

UNIVERSITE D'EVRY VAL D'ESSONNE
Ecole doctorale « Des génomes aux organismes »



THESE

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE D'EVRY VAL D'ESSONNE

Spécialité : Biologie Cellulaire et Moléculaire

Modélisation d'une laminopathie à partir de cellules souches pluripotentes :

Etude phénotypique, génétique et recherche de cibles thérapeutiques

Présentée et soutenue publiquement par

Anne-Claire Guénantin

Le 13 novembre 2012, devant le jury ci-dessous :

Dr Georges Uzan
Dr Stéphane Zaffran
Dr Gisèle Bonne
Dr Hind Guenou
Dr Florence Gonnet
Dr Michel Pucéat

Rapporteur
Rapporteur
Examinatrice
Examinatrice
Examinatrice
Directeur de thèse



SOMMAIRE

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS.....	1
SOMMAIRE	5
ABREVIATIONS.....	10
INDEX DES TABLEAUX	14
INDEX DES FIGURES.....	15
AVANT PROPOS	21
INTRODUCTION	23
1. LES LAMINES, DES PROTEINES MAJEURES DE LA CELLULE :	23
1.1 L'enveloppe nucléaire et les lamines	23
1.1.1 Présentation des lamines	24
1.1.2 Structure des lamines : un filament intermédiaire pas comme les autres ?.....	27
1.1.3 Régulation et assemblage des lamines	30
1.2 Les laminopathies : un gène pour différents types de maladies	33
1.2.1 La découverte des laminopathies	33
1.2.2 Les laminopathies causées par les lamines de type A :.....	35
1.2.2.1 Les laminopathies du muscle strié	35
1.2.2.1.1 La dystrophie musculaire d'Emery Dreifuss	36
1.2.2.1.2 La cardiomyopathie dilatée de type 1A.....	36
1.2.2.1.3 Le syndrome « Cœur-main » de type Slovène	37
1.2.2.1.4 La dystrophie musculaire des ceintures de type 1B	37
1.2.2.1.5 La dystrophie musculaire congénitale	37
1.2.2.2 Les autres types de laminopathies.....	37
1.2.3 La corrélation génotype-phénotype dans les laminopathies	39
1.2.4 La dystrophie musculaire d'Emery-Dreifuss Autosomale Dominante : une laminopathie multifactorielle.....	41
1.2.4.1 Découverte de la pathologie.....	41
1.2.4.2 Description clinique et traitements existants	41
1.2.4.3 Les modèles animaux de la pathologie	42
1.2.4.4 Mécanismes physiopathologiques impliqués dans la DMED-AD :	42

SOMMAIRE

1.2.5 Pistes thérapeutiques pour les laminopathies.....	43
1.3 Les multiples rôles et interactions des lamines	44
1.3.1 La lamine et ses interactions dans le noyau :.....	44
1.3.1.1 Les protéines et facteurs de transcription associés à la lamine.....	44
1.3.1.1 L'ADN et la chromatine	49
1.3.2 Les lamines du nucléoplasme	50
1.3.3 Les voies de signalisation associées à la lamine	51
1.3.3.1 La voie ERK (Extracellular signal Regulated-Kinase).....	51
1.3.3.2 La voie Wnt-β-Caténine.....	51
1.3.3.3 La voie du TGFβ.....	52
1.3.3.4 La voie Notch.....	53
1.3.4 Fonctions des lamines:	53
1.3.4.1 La lamine : Le support du noyau.	54
1.3.4.2 Dans l'apoptose.....	54
1.3.4.3 Dans la régulation de la chromatine.....	54
1.3.4.1 Dans la différenciation :.....	56
1.3.4.2 Dans le nucléoplasme :	56
1.3.4.3 Dans la prolifération cellulaire :	56
2 LE DEVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE PRECOCE :.....	58
2.1 Les premières étapes du développement embryonnaire chez les mammifères :.....	58
2.1.1 Phase de pré-implantation :.....	58
2.1.2 Activation génomique du zygote :	59
2.1.3 La compaction :.....	59
2.1.4 Le premier lignage cellulaire: division entre la masse cellulaire interne et le trophectoderme :.....	60
2.1.5 Le second lignage cellulaire : Ségrégation entre l'endoderme primitif (EP) et l'épiblaste (EPI) :.....	63
2.1.6 La préimplantation de l'embryon humain :.....	64
2.1.7 L'implantation :.....	65
2.1.8 La gastrulation :	66
2.2 La cardiogenèse :.....	68
2.2.1 La morphogénèse du cœur :	68
2.3 Les facteurs de transcription contribuant à la cardiogenèse :.....	71
2.4 Les voies de signalisation impliquées dans le développement embryonnaire des mammifères :	73
2.4.1 La voie Wnt.....	74

