **285**: 20818-20826

Constantinescu D, Gray HL, Sammak PJ, Schatten GP, Csoka AB (2006) Lamin A/C expression is a marker of mouse and human embryonic stem cell differentiation. *Stem Cells* **24**: 177-185

Cooper Gt (2006) Cytoskeletal networks and the regulation of cardiac contractility: microtubules, hypertrophy, and cardiac dysfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **291**: H1003-1014

Cowling BS, McGrath MJ, Nguyen MA, Cottle DL, Kee AJ, Brown S, Schessl J, Zou Y, Joya J, Bonnemann CG, Hardeman EC, Mitchell CA (2008) Identification of FHL1 as a regulator of skeletal muscle mass: implications for human myopathy. *J Cell Biol* **183**: 1033-1048

- 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
- Cupesi M, Yoshioka J, Gannon J, Kudinova A, Stewart CL, Lammerding J (2010) Attenuated hypertrophic response to pressure overload in a lamin A/C haploinsufficiency mouse. *J Mol Cell Cardiol* **48**: 1290-1297
- Cutler DA, Sullivan T, Marcus-Samuels B, Stewart CL, Reitman ML (2002) Characterization of adiposity and metabolism in Lmna-deficient mice. *Biochemical and biophysical research communications* **291**: 522-527
- D'Adamo P, Fassone L, Gedeon A, Janssen EA, Bione S, Bolhuis PA, Barth PG, Wilson M, Haan E, Orstavik KH, Patton MA, Green AJ, Zammarchi E, Donati MA, Toniolo D (1997) The X-linked gene G4.5 is responsible for different infantile dilated cardiomyopathies. *American journal of human genetics* **61**: 862-867
- D'Amico A, Haliloglu G, Richard P, Talim B, Maugenre S, Ferreira A, Guicheney P, Menditto I, Benedetti S, Bertini E, Bonne G, Topaloglu H (2005) Two patients with 'Dropped head syndrome' due to mutations in LMNA or SEPN1 genes. *Neuromuscul Disord* **15**: 521-524
- Dahl KN, Engler AJ, Pajerowski JD, Discher DE (2005) Power-law rheology of isolated nuclei with deformation mapping of nuclear substructures. *Biophys J* **89**: 2855-2864
- Dahl KN, Kahn SM, Wilson KL, Discher DE (2004) The nuclear envelope lamina network has elasticity and a compressibility limit suggestive of a molecular shock absorber. *J Cell Sci* **117**: 4779-4786
- Daigle N, Beaudouin J, Hartnell L, Imreh G, Hallberg E, Lippincott-Schwartz J, Ellenberg J (2001) Nuclear pore complexes form immobile networks and have a very low turnover in live mammalian cells. *J Cell Biol* **154**: 71-84
- Dalakas MC, Park KY, Semino-Mora C, Lee HS, Sivakumar K, Goldfarb LG (2000) Desmin myopathy, a skeletal myopathy with cardiomyopathy caused by mutations in the desmin gene. *N Engl J Med* **342**: 770-780
- Dalton S, Treisman R (1992) Characterization of SAP-1, a protein recruited by serum response factor to the c-fos serum response element. *Cell* **68**: 597-612
- Davies BS, Barnes RH, 2nd, Tu Y, Ren S, Andres DA, Spielmann HP, Lammerding J, Wang Y, Young SG, Fong LG (2010) An accumulation of non-farnesylated prelamin A causes cardiomyopathy but not progeria. *Hum Mol Genet* **19**: 2682-2694
- De Sandre-Giovannoli A, Bernard R, Cau P, Navarro C, Amiel J, Boccaccio I, Lyonnet S, Stewart CL, Munnich A, Le Merrer M, Levy N (2003) Lamin a truncation in Hutchinson-Gilford progeria. *Science* **300**: 2055
- De Sandre-Giovannoli A, Chaouch M, Kozlov S, Vallat JM, Tazir M, Kassouri N, Szepietowski P, Hammadouche T, Vandenberghe A, Stewart CL, Grid D, Levy N (2002) Homozygous defects in LMNA, encoding lamin A/C nuclear-envelope proteins, cause

autosomal recessive axonal neuropathy in human (Charcot-Marie-Tooth disorder type 2) and mouse. *American journal of human genetics* **70**: 726-736

Dechat T, Adam SA, Goldman RD (2009) Nuclear lamins and chromatin: when structure meets function. *Adv Enzyme Regul* **49**: 157-166

Dechat T, Gesson K, Foisner R (2010) Lamina-independent lamins in the nuclear interior serve important functions. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **75**: 533-543

Depre C, Wang Q, Yan L, Hedhli N, Peter P, Chen L, Hong C, Hittinger L, Ghaleh B, Sadoshima J, Vatner DE, Vatner SF, Madura K (2006) Activation of the cardiac proteasome during pressure overload promotes ventricular hypertrophy. *Circulation* **114**: 1821-1828

Diguet N, Mallat Y, Ladouce R, Clodic G, Prola A, Tritsch E, Blanc J, Larcher JC, Delcayre C, Samuel JL, Friguet B, Bolbach G, Li Z, Mericskay M (2011) Muscle creatine kinase deficiency triggers both actin depolymerization and desmin disorganization by advanced glycation end products in dilated cardiomyopathy. *J Biol Chem* **286**: 35007-35019

Ding WX, Ni HM, Gao W, Yoshimori T, Stolz DB, Ron D, Yin XM (2007) Linking of autophagy to ubiquitin-proteasome system is important for the regulation of endoplasmic reticulum stress and cell viability. *Am J Pathol* **171**: 513-524

Dreuillet C, Tillit J, Kress M, 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

Duboscq-Bidot L, Charron P, Ruppert V, Fauchier L, Richter A, Tavazzi L, Arbustini E, Wichter T, Maisch B, Komajda M, Isnard R, Villard E (2009) Mutations in the ANKRD1 gene encoding CARP are responsible for human dilated cardiomyopathy. *European heart journal* **30**: 2128-2136

Duboscq-Bidot L, Xu P, Charron P, Neyroud N, Dilanian G, Millaire A, Bors V, Komajda M, Villard E (2008) Mutations in the Z-band protein myopalladin gene and idiopathic dilated cardiomyopathy. *Cardiovasc Res* **77**: 118-125

Dufour CR, Wilson BJ, Huss JM, Kelly DP, Alaynick WA, Downes M, Evans RM, Blanchette M, Giguere V (2007) Genome-wide orchestration of cardiac functions by the orphan nuclear receptors ERRalpha and gamma. *Cell Metab* **5**: 345-356

Durham JT, Brand OM, Arnold M, Reynolds JG, Muthukumar L, Weiler H, Richardson JA, Naya FJ (2006) Myospryn is a direct transcriptional target for MEF2A that encodes a striated muscle, alpha-actinin-interacting, costamere-localized protein. *J Biol Chem* **281**: 6841-6849

Emery AE (2000) Emery-Dreifuss muscular dystrophy - a 40 year retrospective. *Neuromuscul Disord* **10**: 228-232

- Enrico O, Gabriele B, Nadia C, Sara G, Daniele V, Giulia C, Antonio S, Mario P (2007) Unexpected cardiotoxicity in haematological bortezomib treated patients. *Br J Haematol* **138**: 396-397
- Ericsson M, Andersson KB, Amundsen BH, Torp SH, Sjaastad I, Christensen G, Sejersted OM, Ellingsen O (2010) High-intensity exercise training in mice with cardiomyocyte-specific disruption of Serca2. *J Appl Physiol* **108**: 1311-1320
- Eriksson M, Brown WT, Gordon LB, Glynn MW, Singer J, Scott L, Erdos MR, Robbins CM, Moses TY, Berglund P, Dutra A, Pak E, Durkin S, Csoka AB, Boehnke M, Glover TW, Collins FS (2003) Recurrent de novo point mutations in lamin A cause Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Nature* **423**: 293-298
- Espada J, Varela I, Flores I, Ugalde AP, Cadinanos J, Pendas AM, Stewart CL, Tryggvason K, Blasco MA, Freije JM, Lopez-Otin C (2008) Nuclear envelope defects cause stem cell dysfunction in premature-aging mice. *J Cell Biol* **181**: 27-35
- Fanin M, Melacini P, Boito C, Pegoraro E, Angelini C (2003) LGMD2E patients risk developing dilated cardiomyopathy. *Neuromuscul Disord* **13**: 303-309
- Fatkin D, MacRae C, Sasaki T, Wolff MR, Porcu M, Frenneaux M, Atherton J, Vidaillet HJ, Jr., Spudich S, De Girolami U, Seidman JG, Seidman C, Muntoni F, Muehle G, Johnson W, McDonough B (1999) Missense mutations in the rod domain of the lamin A/C gene as causes of dilated cardiomyopathy and conduction-system disease. *N Engl J Med* **341**: 1715-1724
- Favreau C, Delbarre E, Courvalin JC, Buendia B (2008) Differentiation of C2C12 myoblasts expressing lamin A mutated at a site responsible for Emery-Dreifuss muscular dystrophy is improved by inhibition of the MEK-ERK pathway and stimulation of the PI3-kinase pathway. *Exp Cell Res* **314**: 1392-1405
- Favreau C, Higuete D, Courvalin JC, Buendia B (2004) Expression of a mutant lamin A that causes Emery-Dreifuss muscular dystrophy inhibits in vitro differentiation of C2C12 myoblasts. *Mol Cell Biol* **24**: 1481-1492
- Fernando P, Bonen A, Hoffman-Goetz L (1993) Predicting submaximal oxygen consumption during treadmill running in mice. *Can J Physiol Pharmacol* **71**: 854-857
- Ferre P, Foufelle F (2007) SREBP-1c transcription factor and lipid homeostasis: clinical perspective. *Horm Res* **68**: 72-82
- Ferrell JE, Jr. (1996) Tripping the switch fantastic: how a protein kinase cascade can convert graded inputs into switch-like outputs. *Trends Biochem Sci* **21**: 460-466
- Ferrington DA, Husom AD, Thompson LV (2005) Altered proteasome structure, function, and oxidation in aged muscle. *Faseb J* **19**: 644-646
- Firnbach-Kraft I, Stick R (1995) Analysis of nuclear lamin isoprenylation in *Xenopus* oocytes: isoprenylation of lamin B3 precedes its uptake into the nucleus. *J Cell Biol* **129**: 17-24

Fliegel L (2009) Regulation of the Na(+)/H(+) exchanger in the healthy and diseased myocardium. *Expert Opin Ther Targets* **13**: 55-68

Floyd ZE, Trausch-Azar JS, Reinstein E, Ciechanover A, Schwartz AL (2001) The nuclear ubiquitin-proteasome system degrades MyoD. *J Biol Chem* **276**: 22468-22475

Fong LG, Ng JK, Lammerding J, Vickers TA, Meta M, Cote N, Gavino B, Qiao X, Chang SY, Young SR, Yang SH, Stewart CL, Lee RT, Bennett CF, Bergo MO, Young SG (2006) Prelamin A and lamin A appear to be dispensable in the nuclear lamina. *J Clin Invest* **116**: 743-752

Forissier JF, Bonne G, Bouchier C, Duboscq-Bidot L, Richard P, Wisnewski C, Briault S, Moraine C, Dubourg O, Schwartz K, Komajda M (2003) Apical left ventricular aneurysm without atrio-ventricular block due to a lamin A/C gene mutation. *Eur J Heart Fail* **5**: 821-825

Frank D, Kuhn C, Brors B, Hanselmann C, Ludde M, Katus HA, Frey N (2008) Gene expression pattern in biomechanically stretched cardiomyocytes: evidence for a stretch-specific gene program. *Hypertension* **51**: 309-318

Friedl P, Wolf K, Lammerding J (2011) Nuclear mechanics during cell migration. *Curr Opin Cell Biol* **23**: 55-64

Friedrich FW, Wilding BR, Reischmann S, Crocini C, Lang P, Charron P, Muller OJ, McGrath MJ, Vollert I, Hansen A, Linke WA, Hengstenberg C, Bonne G, Morner S, Wichter T, Madeira H, Arbustini E, Eschenhagen T, Mitchell CA, Isnard R, Carrier L (2012) Evidence for FHL1 as a novel disease gene for isolated hypertrophic cardiomyopathy. *Hum Mol Genet*

Frock RL, Kudlow BA, Evans AM, Jameson SA, Hauschka SD, Kennedy BK (2006) Lamin A/C and emerin are critical for skeletal muscle satellite cell differentiation. *Genes Dev* **20**: 486-500

Fujita T, Ishikawa Y (2011) Apoptosis in heart failure. -The role of the beta-adrenergic receptor-mediated signaling pathway and p53-mediated signaling pathway in the apoptosis of cardiomyocytes. *Circ J* **75**: 1811-1818

Furukawa K, Inagaki H, 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

Gaasch WH, Zile MR (2011) Left ventricular structural remodeling in health and disease: with special emphasis on volume, mass, and geometry. *Journal of the American College of Cardiology* **58**: 1733-1740

Galindo CL, Skinner MA, Errami M, Olson LD, Watson DA, Li J, McCormick JF, McIver LJ, Kumar NM, Pham TQ, Garner HR (2009) Transcriptional profile of isoproterenol-induced cardiomyopathy and comparison to exercise-induced cardiac hypertrophy and human cardiac failure. *BMC Physiol* **9**: 23

Garg A, Speckman RA, Bowcock AM (2002) Multisystem dystrophy syndrome due to novel missense mutations in the amino-terminal head and alpha-helical rod domains of the lamin A/C gene. *Am J Med* **112**: 549-555

Garg A, Subramanyam L, Agarwal AK, Simha V, Levine B, D'Apice MR, Novelli G, Crow Y (2009) Atypical progeroid syndrome due to heterozygous missense LMNA mutations. *J Clin Endocrinol Metab* **94**: 4971-4983

Ghosh S, George S, Roy U, Ramachandran D, Kolthur-Seetharam U (2010) NAD: a master regulator of transcription. *Biochim Biophys Acta* **1799**: 681-693

Glass CA, Glass JR, Taniura H, Hasel KW, Blevitt JM, Gerace L (1993) The alpha-helical rod domain of human lamins A and C contains a chromatin binding site. *Embo J* **12**: 4413-4424

Glickman MH, Ciechanover A (2002) The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev* **82**: 373-428

Glickman MH, Rubin DM, Fried VA, Finley D (1998) The regulatory particle of the *Saccharomyces cerevisiae* proteasome. *Mol Cell Biol* **18**: 3149-3162

Gnocchi VF, Ellis JA, Zammit PS (2008) Does satellite cell dysfunction contribute to disease progression in Emery-Dreifuss muscular dystrophy? *Biochem Soc Trans* **36**: 1344-1349

Gnocchi VF, Scharner J, Huang Z, Brady K, Lee JS, White RB, Morgan JE, Sun YB, Ellis JA, Zammit PS (2011) Uncoordinated transcription and compromised muscle function in the *lmna*-null mouse model of Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *PLoS One* **6**: e16651

Goizet C, Yaou RB, Demay L, Richard P, Bouillot S, Rouanet M, Hermosilla E, Le Masson G, Lagueny A, Bonne G, Ferrer X (2004) A new mutation of the lamin A/C gene leading to autosomal dominant axonal neuropathy, muscular dystrophy, cardiac disease, and leuconychia. *J Med Genet* **41**: e29

Goldberg MW, Huttenlauch I, Hutchison CJ, Stick R (2008) Filaments made from A- and B-type lamins differ in structure and organization. *J Cell Sci* **121**: 215-225

Goldfarb LG, Park KY, Cervenakova L, Gorokhova S, Lee HS, Vasconcelos O, Nagle JW, Semino-Mora C, Sivakumar K, Dalakas MC (1998) Missense mutations in desmin associated with familial cardiac and skeletal myopathy. *Nat Genet* **19**: 402-403

Gonzalez JM, Navarro-Puche A, Casar B, Crespo P, Andres 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

Goodman JM, Liu PP, Green HJ (2005) Left ventricular adaptations following short-term endurance training. *J Appl Physiol* **98**: 454-460

- Goody MF, Kelly MW, Lessard KN, Khalil A, Henry CA (2010) Nr2b-mediated NAD⁺ production regulates cell adhesion and is required for muscle morphogenesis in vivo: Nr2b and NAD⁺ in muscle morphogenesis. *Dev Biol* **344**: 809-826
- Gotzmann J, Foisner R (2006) A-type lamin complexes and regenerative potential: a step towards understanding laminopathic diseases? *Histochem Cell Biol* **125**: 33-41
- Grady RM, Starr DA, Ackerman GL, Sanes JR, Han M (2005) Syne proteins anchor muscle nuclei at the neuromuscular junction. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 4359-4364
- Granger B, Gueneau L, Drouin-Garraud V, Pedergnana V, Gagnon F, Ben Yaou R, Tezenas du Montcel S, Bonne G (2011) Modifier locus of the skeletal muscle involvement in Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Hum Genet* **129**: 149-159
- Groll M, Kim KB, Kairies N, Huber R, Crews CM (2000) Crystal Structure of Epoxomicin:20S Proteasome Reveals a Molecular Basis for Selectivity of α -Epoxyketone Proteasome Inhibitors. *J Am Chem Soc* **122**: 1237-1238
- Gueneau L, Bertrand AT, Jais JP, Salih MA, Stojkovic T, Wehnert M, Hoeltzenbein M, Spuler S, Saitoh S, Verschueren A, Tranchant C, Beuvin M, Lacene E, Romero NB, Heath S, Zelenika D, Voit T, Eymard B, Ben Yaou R, Bonne G (2009) Mutations of the FHL1 gene cause Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *American journal of human genetics* **85**: 338-353
- Guilak F, Tedrow JR, Burgkart R (2000) Viscoelastic properties of the cell nucleus. *Biochemical and biophysical research communications* **269**: 781-786
- Hacihanefioglu A, Tarkun P, Gonullu E (2008) Acute severe cardiac failure in a myeloma patient due to proteasome inhibitor bortezomib. *International journal of hematology* **88**: 219-222
- Hackman P, Vihola A, Haravuori H, Marchand S, Sarparanta J, De Seze J, Labeit S, Witt C, Peltonen L, Richard I, Udd B (2002) Tibial muscular dystrophy is a titinopathy caused by mutations in TTN, the gene encoding the giant skeletal-muscle protein titin. *American journal of human genetics* **71**: 492-500
- Hahn C, Schwartz MA (2009) Mechanotransduction in vascular physiology and atherogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**: 53-62
- Hai T, Curran T (1991) Cross-family dimerization of transcription factors Fos/Jun and ATF/CREB alters DNA binding specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 3720-3724
- Hansen A, Eder A, Bonstrup M, Flato M, Mewe M, Schaaf S, Aksehirlioglu B, Schwoerer AP, Uebeler J, Eschenhagen T (2010) Development of a drug screening platform based on engineered heart tissue. *Circ Res* **107**: 35-44
- Hansen JB, Jorgensen C, Petersen RK, Hallenborg P, De Matteis R, Boye HA, Petrovic N, Enerback S, Nedergaard J, Cinti S, te Riele H, Kristiansen K (2004) Retinoblastoma protein functions as a molecular switch determining white versus brown adipocyte differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 4112-4117

Haque F, Lloyd DJ, Smallwood DT, Dent CL, Shanahan CM, Fry AM, Trembath RC, 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

Harpster MH, Bandyopadhyay S, Thomas DP, Ivanov PS, Keele JA, Pineguina N, Gao B, Amarendran V, Gomelsky M, McCormick RJ, Stayton MM (2006) Earliest changes in the left ventricular transcriptome postmyocardial infarction. *Mamm Genome* **17**: 701-715

Harris IS, Zhang S, Treskov I, Kovacs A, Weinheimer C, Muslin AJ (2004) Raf-1 kinase is required for cardiac hypertrophy and cardiomyocyte survival in response to pressure overload. *Circulation* **110**: 718-723

Hedhli N, Depre C (2010) Proteasome inhibitors and cardiac cell growth. *Cardiovasc Res* **85**: 321-329

Hegele RA, Cao H, Liu DM, Costain GA, Charlton-Menys V, Rodger NW, Durrington PN (2006) Sequencing of the reannotated LMNB2 gene reveals novel mutations in patients with acquired partial lipodystrophy. *American journal of human genetics* **79**: 383-389

Hein S, Arnon E, Kostin S, Schonburg M, Elsasser A, Polyakova V, Bauer EP, Klovekorn WP, Schaper J (2003) Progression from compensated hypertrophy to failure in the pressure-overloaded human heart: structural deterioration and compensatory mechanisms. *Circulation* **107**: 984-991

Hennekes H, Peter M, Weber K, Nigg EA (1993) Phosphorylation on protein kinase C sites inhibits nuclear import of lamin B2. *J Cell Biol* **120**: 1293-1304

Herman DS, Lam L, Taylor MR, Wang L, Teekakirikul P, Christodoulou D, Conner L, DePalma SR, McDonough B, Sparks E, Teodorescu DL, Cirino AL, Banner NR, Pennell DJ, Graw S, Merlo M, Di Lenarda A, Sinagra G, Bos JM, Ackerman MJ, Mitchell RN, Murry CE, Lakdawala NK, Ho CY, Barton PJ, Cook SA, Mestroni L, Seidman JG, Seidman CE (2012) Truncations of titin causing dilated cardiomyopathy. *N Engl J Med* **366**: 619-628

Hermida-Prieto M, Monserrat L, Castro-Beiras A, Laredo R, Soler R, Peteiro J, Rodriguez E, Bouzas B, Alvarez N, Muniz J, Crespo-Leiro M (2004) Familial dilated cardiomyopathy and isolated left ventricular noncompaction associated with lamin A/C gene mutations. *Am J Cardiol* **94**: 50-54

Herrera RE, Shaw PE, Nordheim A (1989) Occupation of the c-fos serum response element in vivo by a multi-protein complex is unaltered by growth factor induction. *Nature* **340**: 68-70

Herrmann H, Aebi U (1998) Intermediate filament assembly: fibrillogenesis is driven by decisive dimer-dimer interactions. *Curr Opin Struct Biol* **8**: 177-185

Herrmann H, Haner M, Brettel M, Muller SA, Goldie KN, Fedtke B, Lustig A, Franke WW, Aebi U (1996) Structure and assembly properties of the intermediate filament protein vimentin: the role of its head, rod and tail domains. *J Mol Biol* **264**: 933-953