SOMMAIRE

2.4.1.1	La voie canonique	74
2.4.1.1	La voie non canonique :	76
2.4.2	La voie du TGF β :	76
2.4.2.1	Nodal :	76
2.4.2.2	BMPs (Bone Morphogenic Proteins) :	77
2.4.3	La voie Notch	77
2.4.4	La voie des FGFs	78
3	LES CELLULES SOUCHES EMBRYONNAIRES ET LES CELLULES A PLURIPOTENCE	
	INDUITE : MODELES DE DEVELOPPEMENT POUR MIEUX COMPRENDRE LES	
	LAMINOPATHIES :	79
3.1	La découverte des cellules souches :	79
3.2	Définition d'une cellule souche :	80
3.3	La pluripotence : Définition et mécanismes :	82
3.3.1	Définition de la pluripotence :	82
3.3.2	Les mécanismes moléculaires de la pluripotence <i>in vitro</i> :	84
3.3.3	Origine des cellules souches pluripotentes :	84
3.4	Les différents types de cellules souches pluripotentes :	86
3.4.1	Les cellules souches de l'épiblaste :	86
3.4.2	Les cellules souches germinales et la lignée germinale chez l'adulte :	86
3.4.3	Les cellules souches embryonnaires :	87
3.4.3.1	Les cellules souches embryonnaires murines :	87
3.4.3.2	Les cellules souches embryonnaires humaines (CSEh) :	88
3.4.4	Différence entre les cellules souches embryonnaires murines et humaines :	90
3.4.5	Les cellules souches à pluripotence induite (iPS) :	90
3.4.5.1	Les différentes techniques d'obtention des iPS :	90
3.4.5.2	Les cellules iPS : un modèle de développement dans les maladies généétiques :	92
3.4.6	Différences entre les cellules CSEh et les iPS :	95
3.5	Les cellules souches pluripotentes et la cardiogenèse :	95
3.5.1	Les gènes impliqués dans la régulation cardiaque :	95
3.5.2	L'apport des voies de signalisation dans la différenciation cardiaque <i>in vitro</i> :	97
3.5.2.1	La voie du TGF β :	98
3.5.2.2	La voie Wnt/ β -caténine :	98
3.5.2.3	La voie Notch :	99
3.5.3	La différenciation cardiaque <i>in vitro</i> :	99

SOMMAIRE

3.5.3.1	Formation de corps embryoides :.....	99
3.5.3.2	Protocoles de différenciation en deux dimensions :	99
PROJET DE THESE		101
MATERIELS ET METHODES		103
1 CULTURE CELLULAIRE		103
1.1	Culture des cellules nourricières : Les fibroblastes embryonnaires murins (MEFs): 103	
1.1.1	Obtention des fibroblastes embryonnaires murins:.....	103
1.1.2	Congélation des fibroblastes embryonnaires murins :	103
1.1.3	Propagation des fibroblastes embryonnaires murins :	104
1.1.4	Inactivation des fibroblastes embryonnaires murins :.....	104
1.2	Culture des Cellules Souches Embryonnaires Murines (CSEm):	105
1.2.1	Production du LIF (Leukemia Inhibitory Factor)	105
1.2.2	Propagation des Cellules Souches Embryonnaires Murines (CSEm):.....	105
1.2.3	Congélation des CSEm	105
1.2.4	Différenciation des CSEm :	106
1.2.5	Génération d'un clone de CSEm par recombinaison génétique	106
1.2.5.1	Electroporation.....	106
1.2.5.2	Sélection des clones recombinés.....	107
1.3	Culture des cellules souches humaines à pluripotence induite (hiPS)	107
1.3.1	Génération des hiPS	107
1.3.2	Propagation des Cellules Souches humaines à pluripotence induite (hiPS) :	108
1.3.3	Congélation des iPS	108
1.3.4	Différenciation des cellules iPS	109
1.3.4.1	Différenciation en corps embryoides	109
1.3.4.2	Induction du mésoderme au BMP2.....	109
2 BIOLOGIE MOLECULAIRE.....		109
2.1	Construction plasmidique.....	109
2.1.1	PCR d'amplification du promoteur de l'alpha actine cardiaque.....	111
2.1.2	Electrophorèse sur gel d'agarose	112
2.1.3	Purification d'ADN sur gel d'agarose	112
2.1.4	Digestion	112
2.1.5	Ligation	113
2.1.6	Transformation des bactéries	113
2.1.7	Préparation d'ADN plasmidique.....	114
2.2	Extraction des ARNs totaux	114