- Herrmann H, Strelkov SV, Burkhard P, Aebi U (2009) Intermediate filaments: primary determinants of cell architecture and plasticity. *J Clin Invest* **119**: 1772-1783
- Hershberger RE, Norton N, Morales A, Li D, Siegfried JD, Gonzalez-Quintana J (2010) Coding sequence rare variants identified in MYBPC3, MYH6, TPM1, TNNC1, and TNNI3 from 312 patients with familial or idiopathic dilated cardiomyopathy. *Circ Cardiovasc Genet* **3**: 155-161
- Hershberger RE, Parks SB, Kushner JD, Li D, Ludwigsen S, Jakobs P, Nauman D, Burgess D, Partain J, Litt M (2008) Coding sequence mutations identified in MYH7, TNNT2, SCN5A, CSRP3, LBD3, and TCAP from 313 patients with familial or idiopathic dilated cardiomyopathy. *Clin Transl Sci* **1**: 21-26
- Hershberger RE, Siegfried JD (2011) Update 2011: clinical and genetic issues in familial dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* **57**: 1641-1649
- Hinrichsen R, Hansen AH, Haunso S, Busk PK (2008) Phosphorylation of pRb by cyclin D kinase is necessary for development of cardiac hypertrophy. *Cell Prolif* **41**: 813-829
- Ho PD, Fan JS, Hayes NL, Saada N, Palade PT, Glembotski CC, McDonough PM (2001) Ras reduces L-type calcium channel current in cardiac myocytes. Corrective effects of L-channels and SERCA2 on $[Ca^{2+}]_i$ regulation and cell morphology. *Circ Res* **88**: 63-69
- Hoelz A, Debler EW, Blobel G (2011) The structure of the nuclear pore complex. *Annu Rev Biochem* **80**: 613-643
- Hofmann WA, Stojiljkovic L, Fuchsova B, Vargas GM, Mavrommatis E, Philimonenko V, Kysela K, Goodrich JA, Lessard JL, Hope TJ, Hozak P, de Lanerolle P (2004) Actin is part of pre-initiation complexes and is necessary for transcription by RNA polymerase II. *Nat Cell Biol* **6**: 1094-1101
- Hoger TH, Zatloukal K, Waizenegger I, Krohne G (1990) Characterization of a second highly conserved B-type lamin present in cells previously thought to contain only a single B-type lamin. *Chromosoma* **99**: 379-390
- Holaska JM, Kowalski AK, Wilson KL (2004) Emerin caps the pointed end of actin filaments: evidence for an actin cortical network at the nuclear inner membrane. *PLoS Biol* **2**: E231
- Holaska JM, Wilson KL (2007) An emerin "proteome": purification of distinct emerin-containing complexes from HeLa cells suggests molecular basis for diverse roles including gene regulation, mRNA splicing, signaling, mechanosensing, and nuclear architecture. *Biochemistry* **46**: 8897-8908
- Hozak P, Hassan AB, Jackson DA, Cook PR (1993) Visualization of replication factories attached to nucleoskeleton. *Cell* **73**: 361-373
- Hunter JJ, Tanaka N, Rockman HA, Ross J, Jr., Chien KR (1995) Ventricular expression of a MLC-2v-ras fusion gene induces cardiac hypertrophy and selective diastolic dysfunction in transgenic mice. *J Biol Chem* **270**: 23173-23178

- Husom AD, Peters EA, Kolling EA, Fugere NA, Thompson LV, Ferrington DA (2004) Altered proteasome function and subunit composition in aged muscle. *Arch Biochem Biophys* **421**: 67-76
- Hutchison CJ, Alvarez-Reyes M, Vaughan OA (2001) Lamins in disease: why do ubiquitously expressed nuclear envelope proteins give rise to tissue-specific disease phenotypes? *J Cell Sci* **114**: 9-19
- Hwang PM, Glatt CE, Bredt DS, Yellen G, Snyder SH (1992) A novel K⁺ channel with unique localizations in mammalian brain: molecular cloning and characterization. *Neuron* **8**: 473-481
- Ivorra C, Kubicek M, Gonzalez JM, Sanz-Gonzalez SM, Alvarez-Barrientos A, O'Connor JE, Burke B, Andres V (2006) A mechanism of AP-1 suppression through interaction of c-Fos with lamin A/C. *Genes Dev* **20**: 307-320
- Jaalouk DE, Lammerding J (2009) Mechanotransduction gone awry. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**: 63-73
- Jacobs D, Glossip D, Xing H, Muslin AJ, Kornfeld K (1999) Multiple docking sites on substrate proteins form a modular system that mediates recognition by ERK MAP kinase. *Genes Dev* **13**: 163-175
- Johnson GL, Lapadat R (2002) Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science* **298**: 1911-1912
- Junttila MR, Li SP, Westermarck J (2008) Phosphatase-mediated crosstalk between MAPK signaling pathways in the regulation of cell survival. *Faseb J* **22**: 954-965
- Kalejta RF, Shenk T (2003) Proteasome-dependent, ubiquitin-independent degradation of the Rb family of tumor suppressors by the human cytomegalovirus pp71 protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 3263-3268
- Karni-Schmidt O, Zupnick A, Castillo M, Ahmed A, Matos T, Bouvet P, Cordon-Cardo C, Prives C (2008) p53 is localized to a sub-nucleolar compartment after proteasomal inhibition in an energy-dependent manner. *J Cell Sci* **121**: 4098-4105
- Kehat I, Davis J, Tiburcy M, Accornero F, Saba-El-Leil MK, Maillet M, York AJ, Lorenz JN, Zimmermann WH, Meloche S, Molkentin JD (2011) Extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 regulate the balance between eccentric and concentric cardiac growth. *Circ Res* **108**: 176-183
- Kelley JB, Datta S, Snow CJ, Chatterjee M, Ni L, Spencer A, Yang CS, Cubenas-Potts C, Matunis MJ, Paschal BM (2011) The defective nuclear lamina in Hutchinson-gilford progeria syndrome disrupts the nucleocytoplasmic Ran gradient and inhibits nuclear localization of Ubc9. *Mol Cell Biol* **31**: 3378-3395
- Kemi OJ, Ceci M, Wisloff U, Grimaldi S, Gallo P, Smith GL, Condorelli G, Ellingsen O (2008) Activation or inactivation of cardiac Akt/mTOR signaling diverges physiological from pathological hypertrophy. *J Cell Physiol* **214**: 316-321

- Kemi OJ, Loennechen JP, Wisloff U, Ellingsen O (2002) Intensity-controlled treadmill running in mice: cardiac and skeletal muscle hypertrophy. *J Appl Physiol* **93**: 1301-1309
- Kha HN, Chen BK, Clark GM, Jones R (2004) Stiffness properties for Nucleus standard straight and contour electrode arrays. *Med Eng Phys* **26**: 677-685
- Kilic F, Johnson DA, Sinensky M (1999) Subcellular localization and partial purification of prelamin A endoprotease: an enzyme which catalyzes the conversion of farnesylated prelamin A to mature lamin A. *FEBS Lett* **450**: 61-65
- Kim JB, Spiegelman BM (1996) ADD1/SREBP1 promotes adipocyte differentiation and gene expression linked to fatty acid metabolism. *Genes Dev* **10**: 1096-1107
- Kim Y, Sharov AA, McDole K, Cheng M, Hao H, Fan CM, Gaiano N, Ko MS, Zheng Y (2011) Mouse B-type lamins are required for proper organogenesis but not by embryonic stem cells. *Science* **334**: 1706-1710
- Kirisako T, Baba M, Ishihara N, Miyazawa K, Ohsumi M, Yoshimori T, Noda T, Ohsumi Y (1999) Formation process of autophagosome is traced with Apg8/Aut7p in yeast. *J Cell Biol* **147**: 435-446
- Kirmse R, Portet S, Mucke N, Aebi U, Herrmann H, Langowski J (2007) A quantitative kinetic model for the in vitro assembly of intermediate filaments from tetrameric vimentin. *J Biol Chem* **282**: 18563-18572
- Kirschner J, Brune T, Wehnert M, Denecke J, Wasner C, Feuer A, Marquardt T, Ketelsen UP, Wieacker P, Bonnemann CG, Korinthenberg R (2005) p.S143F mutation in lamin A/C: a new phenotype combining myopathy and progeria. *Ann Neurol* **57**: 148-151
- Kittleson MM, Minhas KM, Irizarry RA, Ye SQ, Edness G, Breton E, Conte JV, Tomaselli G, Garcia JG, Hare JM (2005) Gene expression analysis of ischemic and nonischemic cardiomyopathy: shared and distinct genes in the development of heart failure. *Physiol Genomics* **21**: 299-307
- Klein-Nulend J, Bacabac RG, Veldhuijzen JP, Van Loon JJ (2003) Microgravity and bone cell mechanosensitivity. *Adv Space Res* **32**: 1551-1559
- Knoll R, Postel R, Wang J, Kratzner R, Hennecke G, Vacaru AM, Vakeel P, Schubert C, Murthy K, Rana BK, Kube D, Knoll G, Schafer K, Hayashi T, Holm T, Kimura A, Schork N, Toliat MR, Nurnberg P, Schultheiss HP, Schaper W, Schaper J, Bos E, Den Hertog J, van Eeden FJ, Peters PJ, Hasenfuss G, Chien KR, Bakkers J (2007) Laminin-alpha4 and integrin-linked kinase mutations cause human cardiomyopathy via simultaneous defects in cardiomyocytes and endothelial cells. *Circulation* **116**: 515-525
- Kolb T, Maass K, Hergt M, Aebi U, Herrmann H (2011) Lamin A and lamin C form homodimers and coexist in higher complex forms both in the nucleoplasmic fraction and in the lamina of cultured human cells. *Nucleus* **2**: 425-433
- Korenjak M, Brehm A (2005) E2F-Rb complexes regulating transcription of genes important for differentiation and development. *Curr Opin Genet Dev* **15**: 520-527

Kostin S, Pool L, Elsasser A, Hein S, Drexler HC, Arnon E, Hayakawa Y, Zimmermann R, Bauer E, Klovekorn WP, Schaper J (2003) Myocytes die by multiple mechanisms in failing human hearts. *Circ Res* **92**: 715-724

Krappmann D, Wulczyn FG, Scheidereit C (1996) Different mechanisms control signal-induced degradation and basal turnover of the NF-kappaB inhibitor IkappaB alpha in vivo. *Embo J* **15**: 6716-6726

Krimm I, Ostlund C, Gilquin B, Couprie J, Hossenlopp P, Mornon JP, Bonne G, Courvalin JC, Worman HJ, Zinn-Justin S (2002) The Ig-like structure of the C-terminal domain of lamin A/C, mutated in muscular dystrophies, cardiomyopathy, and partial lipodystrophy. *Structure* **10**: 811-823

Kudlow BA, Stanfel MN, Burtner CR, Johnston ED, Kennedy BK (2008) Suppression of proliferative defects associated with processing-defective lamin A mutants by hTERT or inactivation of p53. *Mol Biol Cell* **19**: 5238-5248

Kumaran RI, Muralikrishna B, Parnaik VK (2002) Lamin A/C speckles mediate spatial organization of splicing factor compartments and RNA polymerase II transcription. *J Cell Biol* **159**: 783-793

Kumarapeli AR, Horak KM, Glasford JW, Li J, Chen Q, Liu J, Zheng H, Wang X (2005) A novel transgenic mouse model reveals deregulation of the ubiquitin-proteasome system in the heart by doxorubicin. *Faseb J* **19**: 2051-2053

Lachtermacher S, Esporcatte BL, Montalvao F, Costa PC, Rodrigues DC, Belem L, Rabischoffsky A, Faria Neto HC, Vasconcellos R, Iacobas S, Iacobas DA, Dohmann HF, Spray DC, Goldenberg RC, Campos-de-Carvalho AC (2010) Cardiac gene expression and systemic cytokine profile are complementary in a murine model of post-ischemic heart failure. *Braz J Med Biol Res* **43**: 377-389

Lam YA, Lawson TG, Velayutham M, Zweier JL, Pickart CM (2002) A proteasomal ATPase subunit recognizes the polyubiquitin degradation signal. *Nature* **416**: 763-767

Lammerding J, Fong LG, Ji JY, Reue K, Stewart CL, Young SG, Lee RT (2006) Lamins A and C but not lamin B1 regulate nuclear mechanics. *J Biol Chem* **281**: 25768-25780

Lammerding J, Hsiao J, Schulze PC, Kozlov S, Stewart CL, Lee RT (2005) Abnormal nuclear shape and impaired mechanotransduction in emerin-deficient cells. *J Cell Biol* **170**: 781-791

Lammerding J, Lee RT (2005) The nuclear membrane and mechanotransduction: impaired nuclear mechanics and mechanotransduction in lamin A/C deficient cells. *Novartis Found Symp* **264**: 264-273; discussion 273-268

Lammerding J, Schulze PC, Takahashi T, Kozlov S, Sullivan T, Kamm RD, Stewart CL, Lee RT (2004) Lamin A/C deficiency causes defective nuclear mechanics and mechanotransduction. *J Clin Invest* **113**: 370-378

Larsen MK, Nissen PH, Berge KE, Leren TP, Kristensen IB, Jensen HK, Banner J (2011) Molecular autopsy in young sudden cardiac death victims with suspected cardiomyopathy. *Forensic Sci Int*

Lee DC, Welton KL, Smith ED, Kennedy BK (2009) A-type nuclear lamins act as transcriptional repressors when targeted to promoters. *Exp Cell Res* **315**: 996-1007

Lei K, Zhang X, Ding X, Guo X, Chen M, Zhu B, Xu T, Zhuang Y, Xu R, Han M (2009) 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

Lerman I, Harrison BC, Freeman K, Hewett TE, Allen DL, Robbins J, Leinwand LA (2002) Genetic variability in forced and voluntary endurance exercise performance in seven inbred mouse strains. *J Appl Physiol* **92**: 2245-2255

Leukel M, Jost E (1995) Two conserved serines in the nuclear localization signal flanking region are involved in the nuclear targeting of human lamin A. *Eur J Cell Biol* **68**: 133-142

Li D, Parks SB, Kushner JD, Nauman D, Burgess D, Ludwigsen S, Partain J, Nixon RR, Allen CN, Irwin RP, Jakobs PM, Litt M, Hershberger RE (2006) Mutations of presenilin genes in dilated cardiomyopathy and heart failure. *American journal of human genetics* **79**: 1030-1039

Li HH, Kedar V, Zhang C, McDonough H, Arya R, Wang DZ, Patterson C (2004) Atrogin-1/muscle atrophy F-box inhibits calcineurin-dependent cardiac hypertrophy by participating in an SCF ubiquitin ligase complex. *J Clin Invest* **114**: 1058-1071

Li J, Mayne R, Wu C (1999) A novel muscle-specific beta 1 integrin binding protein (MIBP) that modulates myogenic differentiation. *J Cell Biol* **147**: 1391-1398

Li J, Powell SR, Wang X (2011a) Enhancement of proteasome function by PA28 α ; overexpression protects against oxidative stress. *Faseb J* **25**: 883-893

Li N, Timofeyev V, Tuteja D, Xu D, Lu L, Zhang Q, Zhang Z, Singapuri A, Albert TR, Rajagopal AV, Bond CT, Periasamy M, Adelman J, Chiamvimonvat N (2009) Ablation of a Ca²⁺-activated K⁺ channel (SK2 channel) results in action potential prolongation in atrial myocytes and atrial fibrillation. *J Physiol* **587**: 1087-1100

Li W, Yeo LS, Vidal C, McCorquodale T, Herrmann M, Fatkin D, Duque G (2011b) Decreased bone formation and osteopenia in lamin a/c-deficient mice. *PLoS One* **6**: e19313

Liang L, Zhang H, Gu X (2009) Homozygous LMNA mutation R527C in atypical Hutchinson-Gilford progeria syndrome: evidence for autosomal recessive inheritance. *Acta Paediatr* **98**: 1365-1368

Lin F, Worman HJ (1993) Structural organization of the human gene encoding nuclear lamin A and nuclear lamin C. *J Biol Chem* **268**: 16321-16326

- Lin F, Worman HJ (1995) Structural organization of the human gene (LMNB1) encoding nuclear lamin B1. *Genomics* **27**: 230-236
- Lindsten K, Menendez-Benito V, Masucci MG, Dantuma NP (2003) A transgenic mouse model of the ubiquitin/proteasome system. *Nat Biotechnol* **21**: 897-902
- Liu B, Wang J, Chan KM, Tjia WM, Deng W, Guan X, Huang JD, Li KM, Chau PY, Chen DJ, Pei D, Pendas AM, Cadinanos J, Lopez-Otin C, Tse HF, Hutchison C, Chen J, Cao Y, Cheah KS, Tryggvason K, Zhou Z (2005) Genomic instability in laminopathy-based premature aging. *Nat Med* **11**: 780-785
- Liu CW, Li X, Thompson D, Wooding K, Chang TL, Tang Z, Yu H, Thomas PJ, DeMartino GN (2006a) ATP binding and ATP hydrolysis play distinct roles in the function of 26S proteasome. *Mol Cell* **24**: 39-50
- Liu J, Chen Q, Huang W, Horak KM, Zheng H, Mestril R, Wang X (2006b) Impairment of the ubiquitin-proteasome system in desminopathy mouse hearts. *Faseb J* **20**: 362-364
- Liu JP (1999) Studies of the molecular mechanisms in the regulation of telomerase activity. *Faseb J* **13**: 2091-2104
- Lloyd DJ, Trembath RC, Shackleton S (2002) A novel interaction between lamin A and SREBP1: implications for partial lipodystrophy and other laminopathies. *Hum Mol Genet* **11**: 769-777
- Lombardi ML, Jaalouk DE, Shanahan CM, Burke B, Roux KJ, Lammerding J (2011) The interaction between nesprins and sun proteins at the nuclear envelope is critical for force transmission between the nucleus and cytoskeleton. *J Biol Chem* **286**: 26743-26753
- Lu H, Zong C, Wang Y, Young GW, Deng N, Souda P, Li X, Whitelegge J, Drews O, Yang PY, Ping P (2008) Revealing the dynamics of the 20 S proteasome phosphoproteome: a combined CID and electron transfer dissociation approach. *Mol Cell Proteomics* **7**: 2073-2089
- Ludwig H, Khayat D, Giaccone G, Facon T (2005) Proteasome inhibition and its clinical prospects in the treatment of hematologic and solid malignancies. *Cancer* **104**: 1794-1807
- Luxton GW, Gomes ER, Folker ES, Worman HJ, Gundersen GG (2011) TAN lines: a novel nuclear envelope structure involved in nuclear positioning. *Nucleus* **2**: 173-181
- Machado C, Andrew DJ (2000) D-Titin: a giant protein with dual roles in chromosomes and muscles. *J Cell Biol* **151**: 639-652
- Machiels BM, Zorenc AH, Endert JM, Kuijpers HJ, van Eys GJ, Ramaekers FC, Broers JL (1996) An alternative splicing product of the lamin A/C gene lacks exon 10. *J Biol Chem* **271**: 9249-9253
- Magnusson C, Svensson A, Christerson U, Tagerud S (2005) Denervation-induced alterations in gene expression in mouse skeletal muscle. *Eur J Neurosci* **21**: 577-580

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

Markiewicz E, Tilgner K, Barker N, van de Wetering M, Clevers H, Dorobek M, Hausmanowa-Petrusewicz I, Ramaekers FC, Broers JL, Blankesteyn WM, Salpingidou G, Wilson RG, Ellis JA, Hutchison CJ (2006) The inner nuclear membrane protein emerin regulates beta-catenin activity by restricting its accumulation in the nucleus. *Embo J* **25**: 3275-3285

Marmioli S, Bertacchini J, Beretti F, Cenni V, Guida M, De Pol A, Maraldi NM, Lattanzi G (2009) A-type lamins and signaling: the PI 3-kinase/Akt pathway moves forward. *J Cell Physiol* **220**: 553-561

Martin H, Flandez M, Nombela C, Molina M (2005) Protein phosphatases in MAPK signalling: we keep learning from yeast. *Mol Microbiol* **58**: 6-16

McCain ML, Parker KK (2011) Mechanotransduction: the role of mechanical stress, myocyte shape, and cytoskeletal architecture on cardiac function. *Pflugers Arch* **462**: 89-104

Meaburn KJ, Cabuy E, Bonne G, Levy N, Morris GE, Novelli G, Kill IR, Bridger JM (2007) Primary laminopathy fibroblasts display altered genome organization and apoptosis. *Aging Cell* **6**: 139-153

Mearini G, Schlossarek S, Willis MS, Carrier L (2008) The ubiquitin-proteasome system in cardiac dysfunction. *Biochim Biophys Acta* **1782**: 749-763

Meier J, Campbell KH, Ford CC, Stick R, Hutchison CJ (1991) The role of lamin LIII in nuclear assembly and DNA replication, in cell-free extracts of *Xenopus* eggs. *J Cell Sci* **98 (Pt 3)**: 271-279

Meiners S, Dreger H, Fechner M, Bieler S, Rother W, Gunther C, Baumann G, Stangl V, Stangl K (2008) Suppression of cardiomyocyte hypertrophy by inhibition of the ubiquitin-proteasome system. *Hypertension* **51**: 302-308

Mejat A, Decostre V, Li J, Renou L, Kesari A, Hantai D, Stewart CL, Xiao X, Hoffman E, Bonne G, Misteli T (2009) Lamin A/C-mediated neuromuscular junction defects in Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *J Cell Biol* **184**: 31-44

Melcon G, Kozlov S, Cutler DA, Sullivan T, Hernandez L, Zhao P, Mitchell S, Nader G, Bakay M, Rottman JN, Hoffman EP, Stewart CL (2006) Loss of emerin at the nuclear envelope disrupts the Rb1/E2F and MyoD pathways during muscle regeneration. *Hum Mol Genet* **15**: 637-651

Menezes MP, Waddell LB, Evesson FJ, Cooper S, Webster R, Jones K, Mowat D, Kiernan MC, Johnston HM, Corbett A, Harbord M, North KN, Clarke NF (2012) Importance and challenge of making an early diagnosis in LMNA-related muscular dystrophy. *Neurology*

Meng L, Mohan R, Kwok BH, Eloffson M, Sin N, Crews CM (1999) Epoxomicin, a potent and selective proteasome inhibitor, exhibits in vivo antiinflammatory activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 10403-10408

Mercuri E, Brockington M, Straub V, Quijano-Roy S, Yuva Y, Herrmann R, Brown SC, Torelli S, Dubowitz V, Blake DJ, Romero NB, Estournet B, Sewry CA, Guicheney P, Voit T, Muntoni F (2003) Phenotypic spectrum associated with mutations in the fukutin-related protein gene. *Ann Neurol* **53**: 537-542

Mercuri E, Brown SC, Nihoyannopoulos P, Poulton J, Kinali M, Richard P, Piercy RJ, Messina S, Sewry C, Burke MM, McKenna W, Bonne G, Muntoni F (2005) Extreme variability of skeletal and cardiac muscle involvement in patients with mutations in exon 11 of the lamin A/C gene. *Muscle Nerve* **31**: 602-609

Mercuri E, Poppe M, Quinlivan R, Messina S, Kinali M, Demay L, Bourke J, Richard P, Sewry C, Pike M, Bonne G, Muntoni F, Bushby K (2004) Extreme variability of phenotype in patients with an identical missense mutation in the lamin A/C gene: from congenital onset with severe phenotype to milder classic Emery-Dreifuss variant. *Arch Neurol* **61**: 690-694

Meune C, Van Berlo JH, Anselme F, Bonne G, Pinto YM, Duboc D (2006) Primary prevention of sudden death in patients with lamin A/C gene mutations. *N Engl J Med* **354**: 209-210

Mitchell S, Ota A, Foster W, Zhang B, Fang Z, Patel S, Nelson SF, Horvath S, Wang Y (2006) Distinct gene expression profiles in adult mouse heart following targeted MAP kinase activation. *Physiol Genomics* **25**: 50-59

Mohapatra B, Jimenez S, Lin JH, Bowles KR, Coveler KJ, Marx JG, Chrisco MA, Murphy RT, Lurie PR, Schwartz RJ, Elliott PM, Vatta M, McKenna W, Towbin JA, Bowles NE (2003) Mutations in the muscle LIM protein and alpha-actinin-2 genes in dilated cardiomyopathy and endocardial fibroelastosis. *Mol Genet Metab* **80**: 207-215

Moir RD, Montag-Lowy M, Goldman RD (1994) Dynamic properties of nuclear lamins: lamin B is associated with sites of DNA replication. *J Cell Biol* **125**: 1201-1212

Moiseeva O, Bourdeau V, Vernier M, Dabauvalle MC, Ferbeyre G (2011) Retinoblastoma-independent regulation of cell proliferation and senescence by the p53-p21 axis in lamin A /C-depleted cells. *Aging Cell* **10**: 789-797

Monges MS, Lubieniecki F, Quijano-Roy S, Saccoliti M, Romero NB, Richard P, Taratuto AL (2011) LMNA-related congenital muscular dystrophy : Clinical, pathological and molecular findings. *Neuromuscul Disord* **21**: 639-751

Monte M, Benetti R, Buscemi G, Sandy P, Del Sal G, Schneider C (2003) The cell cycle-regulated protein human GTSE-1 controls DNA damage-induced apoptosis by affecting p53 function. *J Biol Chem* **278**: 30356-30364

Moreira ES, Wiltshire TJ, Faulkner G, Nilforoushan A, Vainzof M, Suzuki OT, Valle G, Reeves R, Zatz M, Passos-Bueno MR, Jenne DE (2000) Limb-girdle muscular dystrophy

type 2G is caused by mutations in the gene encoding the sarcomeric protein telethonin. *Nat Genet* **24**: 163-166

Mouly V, Aamiri A, Bigot A, Cooper RN, Di Donna S, Furling D, Gidaro T, Jacquemin V, Mamchaoui K, Negroni E, Perie S, Renault V, Silva-Barbosa SD, Butler-Browne GS (2005) The mitotic clock in skeletal muscle regeneration, disease and cell mediated gene therapy. *Acta Physiol Scand* **184**: 3-15

Mounkes LC, Kozlov S, Hernandez L, Sullivan T, Stewart CL (2003) A progeroid syndrome in mice is caused by defects in A-type lamins. *Nature* **423**: 298-301

Mounkes LC, Kozlov SV, Rottman JN, Stewart CL (2005) Expression of an LMNA-N195K variant of A-type lamins results in cardiac conduction defects and death in mice. *Hum Mol Genet* **14**: 2167-2180

Muchir A, Bonne G, van der Kooi AJ, van Meegen M, Baas F, Bolhuis PA, de Visser M, Schwartz K (2000) Identification of mutations in the gene encoding lamins A/C in autosomal dominant limb girdle muscular dystrophy with atrioventricular conduction disturbances (LGMD1B). *Hum Mol Genet* **9**: 1453-1459

Muchir A, Medioni J, Laluc M, Massart C, Arimura T, van der Kooi AJ, Desguerre I, Mayer M, Ferrer X, Briault S, Hirano M, Worman HJ, Mallet A, Wehnert M, Schwartz K, Bonne G (2004) Nuclear envelope alterations in fibroblasts from patients with muscular dystrophy, cardiomyopathy, and partial lipodystrophy carrying lamin A/C gene mutations. *Muscle Nerve* **30**: 444-450

Muchir A, Pavlidis P, Bonne G, Hayashi YK, Worman HJ (2007a) Activation of MAPK in hearts of EMD null mice: similarities between mouse models of X-linked and autosomal dominant Emery Dreifuss muscular dystrophy. *Hum Mol Genet* **16**: 1884-1895

Muchir A, Pavlidis P, Decostre V, Herron AJ, Arimura T, Bonne G, Worman HJ (2007b) Activation of MAPK pathways links LMNA mutations to cardiomyopathy in Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *J Clin Invest* **117**: 1282-1293

Muchir A, Reilly SA, Wu W, Iwata S, Homma S, Bonne G, Worman HJ (2012) Treatment with selumetinib preserves cardiac function and improves survival in cardiomyopathy caused by mutation in the lamin A/C gene. *Cardiovasc Res* **93**: 311-319

Muchir A, Shan J, Bonne G, Lehnart SE, Worman HJ (2009a) Inhibition of extracellular signal-regulated kinase signaling to prevent cardiomyopathy caused by mutation in the gene encoding A-type lamins. *Hum Mol Genet* **18**: 241-247

Muchir A, van Engelen BG, Lammens M, Mislow JM, McNally E, Schwartz K, Bonne G (2003) Nuclear envelope alterations in fibroblasts from LGMD1B patients carrying nonsense Y259X heterozygous or homozygous mutation in lamin A/C gene. *Exp Cell Res* **291**: 352-362

Muchir A, Wu W, Worman HJ (2009b) Reduced expression of A-type lamins and emerin activates extracellular signal-regulated kinase in cultured cells. *Biochim Biophys Acta* **1792**: 75-81

- Mucke N, Wedig T, Burer A, Marekov LN, Steinert PM, Langowski J, Aebi U, Herrmann H (2004) Molecular and biophysical characterization of assembly-starter units of human vimentin. *J Mol Biol* **340**: 97-114
- Mukherjee D, Sen S (1990) Collagen phenotypes during development and regression of myocardial hypertrophy in spontaneously hypertensive rats. *Circ Res* **67**: 1474-1480
- Muller T, Krasnianski M, Witthaut R, Deschauer M, Zierz S (2005) Dilated cardiomyopathy may be an early sign of the C826A Fukutin-related protein mutation. *Neuromuscul Disord* **15**: 372-376
- Munoz-Marmol AM, Strasser G, Isamat M, Coulombe PA, Yang Y, Roca X, Vela E, Mate JL, Coll J, Fernandez-Figueras MT, Navas-Palacios JJ, Ariza A, Fuchs E (1998) A dysfunctional desmin mutation in a patient with severe generalized myopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 11312-11317
- Muntoni F, Cau M, Ganau A, Congiu R, Arvedi G, Mateddu A, Marrosu MG, Cianchetti C, Realdi G, Cao A, et al. (1993) Brief report: deletion of the dystrophin muscle-promoter region associated with X-linked dilated cardiomyopathy. *N Engl J Med* **329**: 921-925
- Muntoni F, Torelli S, Ferlini A (2003) Dystrophin and mutations: one gene, several proteins, multiple phenotypes. *Lancet Neurol* **2**: 731-740
- Naetar N, Foisner R (2009) Lamin complexes in the nuclear interior control progenitor cell proliferation and tissue homeostasis. *Cell Cycle* **8**: 1488-1493
- Nakamura A, Yoshida K, Takeda S, Dohi N, Ikeda S (2002) Progression of dystrophic features and activation of mitogen-activated protein kinases and calcineurin by physical exercise, in hearts of mdx mice. *FEBS Lett* **520**: 18-24
- Navarro CL, Cau P, Levy N (2006) Molecular bases of progeroid syndromes. *Hum Mol Genet* **15 Spec No 2**: R151-161
- Navarro CL, De Sandre-Giovannoli A, Bernard R, Boccaccio I, Boyer A, Genevieve D, Hadj-Rabia S, Gaudy-Marqueste C, Smitt HS, Vabres P, Faivre L, Verloes A, Van Essen T, Flori E, Hennekam R, Beemer FA, Laurent N, Le Merrer M, Cau P, Levy N (2004) Lamin A and ZMPSTE24 (FACE-1) defects cause nuclear disorganization and identify restrictive dermopathy as a lethal neonatal laminopathy. *Hum Mol Genet* **13**: 2493-2503
- Nigg EA, Kitten GT, Vorburger K (1992) Targeting lamin proteins to the nuclear envelope: the role of CaaX box modifications. *Biochem Soc Trans* **20**: 500-504
- Nigro V, de Sa Moreira E, Piluso G, Vainzof M, Belsito A, Politano L, Puca AA, Passos-Bueno MR, Zatz M (1996) Autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy, LGMD2F, is caused by a mutation in the delta-sarcoglycan gene. *Nat Genet* **14**: 195-198
- Nikolova V, Leimena C, McMahon AC, Tan JC, Chandar S, Jogia D, Kesteven SH, Michalick J, Otway R, Verheyen F, Rainer S, Stewart CL, Martin D, Feneley MP, Fatkin D (2004) Defects in nuclear structure and function promote dilated cardiomyopathy in lamin A/C-deficient mice. *J Clin Invest* **113**: 357-369

- Nikolova-Krstevski V, Leimena C, Xiao XH, Kesteven S, Tan JC, Yeo LS, Yu ZY, Zhang Q, Carlton A, Head S, Shanahan C, Feneley MP, Fatkin D (2011) Nesprin-1 and actin contribute to nuclear and cytoskeletal defects in lamin A/C-deficient cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol* **50**: 479-486
- Noda C, Tanahashi N, Shimbara N, Hendil KB, Tanaka K (2000) Tissue distribution of constitutive proteasomes, immunoproteasomes, and PA28 in rats. *Biochemical and biophysical research communications* **277**: 348-354
- Novelli G, Muchir A, Sangiuolo F, Helbling-Leclerc A, D'Apice MR, Massart C, Capon F, Sbraccia P, Federici M, Lauro R, Tudisco C, Pallotta R, Scarano G, Dallapiccola B, Merlini L, Bonne G (2002) Mandibuloacral dysplasia is caused by a mutation in LMNA-encoding lamin A/C. *American journal of human genetics* **71**: 426-431
- Novitch BG, Mulligan GJ, Jacks T, Lassar AB (1996) Skeletal muscle cells lacking the retinoblastoma protein display defects in muscle gene expression and accumulate in S and G2 phases of the cell cycle. *J Cell Biol* **135**: 441-456
- Ojaimi C, Qanud K, Hintze TH, Recchia FA (2007) Altered expression of a limited number of genes contributes to cardiac decompensation during chronic ventricular tachypacing in dogs. *Physiol Genomics* **29**: 76-83
- Olson TM, Illenberger S, Kishimoto NY, Huttelmaier S, Keating MT, Jockusch BM (2002) Metavinculin mutations alter actin interaction in dilated cardiomyopathy. *Circulation* **105**: 431-437
- Olson TM, Michels VV, Thibodeau SN, Tai YS, Keating MT (1998) Actin mutations in dilated cardiomyopathy, a heritable form of heart failure. *Science* **280**: 750-752
- Orlowski M, Wilk S (2003) Ubiquitin-independent proteolytic functions of the proteasome. *Arch Biochem Biophys* **415**: 1-5
- Owens DM, Keyse SM (2007) Differential regulation of MAP kinase signalling by dual-specificity protein phosphatases. *Oncogene* **26**: 3203-3213
- Ozaki T, Saijo M, Murakami K, Enomoto H, Taya Y, Sakiyama S (1994) Complex formation between lamin A and the retinoblastoma gene product: identification of the domain on lamin A required for its interaction. *Oncogene* **9**: 2649-2653
- Ozawa R, Hayashi YK, Ogawa M, Kurokawa R, Matsumoto H, Noguchi S, Nonaka I, Nishino I (2006) Emerin-lacking mice show minimal motor and cardiac dysfunctions with nuclear-associated vacuoles. *Am J Pathol* **168**: 907-917
- Padiath QS, Saigoh K, Schiffmann R, Asahara H, Yamada T, Koeppen A, Hogan K, Ptacek LJ, Fu YH (2006) Lamin B1 duplications cause autosomal dominant leukodystrophy. *Nat Genet* **38**: 1114-1123
- Padmakumar VC, Abraham S, Braune S, Noegel AA, Tunggal B, Karakesisoglou I, 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 VC, Libotte T, Lu W, Zaim H, Abraham S, Noegel AA, Gotzmann J, Foisner R, 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
- Pankiv S, Clausen TH, Lamark T, Brech A, Bruun JA, Outzen H, Overvatn A, Bjorkoy G, Johansen T (2007) p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. *J Biol Chem* **282**: 24131-24145
- Papadimou E, Menard C, Grey C, Puceat M (2005) Interplay between the retinoblastoma protein and LEK1 specifies stem cells toward the cardiac lineage. *Embo J* **24**: 1750-1761
- Park YE, Hayashi YK, Bonne G, Arimura T, Noguchi S, Nonaka I, Nishino I (2009) Autophagic degradation of nuclear components in mammalian cells. *Autophagy* **5**: 795-804
- Pasotti M, Klersy C, Pilotto A, Marziliano N, Rapezzi C, Serio A, Mannarino S, Gambarin F, Favalli V, Grasso M, Agozzino M, Campana C, Gavazzi A, Febo O, Marini M, Landolina M, Mortara A, Piccolo G, Vigano M, Tavazzi L, Arbustini E (2008) Long-term outcome and risk stratification in dilated cardiomyopathies. *Journal of the American College of Cardiology* **52**: 1250-1260
- Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu BE, Karandikar M, Berman K, Cobb MH (2001) Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev* **22**: 153-183
- Pegoraro E, Gavassini BF, Borsato C, Melacini P, Vianello A, Stramare R, Cenacchi G, Angelini C (2007) MYH7 gene mutation in myosin storage myopathy and scapulo-peroneal myopathy. *Neuromuscul Disord* **17**: 321-329
- Pekovic V, Gibbs-Seymour I, Markiewicz E, Alzoughaibi F, Benham AM, Edwards R, Wenhert M, von Zglinicki T, Hutchison CJ (2011) Conserved cysteine residues in the mammalian lamin A tail are essential for cellular responses to ROS generation. *Aging Cell* **10**: 1067-1079
- Pekovic V, Harborth J, Broers JL, Ramaekers FC, van Engelen B, Lammens M, von Zglinicki T, Foisner R, Hutchison C, Markiewicz E (2007) Nucleoplasmic LAP2alpha-lamin A complexes are required to maintain a proliferative state in human fibroblasts. *J Cell Biol* **176**: 163-172
- Pekovic V, Hutchison CJ (2008) Adult stem cell maintenance and tissue regeneration in the ageing context: the role for A-type lamins as intrinsic modulators of ageing in adult stem cells and their niches. *J Anat* **213**: 5-25
- Pereira ME, Wilk S (1990) Phosphorylation of the multicatalytic proteinase complex from bovine pituitaries by a copurifying cAMP-dependent protein kinase. *Arch Biochem Biophys* **283**: 68-74
- Pereira S, Bourgeois P, Navarro C, Esteves-Vieira V, Cau P, De Sandre-Giovannoli A, Levy N (2008) HGPS and related premature aging disorders: from genomic identification to the first therapeutic approaches. *Mech Ageing Dev* **129**: 449-459

Perlson E, Michaelevski I, Kowalsman N, Ben-Yaakov K, Shaked M, Seger R, Eisenstein M, Fainzilber M (2006) Vimentin binding to phosphorylated Erk sterically hinders enzymatic dephosphorylation of the kinase. *J Mol Biol* **364**: 938-944

Pestic-Dragovich L, Stojiljkovic L, Philimonenko AA, Nowak G, Ke Y, Settlege RE, Shabanowitz J, Hunt DF, Hozak P, de Lanerolle P (2000) A myosin I isoform in the nucleus. *Science* **290**: 337-341

Petretta M, Pirozzi F, Sasso L, Paglia A, Bonaduce D (2011) Review and metaanalysis of the frequency of familial dilated cardiomyopathy. *Am J Cardiol* **108**: 1171-1176

Piepoli MF, Conraads V, Corra U, Dickstein K, Francis DP, Jaarsma T, McMurray J, Pieske B, Piotrowicz E, Schmid JP, Anker SD, Solal AC, Filippatos GS, Hoes AW, Gielen S, Giannuzzi P, Ponikowski PP (2011) Exercise training in heart failure: from theory to practice. A consensus document of the Heart Failure Association and the European Association for Cardiovascular Prevention and Rehabilitation. *Eur J Heart Fail* **13**: 347-357

Plasilova M, Chattopadhyay C, Pal P, Schaub NA, Buechner SA, Mueller H, Miny P, Ghosh A, Heinemann K (2004) Homozygous missense mutation in the lamin A/C gene causes autosomal recessive Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *J Med Genet* **41**: 609-614

Porter JD, Merriam AP, Leahy P, Gong B, Feuerman J, Cheng G, Khanna S (2004) Temporal gene expression profiling of dystrophin-deficient (mdx) mouse diaphragm identifies conserved and muscle group-specific mechanisms in the pathogenesis of muscular dystrophy. *Hum Mol Genet* **13**: 257-269

Powell SR, Wang P, Katzeff H, Shringarpure R, Teoh C, Khaliulin I, Das DK, Davies KJ, Schwalb H (2005) Oxidized and ubiquitinated proteins may predict recovery of postischemic cardiac function: essential role of the proteasome. *Antioxid Redox Signal* **7**: 538-546

Puckelwartz MJ, Kessler EJ, Kim G, Dewitt MM, Zhang Y, Earley JU, Depreux FF, Holaska J, Mewborn SK, Pytel P, McNally EM (2010) Nesprin-1 mutations in human and murine cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol* **48**: 600-608

Purcell NH, Wilkins BJ, York A, Saba-El-Leil MK, Meloche S, Robbins J, Molkenin JD (2007) Genetic inhibition of cardiac ERK1/2 promotes stress-induced apoptosis and heart failure but has no effect on hypertrophy in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 14074-14079

Qi J, Chi L, Labeit S, Banes AJ (2008) Nuclear localization of the titin Z1Z2Zr domain and role in regulating cell proliferation. *Am J Physiol Cell Physiol* **295**: C975-985

Qi M, Elion EA (2005) MAP kinase pathways. *J Cell Sci* **118**: 3569-3572

Quarta G, Syrris P, Ashworth M, Jenkins S, Zuborne Alapi K, Morgan J, Muir A, Pantazis A, McKenna WJ, Elliott PM (2011) Mutations in the Lamin A/C gene mimic arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Eur Heart J*

Quijano-Roy S, Mbieleu B, Bonnemann CG, Jeannet PY, Colomer J, Clarke NF, Cuisset JM, Roper H, De Meirleir L, D'Amico A, Ben Yaou R, Nascimento A, Barois A, Demay L, Bertini E, Ferreira A, Sewry CA, Romero NB, Ryan M, Muntoni F, Guicheney P, Richard P, Bonne G, Estournet B (2008) De novo LMNA mutations cause a new form of congenital muscular dystrophy. *Ann Neurol* **64**: 177-186

Raffaele Di Barletta M, Ricci E, Galluzzi G, Tonali P, Mora M, Morandi L, Romorini A, Voit T, Orstavik KH, Merlini L, Trevisan C, Biancalana V, Housmanowa-Petrusewicz I, Bione S, Ricotti R, Schwartz K, Bonne G, Toniolo D (2000) Different mutations in the LMNA gene cause autosomal dominant and autosomal recessive Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Am J Hum Genet* **66**: 1407-1412

Raingaud J, Gupta S, Rogers JS, Dickens M, Han J, Ulevitch RJ, Davis RJ (1995) Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine. *J Biol Chem* **270**: 7420-7426

Raman M, Chen W, Cobb MH (2007) Differential regulation and properties of MAPKs. *Oncogene* **26**: 3100-3112

Razeghi P, Baskin KK, Sharma S, Young ME, Stepkowski S, Essop MF, Taegtmeier H (2006) Atrophy, hypertrophy, and hypoxemia induce transcriptional regulators of the ubiquitin proteasome system in the rat heart. *Biochemical and biophysical research communications* **342**: 361-364

Reddy KL, Zullo JM, Bertolino E, Singh H (2008) Transcriptional repression mediated by repositioning of genes to the nuclear lamina. *Nature* **452**: 243-247

Redondo-Verge L, Yaou RB, Fernandez-Recio M, Dinca L, Richard P, Bonne G (2011) Cardioembolic stroke prompting diagnosis of LMNA-associated Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Muscle Nerve* **44**: 587-589

Reichelt J (2007) Mechanotransduction of keratinocytes in culture and in the epidermis. *Eur J Cell Biol* **86**: 807-816

Reinhardt HC, Schumacher B (2012) The p53 network: cellular and systemic DNA damage responses in aging and cancer. *Trends Genet* **28**: 128-136

Remenyi A, Good MC, Bhattacharyya RP, Lim WA (2005) The role of docking interactions in mediating signaling input, output, and discrimination in the yeast MAPK network. *Mol Cell* **20**: 951-962

Reynolds JG, McCalmon SA, Donaghey JA, Naya FJ (2008) Deregulated protein kinase A signaling and myospryn expression in muscular dystrophy. *J Biol Chem* **283**: 8070-8074

Richard P, Fressart V, Charron P, Hainque B (2010) [Genetics of inherited cardiomyopathies]. *Pathol Biol (Paris)* **58**: 343-352

Richter T, von Zglinicki T (2007) A continuous correlation between oxidative stress and telomere shortening in fibroblasts. *Exp Gerontol* **42**: 1039-1042

- Rivett AJ, Bose S, Brooks P, Broadfoot KI (2001) Regulation of proteasome complexes by gamma-interferon and phosphorylation. *Biochimie* **83**: 363-366
- Rober RA, Sauter H, Weber K, 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
- Rober RA, Weber K, 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
- Rock KL, Gramm C, Rothstein L, Clark K, Stein R, Dick L, Hwang D, Goldberg AL (1994) Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. *Cell* **78**: 761-771
- Rose BA, Force T, Wang Y (2010) Mitogen-activated protein kinase signaling in the heart: angels versus demons in a heart-breaking tale. *Physiol Rev* **90**: 1507-1546
- Rosengardten Y, McKenna T, Grochova D, Eriksson M (2011) Stem cell depletion in Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Aging Cell* **10**: 1011-1020
- Ross SE, Hemati N, Longo KA, Bennett CN, Lucas PC, Erickson RL, MacDougald OA (2000) Inhibition of adipogenesis by Wnt signaling. *Science* **289**: 950-953
- Roux KJ, Crisp ML, Liu Q, Kim D, Kozlov S, Stewart CL, 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
- Ruiz S, Santos M, Segrelles C, Leis H, Jorcano JL, Berns A, Paramio JM, Vooijs M (2004) Unique and overlapping functions of pRb and p107 in the control of proliferation and differentiation in epidermis. *Development* **131**: 2737-2748
- Salinas M, Duprat F, Heurteaux C, Hugnot JP, Lazdunski M (1997) New modulatory alpha subunits for mammalian Shab K⁺ channels. *J Biol Chem* **272**: 24371-24379
- Salomons FA, Acs K, Dantuma NP (2010) Illuminating the ubiquitin/proteasome system. *Exp Cell Res* **316**: 1289-1295
- Sanbe A, Osinska H, Saffitz JE, Glabe CG, Kaye R, Maloyan A, Robbins J (2004) Desmin-related cardiomyopathy in transgenic mice: a cardiac amyloidosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 10132-10136
- Sarikas A, Carrier L, Schenke C, Doll D, Flavigny J, Lindenberg KS, Eschenhagen T, Zolk O (2005) Impairment of the ubiquitin-proteasome system by truncated cardiac myosin binding protein C mutants. *Cardiovasc Res* **66**: 33-44
- Satoh K, Nishikawa T, Yokosawa H, Sawada H (1995) Phosphorylation of proteasome substrate by a protein kinase associated with the 26 S proteasome is linked to the ATP-dependent proteolysis of the 26 S proteasome. *Biochemical and biophysical research communications* **213**: 7-14

Satoh K, Sasajima H, Nyomura KI, Yokosawa H, Sawada H (2001) Assembly of the 26S proteasome is regulated by phosphorylation of the p45/Rpt6 ATPase subunit. *Biochemistry* **40**: 314-319

Savulescu AF, Rotem A, Harel A (2011) Proteasomes crossing the nuclear border. *Nucleus* **2**

Scaffidi P, Misteli T (2008) Lamin A-dependent misregulation of adult stem cells associated with accelerated ageing. *Nat Cell Biol* **10**: 452-459

Schape J, Prausse S, Radmacher M, Stick R (2009) Influence of lamin A on the mechanical properties of amphibian oocyte nuclei measured by atomic force microscopy. *Biophys J* **96**: 4319-4325

Scheidereit C (2006) IkappaB kinase complexes: gateways to NF-kappaB activation and transcription. *Oncogene* **25**: 6685-6705

Schiaffino S, Hanzlikova V, Pierobon S (1970) Relations between structure and function in rat skeletal muscle fibers. *J Cell Biol* **47**: 107-119

Schirmer EC, Florens L, Guan T, Yates JR, 3rd, Gerace L (2003) Nuclear membrane proteins with potential disease links found by subtractive proteomics. *Science* **301**: 1380-1382

Schlossarek S, Carrier L (2011) The ubiquitin-proteasome system in cardiomyopathies. *Curr Opin Cardiol* **26**: 190-195

Schlossarek S, Englmann DR, Sultan KR, Sauer M, Eschenhagen T, Carrier L (2012) Defective proteolytic systems in Mybpc3-targeted mice with cardiac hypertrophy. *Basic Res Cardiol* **107**: 1-13

Schmalbruch H, Lewis DM (2000) Dynamics of nuclei of muscle fibers and connective tissue cells in normal and denervated rat muscles. *Muscle Nerve* **23**: 617-626

Schmidt WK, Tam A, Fujimura-Kamada K, Michaelis S (1998) Endoplasmic reticulum membrane localization of Rce1p and Ste24p, yeast proteases involved in carboxyl-terminal CAAX protein processing and amino-terminal a-factor cleavage. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 11175-11180

Schmitt JP, Kamisago M, Asahi M, Li GH, Ahmad F, Mende U, Kranias EG, MacLennan DH, Seidman JG, Seidman CE (2003) Dilated cardiomyopathy and heart failure caused by a mutation in phospholamban. *Science* **299**: 1410-1413

Schonberger J, Wang L, Shin JT, Kim SD, Depreux FF, Zhu H, Zon L, Pizard A, Kim JB, Macrae CA, Mungall AJ, Seidman JG, Seidman CE (2005) Mutation in the transcriptional coactivator EYA4 causes dilated cardiomyopathy and sensorineural hearing loss. *Nat Genet* **37**: 418-422

Schroen B, Leenders JJ, van Erk A, Bertrand AT, van Loon M, van Leeuwen RE, Kubben N, Duisters RF, Schellings MW, Janssen BJ, Debets JJ, Schwake M, Hoydal MA, Heymans S, Saftig P, Pinto YM (2007) Lysosomal integral membrane protein 2 is a novel component

of the cardiac intercalated disc and vital for load-induced cardiac myocyte hypertrophy. *J Exp Med* **204**: 1227-1235

Selcen D, Engel AG (2003) Myofibrillar myopathy caused by novel dominant negative alpha B-crystallin mutations. *Ann Neurol* **54**: 804-810

Selcen D, Engel AG (2005) Mutations in ZASP define a novel form of muscular dystrophy in humans. *Ann Neurol* **57**: 269-276

Selcen D, Muntoni F, Burton BK, Pegoraro E, Sewry C, Bite AV, Engel AG (2009) Mutation in BAG3 causes severe dominant childhood muscular dystrophy. *Ann Neurol* **65**: 83-89

Serrano M, Lin AW, McCurrach ME, Beach D, Lowe SW (1997) Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* **88**: 593-602

Shackleton S, Lloyd DJ, Jackson SN, Evans R, Niermeijer MF, Singh BM, Schmidt H, Brabant G, Kumar S, Durrington PN, Gregory S, O'Rahilly S, Trembath RC (2000) LMNA, encoding lamin A/C, is mutated in partial lipodystrophy. *Nat Genet* **24**: 153-156

Sharma S, Mucke N, Katus HA, Herrmann H, Bar H (2009) Disease mutations in the "head" domain of the extra-sarcomeric protein desmin distinctly alter its assembly and network-forming properties. *Journal of molecular medicine* **87**: 1207-1219

Sharon M, Taverner T, Ambroggio XI, Deshaies RJ, Robinson CV (2006) Structural organization of the 19S proteasome lid: insights from MS of intact complexes. *PLoS Biol* **4**: e267

Shaw PE, Saxton J (2003) Ternary complex factors: prime nuclear targets for mitogen-activated protein kinases. *Int J Biochem Cell Biol* **35**: 1210-1226

Shay JW, Pereira-Smith OM, Wright WE (1991) A role for both RB and p53 in the regulation of human cellular senescence. *Exp Cell Res* **196**: 33-39

Sheikh F, Raskin A, Chu PH, Lange S, Domenighetti AA, Zheng M, Liang X, Zhang T, Yajima T, Gu Y, Dalton ND, Mahata SK, Dorn GW, 2nd, Heller-Brown J, Peterson KL, Omens JH, McCulloch AD, Chen J (2008) An FHL1-containing complex within the cardiomyocyte sarcomere mediates hypertrophic biomechanical stress responses in mice. *J Clin Invest* **118**: 3870-3880

Shimano H (2009) SREBPs: physiology and pathophysiology of the SREBP family. *Febs J* **276**: 616-621

Shimi T, Pflieger K, Kojima S, Pack CG, Solovei I, Goldman AE, Adam SA, Shumaker DK, Kinjo M, Cremer T, Goldman RD (2008) The A- and B-type nuclear lamin networks: microdomains involved in chromatin organization and transcription. *Genes Dev* **22**: 3409-3421

Sieprath T, Darwiche R, De Vos WH (2012) Lamins as mediators of oxidative stress. *Biochemical and biophysical research communications*

Sleep E, Boue S, Jopling C, Raya M, Raya A, Izpisua Belmonte JC (2010) Transcriptomics approach to investigate zebrafish heart regeneration. *J Cardiovasc Med (Hagerstown)* **11**: 369-380

Sohns W, van Veen TA, van der Heyden MA (2010) Regulatory roles of the ubiquitin-proteasome system in cardiomyocyte apoptosis. *Curr Mol Med* **10**: 1-13

Song H, Conte JV, Jr., Foster AH, McLaughlin JS, Wei C (1999) Increased p53 protein expression in human failing myocardium. *J Heart Lung Transplant* **18**: 744-749

Songyang Z, Lu KP, Kwon YT, Tsai LH, Filhol O, Cochet C, Brickey DA, Soderling TR, Bartleson C, Graves DJ, DeMaggio AJ, Hoekstra MF, Blenis J, Hunter T, Cantley LC (1996) A structural basis for substrate specificities of protein Ser/Thr kinases: primary sequence preference of casein kinases I and II, NIMA, phosphorylase kinase, calmodulin-dependent kinase II, CDK5, and Erk1. *Mol Cell Biol* **16**: 6486-6493

Spann TP, Goldman AE, Wang C, Huang S, Goldman RD (2002) Alteration of nuclear lamin organization inhibits RNA polymerase II-dependent transcription. *J Cell Biol* **156**: 603-608

Stansfield WE, Tang RH, Moss NC, Baldwin AS, Willis MS, Selzman CH (2008) Proteasome inhibition promotes regression of left ventricular hypertrophy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **294**: H645-650

Starr DA, Fridolfsson HN (2010) Interactions between nuclei and the cytoskeleton are mediated by SUN-KASH nuclear-envelope bridges. *Annu Rev Cell Dev Biol* **26**: 421-444

Stewart C, 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-Hutchinson PJ, Hale CM, Wirtz D, Hodzic D (2008) Structural requirements for the assembly of LINC complexes and their function in cellular mechanical stiffness. *Exp Cell Res* **314**: 1892-1905

Sullivan T, Escalante-Alcalde D, Bhatt H, Anver M, Bhat N, Nagashima K, Stewart CL, Burke B (1999) Loss of A-type lamin expression compromises nuclear envelope integrity leading to muscular dystrophy. *J Cell Biol* **147**: 913-920

Summers KM, Bokil NJ, Lu FT, Low JT, Baisden JM, Duffy D, Radford DJ (2010) Mutations at KCNQ1 and an unknown locus cause long QT syndrome in a large Australian family: implications for genetic testing. *Am J Med Genet A* **152A**: 613-621

Sundaresan NR, Gupta M, Kim G, Rajamohan SB, Isbatan A, Gupta MP (2009) Sirt3 blocks the cardiac hypertrophic response by augmenting Foxo3a-dependent antioxidant defense mechanisms in mice. *J Clin Invest* **119**: 2758-2771

Sussman MA, Anversa P (2004) Myocardial aging and senescence: where have the stem cells gone? *Annu Rev Physiol* **66**: 29-48

Taber LA, Yang M, Podszus WW (1996) Mechanics of ventricular torsion. *J Biomech* **29**: 745-752

- Tanaka K (2009) The proteasome: overview of structure and functions. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* **85**: 12-36
- Tang M, Li J, Huang W, Su H, Liang Q, Tian Z, Horak KM, Molkenin JD, Wang X (2010) Proteasome functional insufficiency activates the calcineurin-NFAT pathway in cardiomyocytes and promotes maladaptive remodelling of stressed mouse hearts. *Cardiovasc Res* **88**: 424-433
- Tanida I (2011) Autophagosome formation and molecular mechanism of autophagy. *Antioxid Redox Signal* **14**: 2201-2214
- Taniura H, Glass C, Gerace L (1995) A chromatin binding site in the tail domain of nuclear lamins that interacts with core histones. *J Cell Biol* **131**: 33-44
- Taylor MR, Carniel E, Mestroni L (2006) Cardiomyopathy, familial dilated. *Orphanet J Rare Dis* **1**: 27
- Taylor MR, Fain PR, Sinagra G, Robinson ML, Robertson AD, Carniel E, Di Lenarda A, Bohlmeier TJ, Ferguson DA, Brodsky GL, Boucek MM, Lascor J, Moss AC, Li WL, Stetler GL, Muntoni F, Bristow MR, Mestroni L (2003) Natural history of dilated cardiomyopathy due to lamin A/C gene mutations. *J Am Coll Cardiol* **41**: 771-780
- Taylor MR, Slavov D, Gajewski A, Vlcek S, Ku L, Fain PR, Carniel E, Di Lenarda A, Sinagra G, Boucek MM, Cavanaugh J, Graw SL, Ruegg P, Feiger J, Zhu X, Ferguson DA, Bristow MR, Gotzmann J, Foisner R, Mestroni L (2005) Thymopoietin (lamina-associated polypeptide 2) gene mutation associated with dilated cardiomyopathy. *Hum Mutat* **26**: 566-574
- Tazir M, Azzedine H, Assami S, Sindou P, Nouioua S, Zemmouri R, Hamadouche T, Chaouch M, Feingold J, Vallat JM, Leguern E, Grid D (2004) Phenotypic variability in autosomal recessive axonal Charcot-Marie-Tooth disease due to the R298C mutation in lamin A/C. *Brain* **127**: 154-163
- Tenhunen O, Rysa J, Ilves M, Soini Y, Ruskoaho H, Leskinen H (2006) Identification of cell cycle regulatory and inflammatory genes as predominant targets of p38 mitogen-activated protein kinase in the heart. *Circ Res* **99**: 485-493
- Teos LY, Zhao A, Alvin Z, Laurence GG, Li C, Haddad GE (2008) Basal and IGF-I-dependent regulation of potassium channels by MAP kinases and PI3-kinase during eccentric cardiac hypertrophy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **295**: H1834-1845
- Tesson F, Sylvius N, Pilotto A, Dubosq-Bidot L, Peuchmaurd M, Bouchier C, Benaiche A, Mangin L, Charron P, Gavazzi A, Tavazzi L, Arbustini E, Komajda M (2000) Epidemiology of desmin and cardiac actin gene mutations in a european population of dilated cardiomyopathy. *European heart journal* **21**: 1872-1876
- Thiery E, Gosset P, Damotte D, Delezoide AL, de Saint-Sauveur N, Vayssettes C, Creau N (2000) Developmentally regulated expression of the murine ortholog of the potassium channel KIR4.2 (KCNJ15). *Mech Dev* **95**: 313-316

Thomas DM, Carty SA, Piscopo DM, Lee JS, Wang WF, Forrester WC, Hinds PW (2001) The retinoblastoma protein acts as a transcriptional coactivator required for osteogenic differentiation. *Mol Cell* **8**: 303-316

Torella D, Rota M, Nurzynska D, Musso E, Monsen A, Shiraishi I, Zias E, Walsh K, Rosenzweig A, Sussman MA, Urbanek K, Nadal-Ginard B, Kajstura J, Anversa P, Leri A (2004) Cardiac stem cell and myocyte aging, heart failure, and insulin-like growth factor-1 overexpression. *Circ Res* **94**: 514-524

Torrent-Guasp F, Buckberg GD, Clemente C, Cox JL, Coghlan HC, Gharib M (2001) The structure and function of the helical heart and its buttress wrapping. I. The normal macroscopic structure of the heart. *Semin Thorac Cardiovasc Surg* **13**: 301-319

Towbin JA, Hejtmancik JF, Brink P, Gelb B, Zhu XM, Chamberlain JS, McCabe ER, Swift M (1993) X-linked dilated cardiomyopathy. Molecular genetic evidence of linkage to the Duchenne muscular dystrophy (dystrophin) gene at the Xp21 locus. *Circulation* **87**: 1854-1865

Tsukamoto O, Minamino T, Okada K, Shintani Y, Takashima S, Kato H, Liao Y, Okazaki H, Asai M, Hirata A, Fujita M, Asano Y, Yamazaki S, Asanuma H, Hori M, Kitakaze M (2006) Depression of proteasome activities during the progression of cardiac dysfunction in pressure-overloaded heart of mice. *Biochemical and biophysical research communications* **340**: 1125-1133

Ueyama T, Kawashima S, Sakoda T, Rikitake Y, Ishida T, Kawai M, Yamashita T, Ishido S, Hotta H, Yokoyama M (2000) Requirement of activation of the extracellular signal-regulated kinase cascade in myocardial cell hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol* **32**: 947-960

Utrera R, Collavin L, Lazarevic D, Delia D, Schneider C (1998) A novel p53-inducible gene coding for a microtubule-localized protein with G2-phase-specific expression. *Embo J* **17**: 5015-5025

van Berlo JH, de Voogt WG, van der Kooi AJ, van Tintelen JP, Bonne G, Yaou RB, Duboc D, Rossenbacker T, Heidbuchel H, de Visser M, Crijns HJ, Pinto YM (2005a) Meta-analysis of clinical characteristics of 299 carriers of LMNA gene mutations: do lamin A/C mutations portend a high risk of sudden death? *J Mol Med (Berl)* **83**: 79-83

Van Berlo JH, Voncken JW, Kubben N, Broers JL, Duisters R, van Leeuwen RE, Crijns HJ, Ramaekers FC, Hutchison CJ, Pinto YM (2005b) A-type lamins are essential for TGF-beta1 induced PP2A to dephosphorylate transcription factors. *Hum Mol Genet* **14**: 2839-2849

Van den Eynde BJ, Morel S (2001) Differential processing of class-I-restricted epitopes by the standard proteasome and the immunoproteasome. *Curr Opin Immunol* **13**: 147-153

van der Kooi AJ, Bonne G, Eymard B, Duboc D, Talim B, Van der Valk M, Reiss P, Richard P, Demay L, Merlini L, Schwartz K, Busch HF, de Visser M (2002) Lamin A/C mutations with lipodystrophy, cardiac abnormalities, and muscular dystrophy. *Neurology* **59**: 620-623

van Engelen BG, Muchir A, Hutchison CJ, van der Kooi AJ, Bonne G, Lammens M (2005) The lethal phenotype of a homozygous nonsense mutation in the lamin A/C gene. *Neurology* **64**: 374-376

van Rijsingen IA, Arbustini E, Elliott PM, Mogensen J, Hermans-van Ast JF, van der Kooi AJ, van Tintelen JP, van den Berg MP, Pilotto A, Pasotti M, Jenkins S, Rowland C, Aslam U, Wilde AA, Perrot A, Pankuweit S, Zwinderman AH, Charron P, Pinto YM (2012) Risk factors for malignant ventricular arrhythmias in lamin a/c mutation carriers a European cohort study. *J Am Coll Cardiol* **59**: 493-500

Varela I, Cadinanos J, Pendas AM, Gutierrez-Fernandez A, Folgueras AR, Sanchez LM, Zhou Z, Rodriguez FJ, Stewart CL, Vega JA, Tryggvason K, Freije JM, Lopez-Otin C (2005) Accelerated ageing in mice deficient in Zmpste24 protease is linked to p53 signalling activation. *Nature* **437**: 564-568

Vaziri A, Mofrad MR (2007) Mechanics and deformation of the nucleus in micropipette aspiration experiment. *J Biomech* **40**: 2053-2062

Vergnes L, Peterfy M, Bergo MO, Young SG, Reue K (2004) Lamin B1 is required for mouse development and nuclear integrity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 10428-10433

Verma R, Deshaies RJ (2000) A proteasome howdunit: the case of the missing signal. *Cell* **101**: 341-344

Vernace VA, Arnaud L, Schmidt-Glenewinkel T, Figueiredo-Pereira ME (2007a) Aging perturbs 26S proteasome assembly in *Drosophila melanogaster*. *Faseb J* **21**: 2672-2682

Vernace VA, Schmidt-Glenewinkel T, Figueiredo-Pereira ME (2007b) Aging and regulated protein degradation: who has the UPPer hand? *Aging Cell* **6**: 599-606

Verstraeten VL, Broers JL, Ramaekers FC, van Steensel MA (2007) The nuclear envelope, a key structure in cellular integrity and gene expression. *Curr Med Chem* **14**: 1231-1248

Verstraeten VL, Broers JL, van Steensel MA, Zinn-Justin S, Ramaekers FC, Steijlen PM, Kamps M, Kuijpers HJ, Merckx D, Smeets HJ, Hennekam RC, Marcelis CL, van den Wijngaard A (2006) Compound heterozygosity for mutations in LMNA causes a progeria syndrome without prelamin A accumulation. *Hum Mol Genet* **15**: 2509-2522

Verstraeten VL, Caputo S, van Steensel MA, Duband-Goulet I, Zinn-Justin S, Kamps M, Kuijpers HJ, Ostlund C, Worman HJ, Briede JJ, Le Dour C, Marcelis CL, van Geel M, Steijlen PM, van den Wijngaard A, Ramaekers FC, Broers JL (2009) The R439C mutation in LMNA causes lamin oligomerization and susceptibility to oxidative stress. *J Cell Mol Med* **13**: 959-971

Verstraeten VL, Ji JY, Cummings KS, Lee RT, Lammerding J (2008) Increased mechanosensitivity and nuclear stiffness in Hutchinson-Gilford progeria cells: effects of farnesyltransferase inhibitors. *Aging Cell* **7**: 383-393

Verstraeten VL, Renes J, Ramaekers FC, Kamps M, Kuijpers HJ, Verheyen F, Wabitsch M, Steijlen PM, van Steensel MA, Broers JL (2011) Reorganization of the nuclear lamina and cytoskeleton in adipogenesis. *Histochem Cell Biol* **135**: 251-261

Vicart P, Caron A, Guicheney P, Li Z, Prevost MC, Faure A, Chateau D, Chapon F, Tome F, Dupret JM, Paulin D, Fardeau M (1998) A missense mutation in the alphaB-crystallin chaperone gene causes a desmin-related myopathy. *Nat Genet* **20**: 92-95

Vignier N, Schlossarek S, Fraysse B, Mearini G, Kramer E, Pointu H, Mougnot N, Guiard J, Reimer R, Hohenberg H, Schwartz K, Vernet M, Eschenhagen T, Carrier L (2009) Nonsense-mediated mRNA decay and ubiquitin-proteasome system regulate cardiac myosin-binding protein C mutant levels in cardiomyopathic mice. *Circ Res* **105**: 239-248

Villard E, Duboscq-Bidot L, Charron P, Benaiche A, Conraads V, Sylvius N, Komajda M (2005) Mutation screening in dilated cardiomyopathy: prominent role of the beta myosin heavy chain gene. *European heart journal* **26**: 794-803

Villard E, Perret C, Gary F, Proust C, Dilanian G, Hengstenberg C, Ruppert V, Arbustini E, Wichter T, Germain M, Dubourg O, Tavazzi L, Aumont MC, DeGroot P, Fauchier L, Trochu JN, Gibelin P, Aupetit JF, Stark K, Erdmann J, Hetzer R, Roberts AM, Barton PJ, Regitz-Zagrosek V, Aslam U, Duboscq-Bidot L, Meyborg M, Maisch B, Madeira H, Waldenstrom A, Galve E, Cleland JG, Dorent R, Roizes G, Zeller T, Blankenberg S, Goodall AH, Cook S, Tregouet DA, Tiret L, Isnard R, Komajda M, Charron P, Cambien F (2011) A genome-wide association study identifies two loci associated with heart failure due to dilated cardiomyopathy. *European heart journal* **32**: 1065-1076

Viteri G, Chung YW, Stadtman ER (2010) Effect of progerin on the accumulation of oxidized proteins in fibroblasts from Hutchinson Gilford progeria patients. *Mech Ageing Dev* **131**: 2-8

Vlcek S, Foisner R (2007a) Lamins and lamin-associated proteins in aging and disease. *Curr Opin Cell Biol* **19**: 298-304

Vlcek S, Foisner R (2007b) A-type lamin networks in light of laminopathic diseases. *Biochim Biophys Acta* **1773**: 661-674

Voortman J, Giaccone G (2006) Severe reversible cardiac failure after bortezomib treatment combined with chemotherapy in a non-small cell lung cancer patient: a case report. *BMC Cancer* **6**: 129

Vytopil M, Ricci E, Dello Russo A, Hanisch F, Neudecker S, Zierz S, Ricotti R, Demay L, Richard P, Wehnert M, Bonne G, Merlini L, Toniolo D (2002) Frequent low penetrance mutations in the Lamin A/C gene, causing Emery Dreifuss muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord* **12**: 958-963

Walsh K (1997) Coordinate regulation of cell cycle and apoptosis during myogenesis. *Prog Cell Cycle Res* **3**: 53-58

Wang CY, Yang P, Shi JD, Purohit S, Guo D, An H, Gu JG, Ling J, Dong Z, She JX (2004) Molecular cloning and characterization of the mouse Acdp gene family. *BMC Genomics* **5**: 7

Wang J, Maldonado MA (2006) The ubiquitin-proteasome system and its role in inflammatory and autoimmune diseases. *Cell Mol Immunol* **3**: 255-261

- Wang N, Tytell JD, Ingber DE (2009) Mechanotransduction at a distance: mechanically coupling the extracellular matrix with the nucleus. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**: 75-82
- Wang T, Baron M, Trump D (2008a) An overview of Notch3 function in vascular smooth muscle cells. *Prog Biophys Mol Biol* **96**: 499-509
- Wang X, Osinska H, Dorn GW, 2nd, Nieman M, Lorenz JN, Gerdes AM, Witt S, Kimball T, Gulick J, Robbins J (2001) Mouse model of desmin-related cardiomyopathy. *Circulation* **103**: 2402-2407
- Wang X, Su H, Ranek MJ (2008b) Protein quality control and degradation in cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* **45**: 11-27
- Wang Y, Herron AJ, Worman HJ (2006) Pathology and nuclear abnormalities in hearts of transgenic mice expressing M371K lamin A encoded by an LMNA mutation causing Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Hum Mol Genet* **15**: 2479-2489
- Watkins H, Ashrafian H, Redwood C (2011) Inherited cardiomyopathies. *N Engl J Med* **364**: 1643-1656
- Watkins SC, Samuel JL, Marotte F, Bertier-Savalle B, Rappaport L (1987) Microtubules and desmin filaments during onset of heart hypertrophy in rat: a double immunoelectron microscope study. *Circ Res* **60**: 327-336
- Weekes J, Morrison K, Mullen A, Wait R, Barton P, Dunn MJ (2003) Hyperubiquitination of proteins in dilated cardiomyopathy. *Proteomics* **3**: 208-216
- Welchman RL, Gordon C, Mayer RJ (2005) Ubiquitin and ubiquitin-like proteins as multifunctional signals. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**: 599-609
- Whyte JJ, Laughlin MH (2010) The effects of acute and chronic exercise on the vasculature. *Acta Physiol (Oxf)* **199**: 441-450
- Widmann C, Gibson S, Jarpe MB, Johnson GL (1999) Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol Rev* **79**: 143-180
- Wiesel N, Mattout A, Melcer S, Melamed-Book N, Herrmann H, Medalia O, Aebi U, Gruenbaum Y (2008) Laminopathic mutations interfere with the assembly, localization, and dynamics of nuclear lamins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 180-185
- Wilhelmsen K, Litjens SH, Kuikman I, Tshimbalanga N, Janssen H, van den Bout I, Raymond K, Sonnenberg A (2005) Nesprin-3, a novel outer nuclear membrane protein, associates with the cytoskeletal linker protein plectin. *J Cell Biol* **171**: 799-810
- Wolf CM, Wang L, Alcalai R, Pizard A, Burgon PG, Ahmad F, Sherwood M, Branco DM, Wakimoto H, Fishman GI, See V, Stewart CL, Conner DA, Berul CI, Seidman CE, Seidman JG (2008) Lamin A/C haploinsufficiency causes dilated cardiomyopathy and apoptosis-triggered cardiac conduction system disease. *J Mol Cell Cardiol* **44**: 293-303

Woodiwiss AJ, Norton GR (1995) Exercise-induced cardiac hypertrophy is associated with an increased myocardial compliance. *J Appl Physiol* **78**: 1303-1311

Worman HJ, Bonne G (2007) "Laminopathies": a wide spectrum of human diseases. *Exp Cell Res* **313**: 2121-2133

Wu W, Muchir A, Shan J, Bonne G, Worman HJ (2011) Mitogen-activated protein kinase inhibitors improve heart function and prevent fibrosis in cardiomyopathy caused by mutation in lamin A/C gene. *Circulation* **123**: 53-61

Wu W, Shan J, Bonne G, Worman HJ, Muchir A (2010) Pharmacological inhibition of c-Jun N-terminal kinase signaling prevents cardiomyopathy caused by mutation in LMNA gene. *Biochim Biophys Acta* **1802**: 632-638

Yamaguchi O, Watanabe T, Nishida K, Kashiwase K, Higuchi Y, Takeda T, Hikoso S, Hirotsu S, Asahi M, Taniike M, Nakai A, Tsujimoto I, Matsumura Y, Miyazaki J, Chien KR, Matsuzawa A, Sadamitsu C, Ichijo H, Baccarini M, Horii M, Otsu K (2004) Cardiac-specific disruption of the c-raf-1 gene induces cardiac dysfunction and apoptosis. *J Clin Invest* **114**: 937-943

Yamamoto Y, Hoshino Y, Ito T, Nariai T, Mohri T, Obana M, Hayata N, Uozumi Y, Maeda M, Fujio Y, Azuma J (2008) Atrogin-1 ubiquitin ligase is upregulated by doxorubicin via p38-MAP kinase in cardiac myocytes. *Cardiovasc Res* **79**: 89-96

Yang SH, Bergo MO, Toth JI, Qiao X, Hu Y, Sandoval S, Meta M, Bendale P, Gelb MH, Young SG, Fong LG (2005) Blocking protein farnesyltransferase improves nuclear blebbing in mouse fibroblasts with a targeted Hutchinson-Gilford progeria syndrome mutation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 10291-10296

Yoon S, Seger R (2006) The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions. *Growth Factors* **24**: 21-44

Young J, Morbois-Trabut L, Couzinet B, Lascols O, Dion E, Bereziat V, Fève B, Richard I, Capeau J, Chanson P, Vigouroux C (2005) Type A insulin resistance syndrome revealing a novel lamin A mutation. *Diabetes* **54**: 1873-1878

Yu T, Deng C, Wu R, Guo H, Zheng S, Yu X, Shan Z, Kuang S, Lin Q (2012) Decreased expression of small-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels SK1 and SK2 in human chronic atrial fibrillation. *Life Sci* **90**: 219-227

Zammit PS, Partridge TA, Yablonka-Reuveni Z (2006) The skeletal muscle satellite cell: the stem cell that came in from the cold. *J Histochem Cytochem* **54**: 1177-1191

Zastrow MS, Flaherty DB, Benian GM, Wilson KL (2006) Nuclear titin interacts with A- and B-type lamins in vitro and in vivo. *J Cell Sci* **119**: 239-249

Zastrow MS, Vlcek S, Wilson KL (2004) Proteins that bind A-type lamins: integrating isolated clues. *J Cell Sci* **117**: 979-987

Zhang F, Hu Y, Huang P, Toleman CA, Paterson AJ, Kudlow JE (2007a) Proteasome function is regulated by cyclic AMP-dependent protein kinase through phosphorylation of Rpt6. *J Biol Chem* **282**: 22460-22471

Zhang FL, Casey PJ (1996) Protein prenylation: molecular mechanisms and functional consequences. *Annu Rev Biochem* **65**: 241-269

Zhang Q, Bethmann C, Worth NF, Davies JD, Wasner C, Feuer A, Ragnauth CD, Yi Q, Mellad JA, Warren DT, Wheeler MA, Ellis JA, Skepper JN, Vorgerd M, Schlotter-Weigel B, Weissberg PL, Roberts RG, Wehnert M, Shanahan CM (2007b) Nesprin-1 and -2 are involved in the pathogenesis of Emery Dreifuss muscular dystrophy and are critical for nuclear envelope integrity. *Hum Mol Genet* **16**: 2816-2833

Zhang X, Xu R, Zhu B, Yang X, Ding X, Duan S, Xu T, Zhuang Y, Han M (2007c) Syne-1 and Syne-2 play crucial roles in myonuclear anchorage and motor neuron innervation. *Development* **134**: 901-908

Zhao K, Harel A, Stuurman N, Guedalia D, Gruenbaum Y (1996) Binding of matrix attachment regions to nuclear lamin is mediated by the rod domain and depends on the lamin polymerization state. *FEBS Lett* **380**: 161-164

Zhen YY, Libotte T, Munck M, Noegel AA, Korenbaum E (2002) NUANCE, a giant protein connecting the nucleus and actin cytoskeleton. *J Cell Sci* **115**: 3207-3222

Zheng M, Dilly K, Dos Santos Cruz J, Li M, Gu Y, Ursitti JA, Chen J, Ross J, Jr., Chien KR, Lederer JW, Wang Y (2004) Sarcoplasmic reticulum calcium defect in Ras-induced hypertrophic cardiomyopathy heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **286**: H424-433

Zhong N, Radu G, Ju W, Brown WT (2005) Novel progerin-interactive partner proteins hnRNP E1, EGF, Mel 18, and UBC9 interact with lamin A/C. *Biochemical and biophysical research communications* **338**: 855-861

Zhou B, Ma Q, Kong SW, Hu Y, Campbell PH, McGowan FX, Ackerman KG, Wu B, Tevosian SG, Pu WT (2009) Fog2 is critical for cardiac function and maintenance of coronary vasculature in the adult mouse heart. *J Clin Invest* **119**: 1462-1476

Zhu X, Zeng X, Huang B, Hao S (2004) Actin is closely associated with RNA polymerase II and involved in activation of gene transcription. *Biochemical and biophysical research communications* **321**: 623-630

Ziebold U, Reza T, Caron A, Lees JA (2001) E2F3 contributes both to the inappropriate proliferation and to the apoptosis arising in Rb mutant embryos. *Genes Dev* **15**: 386-391

Zong C, Gomes AV, Drews O, Li X, Young GW, Berhane B, Qiao X, French SW, Bardag-Gorce F, Ping P (2006) Regulation of murine cardiac 20S proteasomes: role of associating partners. *Circ Res* **99**: 372-380

Zong C, Young GW, Wang Y, Lu H, Deng N, Drews O, Ping P (2008) Two-dimensional electrophoresis-based characterization of post-translational modifications of mammalian 20S proteasome complexes. *Proteomics* **8**: 5025-5037

ANNEXES

DelK32-lamin A/C has abnormal location and induces incomplete tissue maturation and severe metabolic defects leading to premature death

Anne T. Bertrand^{1,2}, Laure Renou^{1,2}, Aurélie Papadopoulos^{1,2}, Maud Beuvin^{1,2},
Emmanuelle Lacène^{1,2}, Catherine Massart^{1,2}, Chris Ottolenghi³, Valérie Decostre^{1,2},
Sophia Maron⁴, Saskia Schlossarek⁴, Marie-Elodie Cattin^{1,2}, Lucie Carrier^{1,2,4},
Marie Malissen^{5,6,7}, Takuro Arimura^{1,2,†} and Gisèle Bonne^{1,2,8,*}

¹Inserm, UMRS_974, Paris F-75013, France, ²Université Pierre et Marie Curie- Paris 6, UM 76, CNRS, UMR 7215, Institut de Myologie, IFR14, Paris F-75013, France, ³AP-HP, Hôpital Necker Enfants Malades, Service Biochimie Métabolique, Paris F-75015, France, ⁴Department of Experimental Pharmacology and Toxicology, Cardiovascular Research Center, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany, ⁵Centre d'Immunologie de Marseille-Luminy, Université de la Méditerranée UM 631, Campus de Luminy case 906, Marseille F-13288, France, ⁶INSERM UMR-S 631, Marseille F-13288, France, ⁷CNRS, UMR6102, Marseille F-13288, France and ⁸AP-HP, Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière, U.F. Cardiogénétique et Myogénétique, Service de Biochimie Métabolique, Paris F-75013, France

Received July 28, 2011; Revised October 29, 2011; Accepted November 13, 2011

The *LMNA* gene encodes lamin A/C intermediate filaments that polymerize beneath the nuclear membrane, and are also found in the nucleoplasm in an uncharacterized assembly state. They are thought to have structural functions and regulatory roles in signaling pathways via interaction with transcription factors. Mutations in *LMNA* have been involved in numerous inherited human diseases, including severe congenital muscular dystrophy (L-CMD). We created the *Lmna*^{ΔK32} knock-in mouse harboring a L-CMD mutation. *Lmna*^{ΔK32/ΔK32} mice exhibited striated muscle maturation delay and metabolic defects, including reduced adipose tissue and hypoglycemia leading to premature death. The level of mutant proteins was markedly lower in *Lmna*^{ΔK32/ΔK32}, and while wild-type lamin A/C proteins were progressively relocated from nucleoplasmic foci to the nuclear rim during embryonic development, mutant proteins were maintained in nucleoplasmic foci. In the liver and during adipocyte differentiation, expression of ΔK32-lamin A/C altered sterol regulatory element binding protein 1 (SREBP-1) transcriptional activities. Taken together, our results suggest that lamin A/C relocation at the nuclear lamina seems important for tissue maturation potentially by releasing its inhibitory function on transcriptional factors, including but not restricted to SREBP-1. And importantly, L-CMD patients should be investigated for putative metabolic disorders.

INTRODUCTION

A- and B-type lamins are the major constituents of the nuclear lamina, a meshwork of proteins underlying the inner nuclear membrane (1). B-type lamins comprising lamins B1 and B2

are encoded by the *LMNB1* and *LMNB2* genes, respectively, while A-type lamins mainly comprising lamin A and lamin C are encoded by the *LMNA* gene. Lamin A is synthesized in an immature form, the prelamin A, which undergoes several post-translational modifications to produce the

*To whom correspondence should be addressed to: Thérapie des maladies du muscle strié/Inserm U974, UPMC UM76, CNRS UMR7215, Institut de Myologie, G.H. Pitié-Salpêtrière, 47 boulevard de l'Hôpital, F-75 651 Paris Cedex 13, France. Tel: +33 142165723; Fax: +33 142165700; Email: g.bonne@institut-myologie.org

†Present address: Department of Molecular Pathogenesis, Medical Research Institute, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan.

mature lamin A. Lamins A and C (henceforth referred to as lamin A/C) dimerize and further assemble to form head-to-tail polar polymers which finally associate laterally and eventually form lamin filaments that, together with lamin B filaments, constitute the nuclear lamina (2). Lamin A/C is also found in the nucleoplasm in a still unknown assembly state and may have multiple functions by associating with chromatin, nuclear histones and various transcription factors (1).

Recent interest in *LMNA* has centered on the finding that mutations in this gene give rise to more than 10 distinct genetic diseases, commonly named laminopathies. The first *LMNA* mutation was identified in autosomal dominant Emery–Dreifuss muscular dystrophy (EDMD) (3). Since then, mutations in *LMNA* have been shown to be associated to disorders with a systemic involvement (and referred to as premature ageing syndromes) or affecting tissues in a specific manner [disorders affecting the adipose tissue like familial partial lipodystrophy (FPLD), the nerve or the striated muscles] (1,4). Among laminopathies affecting striated muscles, we recently described the *LMNA*-related congenital muscular dystrophy (L-CMD), which represents the most severe form of muscular involvement among laminopathies with uncertain heart involvement to date (5).

While the correlation between accumulation of prelamin A and premature ageing syndromes or lipodystrophies are clear (6,7), the relationship between *LMNA* mutations and other laminopathies is far from being understood, particularly in laminopathies affecting striated muscles. To date, two hypotheses have been proposed that are not mutually exclusive (reviewed in 1,4). (i) The structural hypothesis is based on the role of lamins and associated proteins such as the linker of nucleoskeleton and cytoskeleton (LINC) complex proteins Nesprins and SUN, in maintaining the mechanical integrity of cells by linking the nucleoskeleton to the cytoskeleton (8). A ‘weakened’ lamina would lead to overall loss of the cell’s ability to withstand stress-induced damage, which may be of critical significance in contractile tissues such as skeletal and cardiac muscles (9). (ii) The gene expression hypothesis is based on the role of lamins in transcription and cell signaling via their interactions with chromatin, histone or TATA-binding protein (TBP) (10,11) and with transcription factors such as retinoblastoma (Rb) or sterol regulatory element binding protein 1 (SREBP-1) (12,13).

In the present paper, we reproduce in mice by homologous recombination a *LMNA* mutation identified in patients with severe EDMD or L-CMD (5,14). The *LMNA* p.delK32 mutation corresponds to the deletion of the lysine in position 32, in the N-terminal domain of lamin A/C involved in the lateral assembly of head to tail polymers of lamin A/C (15,16). Whereas wild-type (WT) lamin A/C was able to relocate from the nucleoplasm to the nuclear periphery during embryonic development, Δ K32-lamin A/C mutant proteins were unable to assemble at the nuclear lamina and remained in nucleoplasmic foci in *Lmna* ^{Δ K32/ Δ K32} mouse tissues. In addition, despite low steady-state levels of mutant lamins, toxic effects on mouse physiology were observed: *Lmna* ^{Δ K32/ Δ K32} mice have major growth retardation associated with skeletal and cardiac muscle maturation defects. They died during the third week of life from severe metabolic defects probably due at least in part to a repressive action of mutant

lamins on SREBP-1 transcriptional activities, which resulted in the alteration of adipose tissue differentiation and glucose homeostasis. Overall, these results demonstrate the crucial role of the N-terminal domain of lamin A/C for their polymerization and the regulation of transcription factor’s activities. Finally, results obtained on *Lmna* ^{Δ K32/ Δ K32} mice suggest that L-CMD patients should be investigated for putative metabolic disorders that have remained unexplored so far.

RESULTS

Impact of delK32 mutation on lamin A/C expression and localization

Considering the localization of the Δ K32 mutation in a domain of lamin A/C involved in their polymerization (15,16), we hypothesized that this mutation could have a strong impact on lamin A/C organization. Hence, we investigated the cellular localization of A-type lamins in different mouse tissues and at different stages of embryonic and postnatal development. By immunostaining of embryo sections at embryonic day 12.5 (E12.5), WT and Δ K32-lamin A/C were both found as multiple foci in the nucleoplasm (Fig. 1A). At E17.5, WT lamin A/C was progressively relocalized at the nuclear periphery, while Δ K32-lamin A/C was not (Fig. 1B). A similar localization was observed in postnatal muscles, with a strong lamin A/C staining at the nuclear periphery in *Lmna*^{+/+} and a weak staining in nuclear foci in *Lmna* ^{Δ K32/ Δ K32} muscles (Fig. 1C). In postnatal *Lmna*^{+/ Δ K32} muscles, lamin A/C was observed at the nuclear rim, as observed for WT muscle, although the signal was fainter. Similar results were obtained in all tissues tested in postnatal mice, although the lamin A/C perinuclear staining was more pronounced in post-mitotic nuclei, such as myonuclei (*tibialis anterior*, quadriceps and *soleus* muscles and heart, data not shown). In contrast to lamin A/C, lamin B1 was always observed at the nuclear periphery in WT and *Lmna* ^{Δ K32/ Δ K32} mice (Fig. 1A and B). Overall, these data suggest that mutant Δ K32-lamin A/C is not able to assemble in the nuclear lamina of *Lmna* ^{Δ K32/ Δ K32} cells.

The level of the lamin A/C protein was 50 and 80% lower in *Lmna*^{+/ Δ K32} and *Lmna* ^{Δ K32/ Δ K32} skeletal muscles, respectively (Fig. 1D), as in all analyzed tissues, compared with *Lmna*^{+/+} mice. Prelamin A was not detected (data not shown) and lamin B1 expression level was unaffected (Fig. 1D). Interestingly, the level of lamin A/C mRNA did not differ in the tissues of the three genotypes (data not shown), suggesting that lower steady-state level of mutant proteins results from reduced translation efficiency or higher rate of protein degradation.

Global phenotype of *Lmna* ^{Δ K32/ Δ K32} mice

Analysis of 294 newborn mice from independent heterozygous crosses indicated that the percentage of mice from each genotype (30% of *Lmna*^{+/+}, 49% of *Lmna*^{+/ Δ K32} and 21% of *Lmna* ^{Δ K32/ Δ K32}) was not statistically different from the expected Mendelian ratios. At birth, *Lmna* ^{Δ K32/ Δ K32} mice were indistinguishable from their WT and heterozygous littermates in term of body weight and size (data not shown). However, as early as post-natal day 5 (P5), *Lmna* ^{Δ K32/ Δ K32}

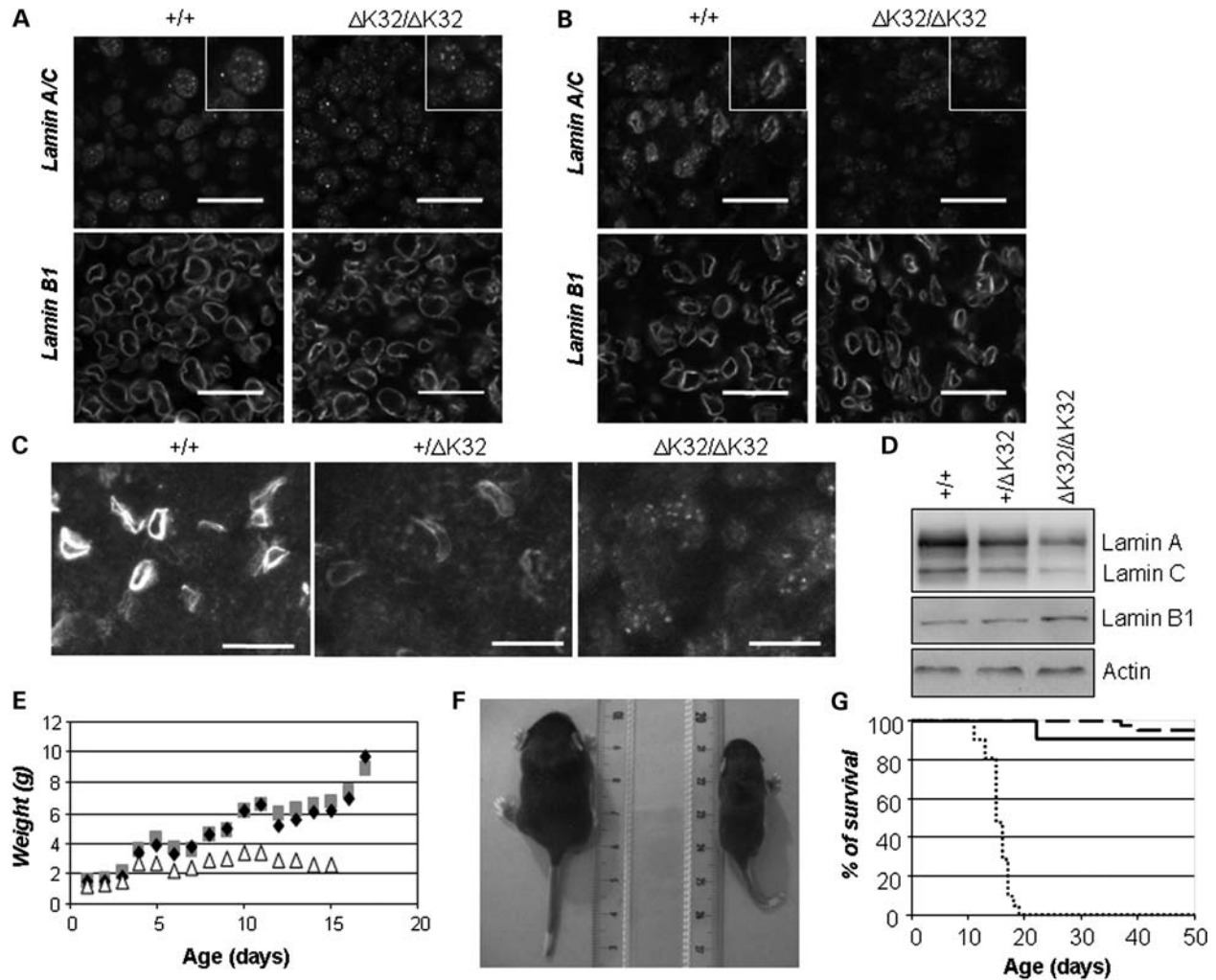


Figure 1. Reduced expression and abnormal maintenance of $\Delta K32$ -lamin A/C in the nucleoplasmic foci in $Lmna^{\Delta K32/\Delta K32}$ lead to general growth defects and premature death. (A and B) Indirect immunofluorescent confocal micrographs of $Lmna^{+/+}$ and $Lmna^{\Delta K32/\Delta K32}$ embryonic muscle sections at E12.5 (A) and E17.5 (B) stained for lamin A/C or lamin B1 (scale bar: 20 μ m). (C) Indirect immunofluorescent micrographs of P5 $Lmna^{+/+}$, $Lmna^{+/\Delta K32}$ and $Lmna^{\Delta K32/\Delta K32}$ *gastrocnemius* sections stained for lamin A/C (scale bar: 20 μ m). (D) Representative western blot analysis of $Lmna^{+/+}$, $Lmna^{+/\Delta K32}$ and $Lmna^{\Delta K32/\Delta K32}$ *gastrocnemius* lysates probed for lamin A/C and lamin B1 proteins relative to actin proteins. (E) Growth curve of $Lmna^{+/+}$ ($n = 32$; black diamonds), $Lmna^{+/\Delta K32}$ ($n = 36$, grey squares) and $Lmna^{\Delta K32/\Delta K32}$ ($n = 18$, white triangles). (F) Representative picture of P12 $Lmna^{+/+}$ (left; 4.5 cm) and $Lmna^{\Delta K32/\Delta K32}$ (right; 3.5 cm) mice. (G) Kaplan–Meyer survival curve of $Lmna^{+/+}$ ($n = 22$; black line), $Lmna^{+/\Delta K32}$ ($n = 44$; large dashed line), $Lmna^{\Delta K32/\Delta K32}$ ($n = 21$; dotted line).

mice showed a severe reduction in the growth curve (Fig. 1E). By P12, they were $\sim 50\%$ lighter (Fig. 1E) and significantly smaller (Fig. 1F) than their littermates, and they irremediably started to lose weight and die. By P15, only half of $Lmna^{\Delta K32/\Delta K32}$ mice were still alive, and by P19, they were all dead (Fig. 1G). Experimental observation of several litters revealed that young $Lmna^{\Delta K32/\Delta K32}$ mice had a slight delay in walk acquisition compared with $Lmna^{+/+}$ and $Lmna^{+/\Delta K32}$ littermates. Once normal gait was acquired, $Lmna^{\Delta K32/\Delta K32}$ mice rapidly displayed a waddling gait that evolved into an increasing number of falls apparently due to hindquarter blockade.

Defective skeletal muscle maturation

Histological analysis of skeletal muscle of $Lmna^{\Delta K32/\Delta K32}$ mice at birth revealed that all skeletal muscles analyzed

were already affected and showed a reduction in fiber size compared with $Lmna^{+/+}$ and $Lmna^{+/\Delta K32}$ muscles (data not shown). A reduction in skeletal muscle fiber cross-sectional area in $Lmna^{\Delta K32/\Delta K32}$ was also observed at P14 as shown for the *gastrocnemius* muscle (Fig. 2A and B). This was associated with the persistence of centralized myonuclei at all time points analyzed (P5, P8 and P14) (Fig. 2A, white arrows). Quantification performed at P14 in the *gastrocnemii* revealed a significant increase in the number of central nuclei in $Lmna^{\Delta K32/\Delta K32}$ (Fig. 2C). This was not linked to repeated cycles of muscle necrosis/regeneration as inflammation, necrotic features or fibrosis were never observed.

Reduced muscle fiber cross-sectional area and increased number of central nuclei without signs of regeneration may be associated to an immature muscle phenotype.

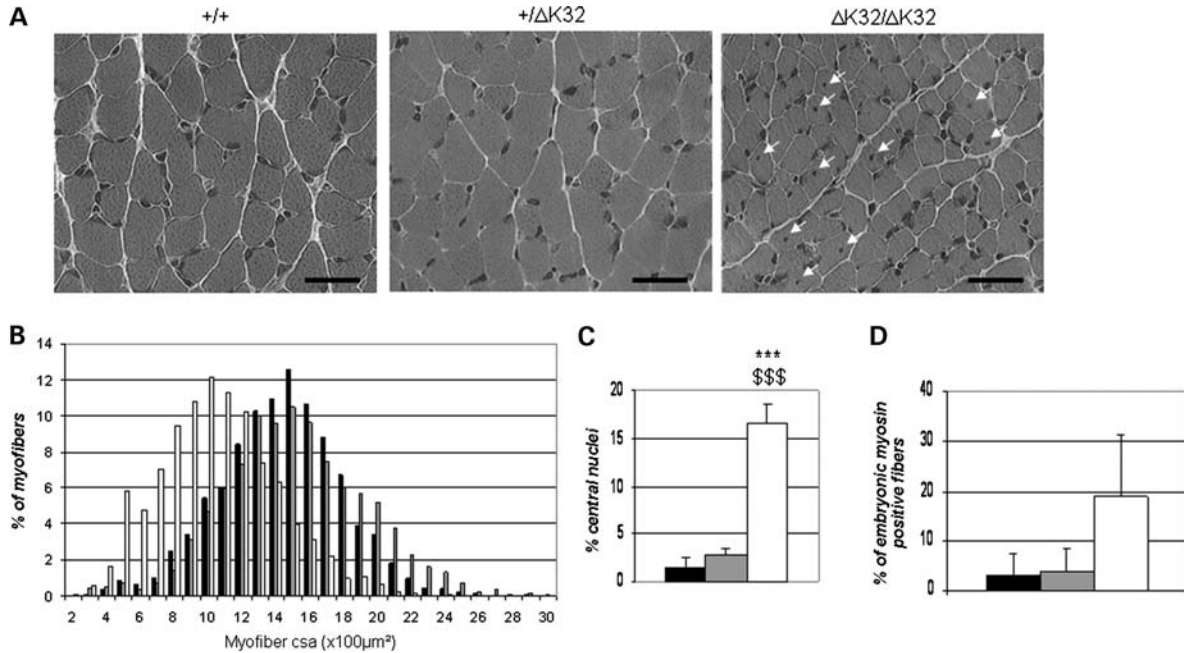


Figure 2. $\Delta K32$ -lamin A/C is responsible for defects in postnatal maturation of skeletal muscles. (A) Hematoxylin/eosin (HE) staining of $Lmna^{+/+}$, $Lmna^{+/\Delta K32}$ and $Lmna^{\Delta K32/\Delta K32}$ *gastrocnemius* sections (scale bar: 50 μm). (B) Cross-sectional area (csa) repartition from $Lmna^{+/+}$ ($n = 2$; in black), $Lmna^{+/\Delta K32}$ ($n = 3$; in grey), $Lmna^{\Delta K32/\Delta K32}$ ($n = 3$; in white) *gastrocnemii*. (C) Proportion of muscle fibers with central nuclei in $Lmna^{+/+}$ ($n = 4$; in black), $Lmna^{+/\Delta K32}$ ($n = 5$; in grey) and $Lmna^{\Delta K32/\Delta K32}$ ($n = 5$; in white) *gastrocnemii* represented as mean \pm SD. *** $P \leq 0.001$ between $Lmna^{+/+}$ and $Lmna^{\Delta K32/\Delta K32}$; \$\$\$ $P \leq 0.001$ between $Lmna^{+/\Delta K32}$ and $Lmna^{\Delta K32/\Delta K32}$. (D) Proportion of muscle fibers expressing the embryonic myosin heavy chains in $Lmna^{+/+}$ ($n = 2$; in black), $Lmna^{+/\Delta K32}$ ($n = 3$; in grey) and $Lmna^{\Delta K32/\Delta K32}$ ($n = 3$; in white) *gastrocnemii* represented as mean \pm SD.

Consequently, we then looked at the switch from the two developmental myosin heavy chains, the embryonic (MyHC-emb, encoded by the *Myh3* gene) and the neonatal (MyHC-neo, encoded by the *Myh8* gene) myosin heavy chains to adult fast- and slow-myosin heavy chains in P14 *gastrocnemius* sections. While $Lmna^{+/+}$ mice had almost completely switch off their MyHC-emb expression to express adult fast and slow-twitch myosins, the $Lmna^{\Delta K32/\Delta K32}$ still expressed significant levels of MyHC-emb. $Lmna^{+/\Delta K32}$ mice have an intermediate phenotype (Fig. 2D). Muscle fibers with MyHC-neo expression were never observed in the three genotypes in P14 *gastrocnemii*. Overall, these results suggest that $Lmna^{\Delta K32/\Delta K32}$ mice exhibit a defect in muscle maturation.

Cardiac maturation defects

We then investigated whether $Lmna^{\Delta K32/\Delta K32}$ mice developed a cardiac phenotype. The heart weight to tibia length ratio was significantly and markedly lower in P14 but not in newborn (P0) $Lmna^{\Delta K32/\Delta K32}$ compared with $Lmna^{+/+}$ and $Lmna^{+/\Delta K32}$ mice (Fig. 3A). $Lmna^{\Delta K32/\Delta K32}$ hearts did not show signs of ventricular hypertrophy or dilatation (Fig. 3B). On the other hand, the number of lipid droplets remained high in cardiomyocytes of P14- $Lmna^{\Delta K32/\Delta K32}$ (Fig. 3C), whereas they almost completely disappeared as soon as P5 in $Lmna^{+/+}$ and $Lmna^{+/\Delta K32}$ cardiomyocytes. Similar to what was observed in skeletal muscles, cardiomyocyte cross-sectional area was markedly smaller in $Lmna^{\Delta K32/\Delta K32}$ (Fig. 3D). To

further analyze the heart, we performed echocardiographic analysis on 2-week-old mice. This analysis confirmed the lower heart weight in $Lmna^{\Delta K32/\Delta K32}$ than in $Lmna^{+/+}$ and $Lmna^{+/\Delta K32}$ littermates (Supplementary Material, Table S1). However, no sign of cardiac hypertrophy, dilation or dysfunction was revealed. Finally, to discriminate between cardiac remodeling and cardiac immaturity, we determined the expression of genes that are differently regulated during these two processes: the natriuretic peptide precursor A and B genes (*Nppa* and *Nppb*), the alkali and regulatory myosin light chain genes (*Myl4* and *Myl7*) (17) and α - and β -myosin heavy chain genes (*Myh6* and *Myh7*): a strong expression of *Nppa*, *Nppb* and *Myh7* without overexpression of *Myl4* and *Myl7* being a characteristic of embryonic hearts, while overexpression of *Nppa*, *Nppb*, *Myh7*, *Myl4* and *Myl7* is associated to cardiac remodeling (18). In $Lmna^{\Delta K32/\Delta K32}$ hearts, we found an increase in *Nppa*, *Nppb* and *Myh7* mRNA levels and a decrease in *Myh6* mRNA levels compared with $Lmna^{+/+}$ and $Lmna^{+/\Delta K32}$ hearts (Fig. 3E). *Myl4* and *Myl7* mRNA levels did not differ between the three genotypes. Altogether, these data suggest a cardiac maturation defect without incidence on cardiac remodeling or function in $Lmna^{\Delta K32/\Delta K32}$.

Metabolic defects

In addition to the skeletal and cardiac muscle defects, standard systematic phenotyping also revealed a marked reduction or even an absence of white adipose tissue (WAT) in

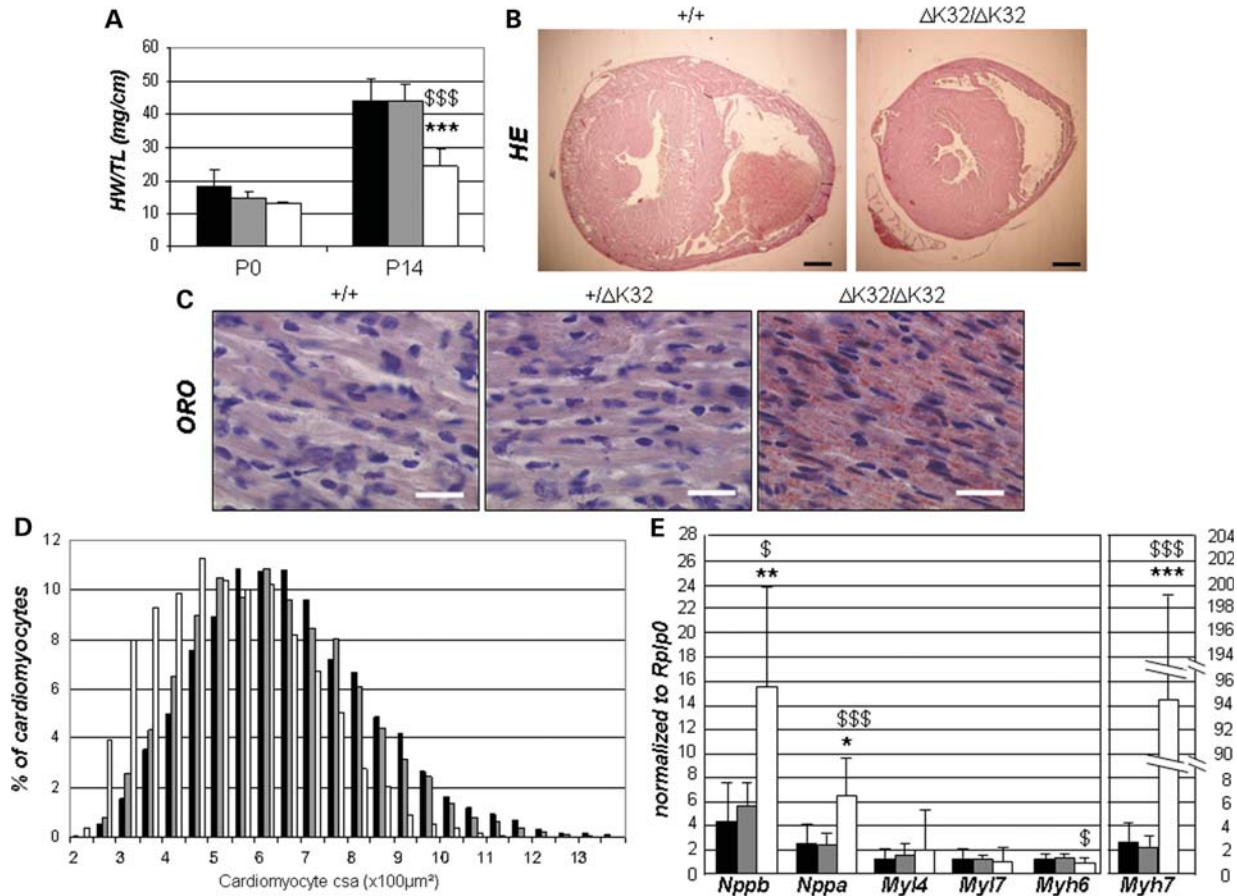


Figure 3. $\Delta K32$ -lamin A/C is responsible for defects in postnatal maturation of cardiac muscle. (A) Heart weight to tibia length ratio (HW/TL) at birth (P0) and at P14 *Lmna*^{+/+} ($n = 3$ and $n = 27$, respectively; in black), *Lmna*^{+/ $\Delta K32$} ($n = 2$ and $n = 28$, respectively; in grey) and *Lmna* ^{$\Delta K32/\Delta K32$} ($n = 2$ and $n = 36$; respectively; in white) mice measured in mg/cm (data are represented as mean \pm SD). *** $P \leq 0.001$ between *Lmna*^{+/+} and *Lmna* ^{$\Delta K32/\Delta K32$} , \$\$\$ $P \leq 0.001$ between *Lmna*^{+/ $\Delta K32$} and *Lmna* ^{$\Delta K32/\Delta K32$} . (B) Hematoxylin/eosin (HE) staining of cardiac section at P11 in *Lmna*^{+/+}, *Lmna*^{+/ $\Delta K32$} and *Lmna* ^{$\Delta K32/\Delta K32$} mice (scale bar: 1 mm). (C) Oil Red O (ORO) staining of *Lmna*^{+/+}, *Lmna*^{+/ $\Delta K32$} and *Lmna* ^{$\Delta K32/\Delta K32$} heart sections, counterstained with HE (scale bar: 20 μ m). (D) Cross-sectional area (csa) of cardiomyocytes in *Lmna*^{+/+}, *Lmna*^{+/ $\Delta K32$} and *Lmna* ^{$\Delta K32/\Delta K32$} hearts. (E) Quantitative polymerase chain reaction (PCR) analysis of *Nppa*, *Nppb*, *Myl4*, *Myl7*, *Myh6* and *Myh7* mRNA relative to *Rplp0* mRNA presented as the mean \pm SD of triplicate of *Lmna*^{+/+} ($n = 7$; in black), *Lmna*^{+/ $\Delta K32$} ($n = 7$; in grey) and *Lmna* ^{$\Delta K32/\Delta K32$} ($n = 4$; in white) hearts, with *, ** and *** corresponding to $P \leq 0.05$, $P \leq 0.01$ and $P \leq 0.001$ between *Lmna*^{+/+} and *Lmna* ^{$\Delta K32/\Delta K32$} , respectively, and \$, \$\$ and \$\$\$ corresponding to $P \leq 0.05$, $P \leq 0.01$ and $P \leq 0.001$ between *Lmna*^{+/ $\Delta K32$} and *Lmna* ^{$\Delta K32/\Delta K32$} , respectively. See also Supplementary Material, Table S1.

Lmna ^{$\Delta K32/\Delta K32$} mice, while brown adipose tissue was normal. Histological analysis of WAT revealed smaller adipocytes with reduced lipid accumulation compared with *Lmna*^{+/+} and *Lmna*^{+/ $\Delta K32$} mice (Fig. 4A). *Lmna* ^{$\Delta K32/\Delta K32$} liver did not differ in terms of lipid and glycogen content from *Lmna*^{+/+} and *Lmna*^{+/ $\Delta K32$} . Interestingly, *Lmna* ^{$\Delta K32/\Delta K32$} progressively developed hypoglycemia (with statistical differences starting at day 12) despite correct feeding as evidenced by their stomach always full of milk at autopsy. By day 14, blood glucose level was only $\sim 45\%$ of the level found in *Lmna*^{+/+} and *Lmna*^{+/ $\Delta K32$} mice (Fig. 4B). Insulin plasma level was also much lower, suggesting that *Lmna* ^{$\Delta K32/\Delta K32$} mice are not insulino-resistant (Fig. 4C). As severe hypoglycemia may result from defects in β -oxidation, acylcarnitine levels were measured in the urine of the mice. C2- and C6-acylcarnitine levels were higher, whereas others (C8, C10 and C12 chains) exhibited only a trend toward higher content in *Lmna* ^{$\Delta K32/\Delta K32$} than in *Lmna*^{+/+} and *Lmna*^{+/ $\Delta K32$} mice (Table 1). Hence, these data suggest that

(i) β -oxidation is not altered, and (ii) ketogenesis is an active phenomenon in *Lmna* ^{$\Delta K32/\Delta K32$} mice.

Implication of SREBP-1 transcription factor

SREBP-1 transcription factor plays a key role in energy homeostasis by regulating lipogenesis via expression of enzymes involved in glucose utilization and fatty-acid synthesis, such as acetyl-CoA carboxylase or fatty-acid synthase (19,20). Moreover, SREBP-1 is also involved in adipocyte determination and differentiation via expression of PPAR γ (21). Interestingly, SREBP-1 interacts with lamin A (13). Hence, we hypothesized that a defect in the SREBP-1 pathway may be involved in the metabolic defects in *Lmna* ^{$\Delta K32/\Delta K32$} mice.

To test this hypothesis, we evaluated the level of the SREBP-1 protein in 14-day-old mouse liver. Both the precursor (125 kDa) and the mature (68 kDa) forms of SREBP-1 were present in *Lmna*^{+/+} and *Lmna*^{+/ $\Delta K32$} (Fig. 5A), whereas only the mature form was detected in *Lmna* ^{$\Delta K32/\Delta K32$} .

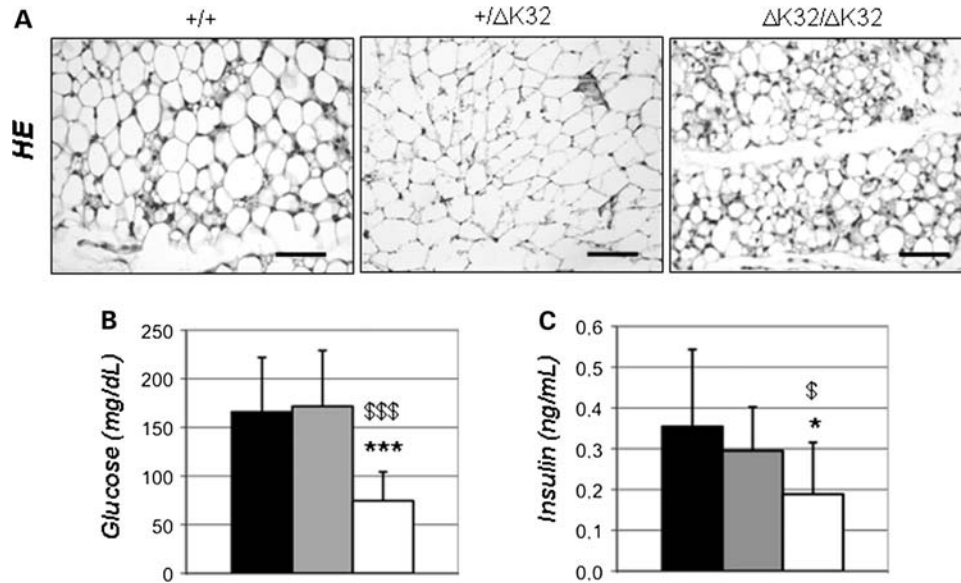


Figure 4. $\Delta K32$ -lamin A/C is responsible for metabolic defects. (A) Hematoxylin/eosin (HE) staining of WAT from P11 *Lmna*^{+/+}, *Lmna*^{+/- $\Delta K32$} and *Lmna* ^{$\Delta K32/\Delta K32$} mice (scale bar: 100 μ m). (B) Glucose (mg/dl) contained in the blood from *Lmna*^{+/+} ($n = 21$; in black), *Lmna*^{+/- $\Delta K32$} ($n = 28$; in grey) and *Lmna* ^{$\Delta K32/\Delta K32$} ($n = 33$; in white) represented as mean \pm SD. *** $P \leq 0.001$ between *Lmna*^{+/+} and *Lmna* ^{$\Delta K32/\Delta K32$} and \$\$\$ $P \leq 0.001$ between *Lmna*^{+/- $\Delta K32$} and *Lmna* ^{$\Delta K32/\Delta K32$} . (C) Insulin (ng/ml) contained in the blood from P12–P15 *Lmna*^{+/+} ($n = 7$; in black), *Lmna*^{+/- $\Delta K32$} ($n = 14$; in grey) and *Lmna* ^{$\Delta K32/\Delta K32$} ($n = 7$; in white) represented as mean \pm SD. * $P \leq 0.05$ between *Lmna*^{+/+} and *Lmna* ^{$\Delta K32/\Delta K32$} and \$ $P \leq 0.05$ between *Lmna*^{+/- $\Delta K32$} and *Lmna* ^{$\Delta K32/\Delta K32$} .

Table 1. Acylcarnitine quantification

	<i>Lmna</i> ^{+/+} ($n = 6$)	<i>Lmna</i> ^{+/-$\Delta K32$} ($n = 4$)	<i>Lmna</i> ^{$\Delta K32/\Delta K32$} ($n = 4$)
Total carnitine	1.372 \pm 9.96 E-02	1.321 \pm 7.04 E-02	1.764 \pm 1.71 E-01**
C2-acylcarnitine	3.53 E-01 \pm 9.62 E-02	2.97 E-01 \pm 6.54 E-02	7.37 E-01 \pm 1.67 E-01**
C3-acylcarnitine	4.31 E-03 \pm 1.81 E-03	5.34 E-03 \pm 3.06 E-03	5.79 E-03 \pm 2.37 E-03
C4-acylcarnitine	4.41 E-03 \pm 1.08 E-03	4.69 E-03 \pm 1.97 E-03	5.05 E-03 \pm 1.74 E-03
C5-acylcarnitine	6.16 E-03 \pm 5.54 E-03	7.90 E-03 \pm 2.59 E-03	7.20 E-03 \pm 1.34 E-03
C6-acylcarnitine	1.17 E-03 \pm 2.05 E-04	1.05 E-03 \pm 2.16 E-04	1.68 E-03 \pm 1.53 E-04**
C8-acylcarnitine	1.41 E-03 \pm 4.85 E-04	1.42 E-03 \pm 4.18 E-04	1.87 E-03 \pm 4.63 E-04
C10-acylcarnitine	1.43 E-03 \pm 5.73 E-04	1.24 E-03 \pm 6.26 E-04	1.80 E-03 \pm 7.09 E-04
C12-acylcarnitine	1.16 E-03 \pm 5.30 E-04	1.01 E-03 \pm 4.61 E-04	1.44 E-03 \pm 5.07 E-04
C14-acylcarnitine	5.58 E-04 \pm 1.64 E-04	8.16 E-04 \pm 4.86 E-04	5.95 E-04 \pm 2.94 E-04
C16-acylcarnitine	3.01 E-04 \pm 2.49 E-04	3.05 E-04 \pm 2.80 E-04	2.69 E-04 \pm 1.79 E-04
C18-acylcarnitine	3.67 E-04 \pm 3.63 E-04	4.06 E-04 \pm 4.41 E-04	3.15 E-04 \pm 2.56 E-04

Acylcarnitine quantification from 14-day-old *Lmna*^{+/+}, *Lmna*^{+/- $\Delta K32$} and *Lmna* ^{$\Delta K32/\Delta K32$} urine samples normalized to free acylcarnitine represented as mean \pm SD. **Corresponds to $P \leq 0.01$ between *Lmna* ^{$\Delta K32/\Delta K32$} and *Lmna*^{+/+} or *Lmna*^{+/- $\Delta K32$} .

$\Delta K32$ liver. Overall, the levels of the SREBP-1 protein (precursor and mature forms) were lower in *Lmna* ^{$\Delta K32/\Delta K32$} mouse liver. We then evaluated the ability of mature SREBP-1 to translocate in the nucleus of hepatocytes by immunostaining on liver sections. A strong signal for SREBP-1 was observed in *Lmna*^{+/+} and *Lmna* ^{$\Delta K32/\Delta K32$} nuclei suggesting normal nuclear translocation (Fig. 5B).

To evaluate whether the lower levels of the SREBP-1 protein resulted from lower transcription efficiency in *Lmna* ^{$\Delta K32/\Delta K32$} mice, expression of the *Srebf1* gene (encoding SREBP-1) was determined at the mRNA level. *Srebf1* mRNA level was markedly lower in *Lmna* ^{$\Delta K32/\Delta K32$} liver (Fig. 5C). Interestingly, it has been shown that SREBP-1 directly targets its own expression. Hence, we suspected that mutant lamin A/C impedes the capacity of SREBP-1 to correctly

activate the transcription of its target genes in *Lmna* ^{$\Delta K32/\Delta K32$} mice. Therefore, we evaluated expression of SREBP-1 target genes, *Acc2* and *Fas* as well as *Peroxisome proliferator activated receptors* (*Ppara*, *Ppard* and *Pparg* encoding PPAR α , PPAR β/δ and PPAR γ , respectively), PPAR α being the major PPAR isoform expressed in the liver (22). *Fas*, *Ppara* and *Ppard* mRNA levels, but not *Acc2* and *Pparg*, were markedly lower in *Lmna* ^{$\Delta K32/\Delta K32$} than in *Lmna*^{+/+} and *Lmna*^{+/- $\Delta K32$} livers (Fig. 5C). These data suggest that mutant lamin A/C has a dominant-negative effect on SREBP-1 transcriptional activity in the liver.

Considering the major role of SREBP-1 in promoting WAT differentiation, the reduction in WAT in *Lmna* ^{$\Delta K32/\Delta K32$} may also be related to the transcriptional inhibition of SREBP-1 in the presence of $\Delta K32$ -lamin A/C mutant. We therefore

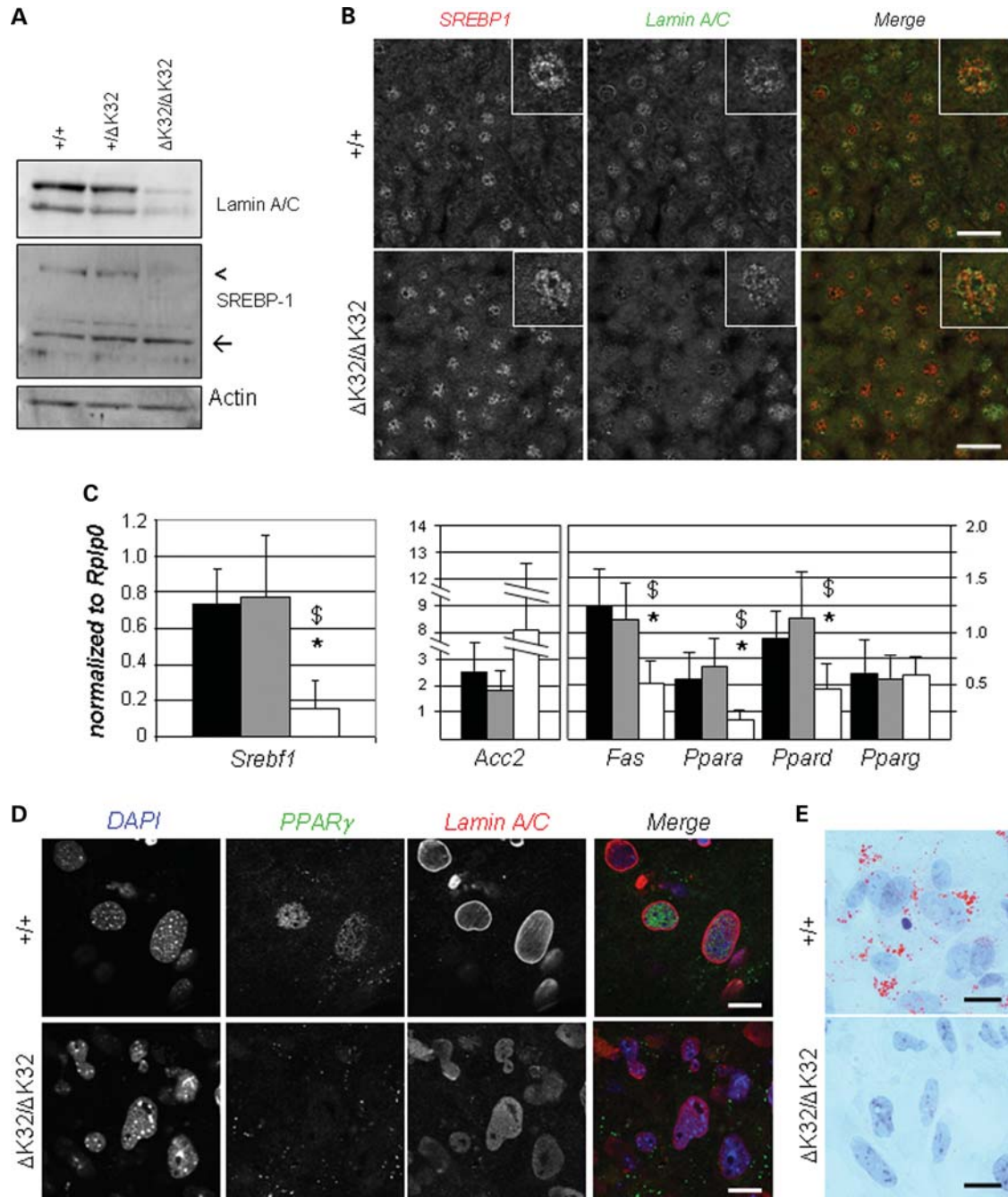


Figure 5. $\Delta K32$ -lamin A/C in the nucleoplasm alters SREBP-1 transcriptional activities in liver and in MEF induced towards adipocyte conversion. (A) Western blot analysis of $Lmna^{+/+}$, $Lmna^{+\Delta K32}$ and $Lmna^{\Delta K32/\Delta K32}$ liver lysates probed for SREBP-1, lamin A/C and actin proteins. Arrowhead points toward SREBP-1 precursor and arrow toward mature SREBP-1 protein. (B) Indirect immunofluorescent confocal micrographs of $Lmna^{+/+}$ and $Lmna^{\Delta K32/\Delta K32}$ liver sections stained for SREBP-1 (in red) and lamin A/C (in green) (scale bar: 20 μ m). (C) Quantitative PCR analysis for *Srebf1*, *Acc2*, *Fas*, *Ppara*, *Ppard* and *Pparg* mRNA expression relative to *Rplp0* mRNA levels in P14 $Lmna^{+/+}$ ($n = 6$; in black), $Lmna^{+\Delta K32}$ ($n = 6$; in grey) and $Lmna^{\Delta K32/\Delta K32}$ ($n = 6$; in white) liver represented as mean \pm SD; with *corresponding to $P \leq 0.05$ between $Lmna^{+/+}$ and $Lmna^{\Delta K32/\Delta K32}$ and \$ for $P \leq 0.05$ between $Lmna^{+\Delta K32}$ and $Lmna^{\Delta K32/\Delta K32}$ mice. (D) Indirect immunofluorescent confocal micrographs of $Lmna^{+/+}$ and $Lmna^{\Delta K32/\Delta K32}$ MEF cells after 10 days of differentiation stained for PPAR γ and lamin A/C (scale bar: 20 μ m). (E) Oil Red O stainings of $Lmna^{+/+}$ and $Lmna^{\Delta K32/\Delta K32}$ MEF cells after 10 days of differentiation (scale bar: 20 μ m). Nuclei are counter stained with hematoxylin.

investigated *in vitro* adipogenic differentiation of $Lmna^{+/+}$ and $Lmna^{\Delta K32/\Delta K32}$ mouse embryonic fibroblasts (MEFs). Similar to *in vivo* data, lamin A/C was correctly localized mainly at the nuclear periphery in WT MEFs, while

$\Delta K32$ -lamin was only observed in the nucleoplasm (Fig. 5D). By days 8 and 10 after induction of adipogenic differentiation, almost all $Lmna^{+/+}$ MEFs exhibited nuclear expression of PPAR γ , while none of $Lmna^{\Delta K32/\Delta K32}$ MEFs

did (Fig. 5D). Moreover, by day 10 after induction of adipogenic differentiation, *Lmna*^{+/+} MEFs have accumulated numerous lipid droplets in their cytoplasm as judged by Oil Red O staining, while *Lmna*^{ΔK32/ΔK32} MEFs have not (Fig. 5E). These results suggest that adipocyte differentiation is strongly altered in *Lmna*^{ΔK32/ΔK32} mice.

DISCUSSION

In this study, we tested in mice the impact of a mutation of the *LMNA* gene responsible for severe EDMD or L-CMD in patients. Through the generation of an *Lmna*^{ΔK32/ΔK32} knock-in mouse, we showed the inability of mutant lamin A/C to assemble at the nuclear lamina, while this translocation happened during embryogenesis in *Lmna*^{+/+} mice. Moreover, we observed lower level of lamin A/C protein, but not of the mRNA in *Lmna*^{+/ΔK32} and *Lmna*^{ΔK32/ΔK32} mice, suggesting that a reduced translation efficiency or higher rate of degradation of mutant lamin A/C. The markedly lower level of lamin A/C, the absence of nuclear lamina formation and the persistence of mutated lamin A/C in the nucleoplasm of *Lmna*^{ΔK32/ΔK32} cells likely all contribute to the development of a severe phenotype. It includes maturation delay of skeletal and cardiac muscles relevant to the human disorders, as well as unsuspected metabolic defects involving alteration of SREBP-1 transcriptional activity in the liver and WAT, and responsible for general energetic exhaustion and premature death of *Lmna*^{ΔK32/ΔK32} mice during the third week of life. Overall, our data suggest that lamin A/C location at the nuclear rim seems essential for tissue maturation, most probably by releasing its inhibitory function on transcriptional factors in the nucleoplasm. Moreover, our findings suggest that metabolic disorders may also contribute to the severity of the phenotype in patients, a finding that warrant further explorations in clinics.

Maturation defects in *Lmna*^{ΔK32/ΔK32} mice

Analysis of *Lmna*^{ΔK32/ΔK32} mice revealed a defect in the maturation of skeletal muscles, heart and WAT. It has been previously shown that the expression of MyHC-emb and MyHC-neo was progressively replaced by expression of adult MyHC-fast and -slow during the second and third postnatal weeks in mouse (23). Expression of MyHC-emb (and not of MyHC-neo) in our 14-day-old WT muscles may be due to differences in mouse genetic background compared with the mouse used in Agbulut's study. However, the concomitant presence of MyHC-emb-positive fibers with increased central nuclei and reduced fiber cross-sectional area in the absence of fibrosis and of any signs of necrosis/regeneration 2 weeks after birth in *Lmna*^{ΔK32/ΔK32} mouse muscles strongly suggest a defect in muscle maturation. Very similar observations have been reported in some L-CMD patients, with the presence of muscle fibers expressing neonatal myosin isoforms (5). In the heart, one of the main changes during the post-natal period is the switch in energy source from glucose towards fatty acids (24,25). Together with PGC-1 α , PPAR α has been shown to be the main trigger of this shift, by activating expression

of genes involved in fatty-acid oxidation (FAO) (24). In *Lmna*^{ΔK32/ΔK32} hearts, we have shown that, in addition to an immature transcriptional fingerprint and a decreased heart growth, a high proportion of intracardiac lipid droplets remained. This suggests that a defect of FAO enzymes needed to use fatty acid as energy source might play a role in the persistence of intracardiac lipid droplets. Finally, we showed that *Lmna*^{ΔK32/ΔK32} mice have poorly differentiated WAT. As PPAR γ is the main transcription factor involved in adipogenesis (26), the absence of PPAR γ expression in *Lmna*^{ΔK32/ΔK32} MEFs induced to differentiate in adipocytes is probably involved in the immature state of WAT in 2-week-old *Lmna*^{ΔK32/ΔK32} mice.

Impact of reduced lamin A/C expression and dominant-negative effect of the mutation

Two *Lmna* knock-out mouse models have been described with a relatively similar phenotype to *Lmna*^{ΔK32/ΔK32} mice, suggesting that reduced lamin A/C level is partially responsible for the phenotype in our mouse model. Indeed, *Lmna*^{-/-} or *Lmna*^{GT-/-} mice presented with growth retardation, skeletal and cardiac muscle involvement, hypoglycemia, reduced WAT and premature death (27–29). However, the phenotype was much more dramatic in *Lmna*^{ΔK32/ΔK32} mice. Interestingly, insulin levels were not different between WT and *Lmna*^{-/-} mice at 4 weeks (28), while it was already significantly lower at 2 weeks in our *Lmna*^{ΔK32/ΔK32} mice. Moreover, *Lmna*^{GT-/-} skeletal and cardiac muscles did show impaired post-natal growth but no maturation defects (29). Overall, it suggests that in addition to an effect due to the decreased lamin A/C expression, Δ K32-lamin mutants exert a toxic function on tissue maturation.

This study shows, for the first time, changes in lamin A/C organization during normal embryonic development, with the progressive disappearance of the nuclear foci in muscle around birth. The dominant-negative effect of mutant Δ K32-lamin may be due to their persistence in nucleoplasmic foci in postnatal mice, maintaining cells in an immature state. Modifications of lamin A/C organization have been reported during adipogenesis (30). Similarly, lamin A/C relocation from nuclear foci to the nuclear periphery has been described during *in vitro* myoblast differentiation (31–33). In these myoblasts, lamin A/C localized in foci was shown to interact with protein complexes, including Rb protein involved in cell cycle exit, and the interaction was lost upon lamin A/C relocation under the nuclear membrane.

Interestingly, in *Coenorhabditis elegans*, the Δ K46-Ce lamin mutation (corresponding to Δ K32-lamin mutation in mammals) was recently reported to cause lateral polymerization defects *in vitro*, leading *in vivo* to aggregates formation containing other proteins and to a muscle phenotype (16). RNAi targeting to Ce-lamin in the mutant worms rescues the muscle phenotype, clearly demonstrating the dominant-negative effect of Δ K46-Ce lamin. A similar polymerization defect may occur in *Lmna*^{ΔK32/ΔK32} nuclei, leading to the absence of lamin A/C at the nuclear lamina and the sequestration of proteins inside the foci.

Implication of SREBP-1

Part of the pathogenesis could be attributed to the defective SREBP-1 pathway in *Lmna*^{ΔK32/ΔK32} mice. SREBP-1 exerts its action through the transcriptional activation of genes involved in adipogenic differentiation such as *Pparg* (34) and genes involved in lipid metabolism like *Lpl*, *Acc* or *Fas* (21,35,36). In *Lmna*^{ΔK32/ΔK32} mice, SREBP-1 was not able to induce the expression of *Ppara*, *Ppard* and *Fas* in the liver. Similarly, we showed that *Lmna*^{ΔK32/ΔK32} MEF cells induced to differentiate into adipocytes were unable to activate PPAR γ expression and did not accumulate lipid droplets and thus have defective adipogenesis. Altogether, it is conceivable that *Lmna*^{ΔK32/ΔK32} mice develop hypoglycemia because of their defective fatty-acid storage in liver and WAT. In such condition, ketogenesis, indirectly observed by increased urinary C2-acylcarnitine in *Lmna*^{ΔK32/ΔK32} (37), may reflect the normal hepatic reaction to decreased glucose levels in a prolonged fasting state. Nevertheless, the observed decrease in plasma levels of glucose in spite of active ketogenesis suggests that neoglucogenesis may be impaired, possibly because of the cachectic state of *Lmna*^{ΔK32/ΔK32} mice. Indeed, when lipids are depleted, amino acid metabolism, a source of Krebs cycle intermediates and of keto bodies, may provide insufficient energy to carry out neoglucogenesis in the liver. The resulting glucose depletion impairs Krebs cycle function and keto body metabolism in the peripheral tissues, thus reinforcing ketosis. Overall, we suggest that general exhaustion is the primary cause of death in *Lmna*^{ΔK32/ΔK32} mice.

However, alteration of SREBP-1 transcriptional activity is probably not responsible for all of the observed *Lmna*^{ΔK32/ΔK32} defects. In skeletal muscle, activation of the SREBP-1 pathway has been recently implicated in muscle differentiation defect and atrophy (38). Hence, alteration of SREBP-1 signaling in skeletal muscle would probably be involved in muscle hypertrophy. Therefore, we think that SREBP-1 defect is probably not implicated in muscle maturation defect observed in *Lmna*^{ΔK32/ΔK32}. Inhibition of other transcription factors, such as Rb, might be implicated in the *Lmna*^{ΔK32/ΔK32} mouse phenotype. Rb has major functions in myogenesis and cardiogenesis (39), and interaction between lamins A/C and Rb has been previously described (40). Interestingly, defective Rb signaling in skeletal muscles has already been reported in *Lmna*^{-/-} mice or lamin mutant fibroblasts (32,41). Moreover, Rb is also implicated in adipocyte differentiation towards the white lineage instead of the brown lineage (42), and *Rb*^{-/-} MEFs are unable to undergo adipose conversion (43). Additionally, mislocalization of Δ N-lamin A proteins in nucleoplasmic aggregates, highly similar to Δ K32-lamin A/C, has been involved in inhibition of RNA polymerase II activity via sequestration of TBP in Δ N-lamin A-containing aggregates (11). In transfected cells and in FPLD-mutant cells, transcription is altered as judged by BrU incorporation (6,11). Finally, our findings do not exclude that the absence of lamin A/C at the nuclear lamina is also responsible for defective interactions with known partners at the nuclear envelope, such as emerin, LINC complex proteins and other LAP2-Emerin-MAN1 proteins, which increases nuclear fragility (1,8).

Altogether, we propose that the relocation of WT lamin A/C from the nucleoplasm to the nuclear periphery is important for

proper maturation of organs. In cells expressing Δ K32-lamin A/C proteins, defective for lateral assembly and hence for polymerization at the nuclear lamina, the absence of lamin A/C relocation associated with dominant-negative action of Δ K32-lamin A/C inside the nucleoplasm is responsible for maturation defects. Thus, we suppose that EDMD and L-CMD patients harboring *LMNA* p.delK32 mutation or *LMNA* mutations leading to abnormal polymerization also have metabolic defects that may contribute to the severity of their phenotype. Therefore, our data emphasize the importance to investigate metabolic defects in severe forms of *LMNA*-related muscular dystrophies.

MATERIALS AND METHODS

Mice

Homologous recombination vector was obtained by cleaving the mouse bacterial artificial chromosome-containing *Lmna* exon 1 and intron 1 with *Nsi*I into pGEM-T Easy. The deletion of lysine 32 (delAAG) was introduced in exon 1 by the polymerase chain reaction (PCR) mutagenesis method, while the *Xho*I restriction site was added in intron 1. The floxed Neomycin-Cre recombinase cassette (from pACN vector) and the thymidine kinase cassette (from pMCI-TK vector) were subsequently cloned into *Xho*I and *Sall*I of *Lmna* exon 1–intron 1–pGEM-T, respectively. *Nsi*I linearized vector was injected into 129/SvJ embryonic stem cells. Homologous recombination was checked by neomycin resistance and gancyclovir sensitivity. Recombined ES cells were analyzed by Southern blot and positive ones were injected in C57BL/6 blastocysts to give chimera. Chimeric mice were crossed onto C57BL/6 mice and resulted progeny were genotyped for germline transmission using the following primers F2: 5'-caaagtgcgtgaggagtca-3' and R2: 5'-tgacagcataggccc tgtcac-3'. It is important to note that the system used leads to the deletion of the neomycin-Cre cassette from the DNA during the spermatogenesis (44). The *Lmna* DelK32 mouse model was produced on CIPHE IBiSA platform, Marseille.

Systematic standard phenotype evaluation was performed at Institute Clinique de la Souris (Illkirch, France), which comprises macroscopic and morphological evaluation of 40 organs (for complete protocol see http://www.ics-mci.fr/dep_phenotyping_services.html). Except when mentioned, experiments were performed on P14 mice with same age inside a specific experiment. Mice were euthanized by intraperitoneal injection of overdose anesthetics (ketamine:xylocaine:saline 1/1/1; 6.5 μ l/g) before tissue excision. Experimental procedures on animals were performed in accordance with European legislation (L358-86/609/EEC).

Cells and adipogenic differentiation

Mouse embryos were carefully collected at E13.5 of *Lmna*^{+/+} and *Lmna*^{ΔK32/ΔK32} embryos. After dissection of head and visceral organs for genotyping, embryos were minced and trypsinised for 30 min at 37°C. MEFs were then plated and maintained at 37°C in an atmosphere of 5% CO₂ in the growing medium [Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM); 10% fetal bovine serum (FBS) and penicillin/

streptomycin, Life Technologies]. For adipocyte differentiation, 2-day-postconfluent cells (day 0) were treated for 2 days with differentiation medium (DMEM; 10% FBS and penicillin/streptomycin; 8 $\mu\text{g/ml}$ biotin; 4 $\mu\text{g/ml}$ pantothenate; 10 $\mu\text{g/ml}$ insulin) supplemented with 0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine; 1 μM dexamethasone (Sigma-Aldrich). The medium was renewed every 2 days with differentiation medium.

Tissue sections and staining

Embryos were taken at E12.5 and E17.5. After 24 h in 15% sucrose, embryos were embedded in optimal cutting temperature (OCT) embedding matrix (Cell Path), frozen in liquid nitrogen-cooled isopentane and stored at -80°C until processing. Muscles, WAT, heart and liver were taken from P14 *Lmna*^{+/+}, *Lmna*^{+/ $\Delta\text{K}32$} and *Lmna* ^{$\Delta\text{K}32/\Delta\text{K}32$} littermates, unless specifically specified. Hearts were stopped in systole by putting the hearts for 1 min in 250 mM KCl. Tissues were embedded in OCT embedding matrix (Cell Path) and frozen in liquid-nitrogen-cooled isopentane and stored at -80°C until processing. Seven micrometer sections were made using a cryostat Leica CM3050S.

Frozen sections and MEFs were stained with HE or Oil Red O stains by standard methods. Immunostainings against myosins were performed using mouse antibodies against fast (My32; Sigma-Aldrich), embryonic or slow myosin heavy chains [F1.652 and A4.840, respectively; developmental studies hybridoma bank (DSHB)] and horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-mouse antibody. Stainings were developed using diaminobenzidine, mounted with Immuno-Mount and visualized using a Nikon Eclipse E600 microscope (Nikon).

Fluorescent immunostaining was performed using primary antibodies against lamin A/C (N18; sc-6215), lamin B1 (C20; sc-6216), SREBP-1 (K10; sc-367), PPAR γ (H100; sc-7196) (Santa Cruz), followed by incubation with alexafluor-conjugated secondary antibodies (Life Technologies), mounted in Vectashield mounting medium with 4'-6-diamidino-2-phenylindole (Vector Laboratories) and visualized using axiophot fluorescent microscope (Carl Zeiss) for post-natal muscle sections, a confocal microscope (Olympus FV-1000) for liver sections and cultured MEF and an inverted confocal microscope (Leica SP2 AOBIS AOTF) for embryonic muscle sections.

Protein analysis

Tissue samples were homogenized with FastPrep in protein extraction buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5; 2% SDS; 250 mM sucrose; 75 mM urea; 1 mM dithiothreitol and with protease/phosphatase inhibitors (25 $\mu\text{g/ml}$ aprotinin, 10 $\mu\text{g/ml}$ leupeptin; 1 mM 4-(2-aminoethyl) benzenesulfonyl fluoride hydrochloride and 2 mM Na_3VO_4).

Protein extracts were separated on sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis and transferred to a nitrocellulose membrane (Millipore). Membranes were blocked in 5% skim milk in tris-buffered saline-Tween 20 and hybridized with rabbit anti-lamin A/C (H110, sc-20681) or anti-SREBP-1 (H160, sc8984), with goat anti-lamin B1 (C20, sc-6216) or

anti-prelamin A (C20, sc-6214) (Santa-Cruz) or with mouse anti- α -tubulin or anti-actin antibodies (Sigma-Aldrich) and with secondary anti-rabbit, anti-goat or anti-mouse IgG HRP-conjugated antibodies (Dako). Immunoblots were visualized by Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore) on a G Box system using GeneSnap software (Ozyme).

Quantification of lamin A/C expression level was performed in three to four different samples per genotype and per tissue. The mean normalized ratio of lamin A/C to actin or tubulin (proteins used as loading controls) was measured using the Gene Tools software (Ozyme).

Acylcarnitine analysis

Extraction of acylcarnitines without derivatization involved 10 μl urine mixed with deuterium-labeled internal standards and 1 ml of ice-cold methanol. After hexane washes, the dried supernatant was dissolved in 50% acetonitrile for flow injection analysis in multiple reaction monitoring mode (API 3000; Life Technologies) (45).

RNA analysis

Total RNA extracts were prepared using RNeasy[®] Fibrous Tissue Mini Kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. Two micrograms of total RNA was then reverse-transcribed using random hexamers primer with SuperScript[™] III first-strand synthesis system kit for real-time PCR (Life Technologies). Real-time PCR was carried out on a LightCycler[®] 480, using the LightCycler[®] 480 SYBR Green I Master (Roche) with sense and anti-sense oligonucleotide primers for the following genes (Supplementary Material, Table S2). Relative levels of mRNA expression were calculated according to the $\Delta\Delta\text{CT}$ method. Individual expression values were normalized by comparison with *Rplp0* mRNA. Values are means \pm standard deviations. Reactions were performed in triplicate.

Statistical analysis

Data are expressed as mean \pm standard deviation. Mendelian distribution of the different mouse phenotypes at birth was tested using the χ^2 -test, while Student's *t*-test or Mann-Whitney rank-sum tests were applied using Sigma Stat software. Statistical significance was assumed at $P < 0.05$.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Supplementary Material is available at *HMG* online.

ACKNOWLEDGEMENTS

We wish to thank C. Enond at the Animal facility of Pitié-Salpêtrière campus (Centre d'Expérimentation Fonctionnelle, Faculté de Médecine Pierre Marie Curie) for their work and help in the mouse colony maintenance, B Geertz for echocardiography analysis of neonatal mice, V Allamand and C Coirault for critical reading and fruitful discussion and the

Myocastor study group for its constant support. The monoclonal antibodies developed by HM Blau were obtained from the DSHB developed under the auspices of the NICHD and maintained by The University of Iowa, Department of Biology, Iowa City, IA 52242.

Conflicts of Interest statement. None declared.

FUNDING

This work was financially supported by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale; the Université Pierre et Marie Curie Paris 06; the Université de la Méditerranée, the Centre National de la Recherche Scientifique; the Association Française contre les Myopathies (#11034, #11057 to G.B. and #15261 to T.A.); and the European Union Sixth Framework Programmes (Euro-laminopathies #018690 to A.T.B.).

REFERENCES

- Broers, J., Ramaekers, F., Bonne, G., Ben Yaou, R. and Hutchison, C. (2006) The nuclear lamins: laminopathies and their role in premature ageing. *Physiol. Rev.*, **86**, 967–1008.
- 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.
- Bonne, G., Di Barletta, M.R., Varnous, S., Becane, H., 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.
- Worman, H.J. and Bonne, G. (2007) Laminopathies: a wide spectrum of human diseases. *Exp. Cell Res.*, **313**, 2121–2133.
- Quijano-Roy, S., Mbieleu, B., Bonnemann, C.G., Jeannot, P.Y., Colomer, J., Clarke, N.F., Cuisset, J.M., Roper, H., De Meirleir, L., D'Amico, A. *et al.* (2008) De novo lmna mutations cause a new form of congenital muscular dystrophy. *Ann. Neurol.*, **64**, 177–186.
- Maraldi, N.M., Capanni, C., Lattanzi, G., Camozzi, D., Facchini, A. and Manzoli, F.A. (2008) SREBP1 interaction with prelamin A forms: a pathogenic mechanism for lipodystrophic laminopathies. *Adv. Enzyme Regul.*, **48**, 209–223.
- Pereira, S., Bourgeois, P., Navarro, C., Esteves-Vieira, V., Cau, P., De Sandre-Giovannoli, A. and Levy, N. (2008) HGPS and related premature aging disorders: from genomic identification to the first therapeutic approaches. *Mech. Ageing Dev.*, **129**, 449–459.
- 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.
- Broers, J.L., Peeters, E.A., Kuijpers, H.J., Endert, J., Bouten, C.V., Oomens, C.W., Baaijens, F.P. and Ramaekers, F.C. (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.
- Taniura, H., Glass, C. and Gerace, L. (1995) A chromatin binding site in the tail domain of nuclear lamins that interacts with core histones. *J. Cell Biol.*, **131**, 33–44.
- Spann, T.P., Goldman, A.E., Wang, C., Huang, S. and Goldman, R.D. (2002) Alteration of nuclear lamin organization inhibits RNA polymerase II-dependent transcription. *J. Cell Biol.*, **156**, 603–608.
- Ozaki, T., Saijo, M., Murakami, K., Enomoto, H., Taya, Y. and Sakiyama, S. (1994) Complex formation between lamin A and the retinoblastoma gene product: identification of the domain on lamin A required for its interaction. *Oncogene*, **9**, 2649–2653.
- Lloyd, D.J., Trembath, R.C. and Shackleton, S. (2002) A novel interaction between lamin A and SREBP1: implications for partial lipodystrophy and other laminopathies. *Hum. Mol. Genet.*, **11**, 769–777.
- D'Amico, A., Haliloglu, G., Richard, P., Talim, B., Maugenre, S., Ferreira, A., Guicheney, P., Menditto, I., Benedetti, S., Bertini, E. *et al.* (2005) Two patients with 'Dropped head syndrome' due to mutations in LMNA or SEPN1 genes. *Neuromuscul. Disord.*, **15**, 521–524.
- Strelkov, S.V., Schumacher, J., Burkhard, P., Aebi, U. and Herrmann, H. (2004) Crystal structure of the human lamin A coil 2B dimer: implications for the head-to-tail association of nuclear lamins. *J. Mol. Biol.*, **343**, 1067–1080.
- Bank, E.M., Ben-Harush, K., Wiesel-Motiuk, N., Barkan, R., Feinstein, N., Lotan, O., Medalia, O. and Gruenbaum, Y. (2011) A laminopathic mutation disrupting lamin filament assembly causes disease-like phenotypes in *C. elegans*. *Mol. Biol. Cell*, **22**, 2716–2728.
- Muchir, A., Shan, J., Bonne, G., Lehnart, S.E. and Worman, H.J. (2009) Inhibition of extracellular signal-regulated kinase signaling to prevent cardiomyopathy caused by mutation in the gene encoding A-type lamins. *Hum. Mol. Genet.*, **18**, 241–247.
- Kuwahara, K. and Nakao, K. (2010) Regulation and significance of atrial and brain natriuretic peptides as cardiac hormones. *Endocr. J.*, **57**, 555–565.
- Ferre, P. and Foufelle, F. (2007) SREBP-1c transcription factor and lipid homeostasis: clinical perspective. *Horm. Res.*, **68**, 72–82.
- Shimano, H. (2009) SREBPs: physiology and pathophysiology of the SREBP family. *FEBS J.*, **276**, 616–621.
- Kim, J.B. and Spiegelman, B.M. (1996) ADD1/SREBP1 promotes adipocyte differentiation and gene expression linked to fatty acid metabolism. *Genes Dev.*, **10**, 1096–1107.
- Pegorier, J.P., Le May, C. and Girard, J. (2004) Control of gene expression by fatty acids. *J. Nutr.*, **134**, 2444S–2449S.
- Agbulut, O., Noirez, P., Beaumont, F. and Butler-Browne, G. (2003) Myosin heavy chain isoforms in postnatal muscle development of mice. *Biol. Cell*, **95**, 399–406.
- Lehman, J.J. and Kelly, D.P. (2002) Transcriptional activation of energy metabolic switches in the developing and hypertrophied heart. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, **29**, 339–345.
- Lopaschuk, G.D. and Jaswal, J.S. (2010) Energy metabolic phenotype of the cardiomyocyte during development, differentiation, and postnatal maturation. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **56**, 130–140.
- Kintscher, U. and Law, R.E. (2005) PPARgamma-mediated insulin sensitization: the importance of fat versus muscle. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **288**, E287–E291.
- Sullivan, T., Escalante-Alcalde, D., Bhatt, H., Anver, M., Bhat, N., Nagashima, K., Stewart, C.L. and Burke, B. (1999) Loss of A-type lamin expression compromises nuclear envelope integrity leading to muscular dystrophy. *J. Cell Biol.*, **147**, 913–920.
- Cutler, D.A., Sullivan, T., Marcus-Samuels, B., Stewart, C.L. and Reitman, M.L. (2002) Characterization of adiposity and metabolism in Lmna-deficient mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **291**, 522–527.
- Kubben, N., Voncken, J.W., Konings, G., van Weeghel, M., van den Hoogenhof, M.M.G., Gijbels, M., van Erk, A., Schoonderwoerd, K., van den Bosch, B., Dahlmans, V. *et al.* (2011) Post-natal myogenic and adipogenic developmental. Defects and metabolic impairment upon loss of A-type lamins. *Nucleus*, **2**, 1–13.
- Verstraeten, V.L., Renes, J., Ramaekers, F.C., Kamps, M., Kuijpers, H.J., Verheyen, F., Wabitsch, M., Steijnen, P.M., van Steensel, M.A. and Broers, J.L. (2011) Reorganization of the nuclear lamina and cytoskeleton in adipogenesis. *Histochem. Cell Biol.*, **135**, 251–261.
- Mariappan, I. and Parnaik, V.K. (2005) Sequestration of pRb by cyclin D3 causes intranuclear reorganization of lamin A/C during muscle cell differentiation. *Mol. Biol. Cell*, **16**, 1948–1960.
- Markiewicz, E., Ledran, M. and Hutchison, C.J. (2005) Remodelling of the nuclear lamina and nucleoskeleton is required for skeletal muscle differentiation *in vitro*. *J. Cell Sci.*, **118**, 409–420.
- Naetar, N. and Foisner, R. (2009) Lamin complexes in the nuclear interior control progenitor cell proliferation and tissue homeostasis. *Cell Cycle*, **8**, 1488–1493.
- Fajas, L., Schoonjans, K., Gelman, L., Kim, J.B., Najib, J., Martin, G., Fruchart, J.C., Briggs, M., Spiegelman, B.M. and Auwerx, J. (1999) Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression by adipocyte differentiation and determination factor 1/sterol regulatory element binding protein 1: implications for adipocyte differentiation and metabolism. *Mol. Cell Biol.*, **19**, 5495–5503.
- Shimano, H., Horton, J.D., Hammer, R.E., Shimomura, I., Brown, M.S. and Goldstein, J.L. (1996) Overproduction of cholesterol and fatty acids causes massive liver enlargement in transgenic mice expressing truncated SREBP-1a. *J. Clin. Invest.*, **98**, 1575–1584.

36. Lopez, J.M., Bennett, M.K., Sanchez, H.B., Rosenfeld, J.M. and Osborne, T.F. (1996) Sterol regulation of acetyl coenzyme A carboxylase: a mechanism for coordinate control of cellular lipid. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **93**, 1049–1053.
37. Hoppel, C.L. and Genuth, S.M. (1982) Urinary excretion of acetylcarnitine during human diabetic and fasting ketosis. *Am. J. Physiol.*, **243**, E168–E172.
38. Lecomte, V., Meugnier, E., Euthine, V., Durand, C., Freyssenet, D., Nemoz, G., Rome, S., Vidal, H. and Lefai, E. (2010) A new role for sterol regulatory element binding protein 1 transcription factors in the regulation of muscle mass and muscle cell differentiation. *Mol. Cell Biol.*, **30**, 1182–1198.
39. Galderisi, U., Cipollaro, M. and Giordano, A. (2006) The retinoblastoma gene is involved in multiple aspects of stem cell biology. *Oncogene*, **25**, 5250–5256.
40. Mancini, M.A., Shan, B., Nickerson, J.A., Penman, S. and Lee, W.H. (1994) The retinoblastoma gene product is a cell cycle-dependent, nuclear matrix-associated protein. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **91**, 418–422.
41. Frock, R.L., Kudlow, B.A., Evans, A.M., Jameson, S.A., Hauschka, S.D. and Kennedy, B.K. (2006) Lamin A/C and emerin are critical for skeletal muscle satellite cell differentiation. *Genes Dev.*, **20**, 486–500.
42. Hansen, J.B., te Riele, H. and Kristiansen, K. (2004) Novel function of the retinoblastoma protein in fat: regulation of white versus brown adipocyte differentiation. *Cell Cycle*, **3**, 774–778.
43. Chen, P.L., Riley, D.J., Chen, Y. and Lee, W.H. (1996) Retinoblastoma protein positively regulates terminal adipocyte differentiation through direct interaction with C/EBPs. *Genes Dev.*, **10**, 2794–2804.
44. Bunting, M., Bernstein, K.E., Greer, J.M., Capecchi, M.R. and Thomas, K.R. (1999) Targeting genes for self-excision in the germ line. *Genes Dev.*, **13**, 1524–1528.
45. Vreken, P., van Lint, A.E., Bootsma, A.H., Overmars, H., Wanders, R.J. and van Gennip, A.H. (1999) Quantitative plasma acylcarnitine analysis using electrospray tandem mass spectrometry for the diagnosis of organic acidurias and fatty acid oxidation defects. *J. Inher. Metab. Dis.*, **22**, 302–306.

SUPPLEMENTAL DATA

Table S1: Echocardiographic data on *Lmna*^{+/+} and *Lmna*^{ΔK32/ΔK32} mice, related to Figure 3.

Measure of cardiac dimensions and function on P16-P17 *Lmna*^{+/+} (n=3) and *Lmna*^{ΔK32/ΔK32} (n=5) mice. Results are shown as mean ± SD. **P*<0.05, ***P*<0.01 and ****P*<0.001 vs *Lmna*^{+/+}.

	<i>Lmna</i> ^{+/+}	<i>Lmna</i> ^{ΔK32/ΔK32}
AWThs (mm)	0.64 ± 0.08	0.54 ± 0.06
PWThs (mm)	0.67 ± 0.12	0.55 ± 0.07
AWThd (mm)	0.47 ± 0.03	0.32 ± 0.08 *
PWThd (mm)	0.46 ± 0.06	0.30 ± 0.08 *
LVESD (mm)	2.49 ± 0.28	1.60 ± 0.37 *
LVEDD (mm)	3.19 ± 0.11	2.51 ± 0.28 **
Heart rate (beats/min)	441 ± 43	323 ± 64 *
BW (mg)	8.07 ± 0.50	3.64 ± 0.24 ***
FS (%)	22.06 ± 7.73	36.61 ± 13.01
LVEDV/BW	4.08 ± 0.25	4.07 ± 0.95
HW/BW	4.57 ± 0.78	3.95 ± 0.59

Table S2: RT-PCR primers used in this study, Related to the Experimental Procedures.

Gene	Forward primer	Reverse primer
<i>Nppa</i>	GGGGGTGGAATTGACAGGAT	GCAGAATCGACTGCCTTTTC
<i>Nppb</i>	GTCAGTCGTTTGGGCTGTAAC	AGACCCAGGCAGAGTCAGAA
<i>Myl4</i>	AGAGGTGGAGCTGCTGTTGT	TGGAGAAACGTGCTTTACCC
<i>Myl7</i>	AGCTCGGGAGGGTAAGTGTT	TTCTCCCCGAAGAGTGTGAG
<i>Gapdh</i>	CGGTGCTGAGTATGTCGTGG	GAAGGTGGAAGAGTGGGAGT
<i>Ppara</i>	AACATCGAGTGTCGAATATGTGG	AGCCGAATAGTTCGCCGAAAG
<i>Pparb</i>	TTGAGCCCAAGTTCGAGTTTG	CGGTCTCCACACAGAATGATG
<i>Pparg</i>	GTGCCTTGCTGTGGGGATG	CGGGAAGGACTTTATGTATG
<i>Srebf1</i>	AATCAGGACCATGCCG	CTCAACCTATGAAAATAAAGTTTGC
<i>Acc2</i>	TCCCCTCCTCAGAGCTGCGG	CCCGGTGCTGCAGGCTGTTT
<i>Fas</i>	GGTCCACCCCAAGCAGGCAC	ACACCCACCCAGACGCCAGT
<i>Rplp0</i>	CTCCAAGCAGATGCAGCAGA	ATAGCCTTGCGCATCATGGT

SUPPLEMENTAL EXPERIMENTAL PROCEDURES

Echocardiography

Mouse transthoracic echocardiography was performed using a Visual Sonics Vevo 770[®] ultrasonograph with a 30 MHz single crystal mechanical transducer. Mice were kept under ECG-controlled anaesthesia with 0.5-1 vol% isoflurane (Abbott Inc.). Two-dimensional echocardiography images were obtained in a modified parasternal short-axis view at mid-papillary muscle level. The thickness of the anterior and posterior walls was obtained in a short axis view in diastole (AWThd and PWThd, respectively) and in systole (AWThs and PWThs, respectively). LV end-systolic (LVESD) and LV end-diastolic (LVEDD) diameters were calculated. The other abbreviations are: BW, body weight; FS, Fractional shortening $(LVEDD-LVESD)/LVEDD \times 100$; HW, heart weight.