SOMMAIRE

2.3	Transcription inverse.....	114
2.4	PCR quantitative (qPCR) ou en temps réel.....	115
2.5	Immunofluorescence	118
3.	ANALYSE STATISTIQUE	119
	RESULTATS	121
1	ETUDE DU PHENOTYPE $LMNA^{+/H222P}$ SUR LE MODELE DES CELLULES SOUCHES	
	EMBRYONNAIRES MURINES (CSEM) :	121
1.1	Pluripotence des CSEM :.....	121
1.2	Expression de la lamine dans les CSEM $lmna^{+/+}$ et $lmna^{+/H222P}$	123
1.3	Différences morphologiques et phénotype cardiaque retardé dans les corps embryoïdes $lmna^{+/H222P}$:	125
1.4	Correction du phénotype $lmna^{+/H222P}$ <i>in vitro</i> par l'ajout de prélamine A sauvage 131	
1.5	Expression des gènes des 3 feuillets embryonnaires dans les CSEM sauvages, corrigées et porteuses de la mutation $lmna^{+/H222P}$ et corrigées.....	137
2	ETUDE DU PHENOTYPE SUR LES CELLULES A PLURIPOTENCE INDUITE (IPS).....	140
2.1	Pluripotence des cellules iPS :	140
2.2	Différenciation des cellules iPS :	142
	DISCUSSION & CONCLUSION.....	151
1.	MISE EN PLACE D'UN MODELE MURIN ET HUMAIN POUR LES LAMINOPATHIES.....	151
2.	LES MECANISMES ET VOIES DE SIGNALISATION QUI POURRAIENT ETRE IMPLIQUES DANS LA PATHOLOGIE :	155
	BIBLIOGRAPHIE	163

ABBREVIATIONS

ABBREVIATIONS

AA :	Arc Aortique
AANE :	Acides Aminés Non Essentiels.
ADN(c) :	Acide Désoxyribonucléique (complémentaire)
AGZ :	Activation Génomique du Zygote (ou ZAG : Zygote genomic Activation)
ALDH :	Aldéhyde dehydrogénase
AMAR :	Arthrogrypose Myogénique Autosomique Récessive
ANP :	Atrial Natriurétique Peptide
Ao :	Aorte
AP-1 :	Activator Protein 1
ARN(m) :	Acide Ribonucléique (messenger)
ATP :	Adénosine Triphosphate
BET :	Bromure d’Ethidium
BMP :	Bone Morphogenic Protein
CAV :	Canal Atrio-Ventriculaire
CE :	Corps embryoides (<i>EBs : Embryoïd Bodies</i>)
CCP :	Champ Cardiaque Primaire
Cdx2:	Caudal-like transcriptionnal factor with homeodomain
CGR8:	Center Genome Research 8 (lignée de CSEm)
CHMI :	Complexe Majeur D’Histocompatibilité de Classe I
CMT2B1:	Charcot-Marie-Tooth de type 2B1
CMV :	Cytomégalovirus
CPN :	Complexe des Pores Nucléaires
Crx :	Cone-rod homeobox protein
CSEm :	Cellule Souche Embryonnaire murine
CSM :	Cellule Souche Mésoenchymateuse
CTCF:	CCCTC-Binding factor
Da :	Dalton
Dkk :	Dikkopf
DMA :	Dysplasie Mandibulo-Acrale
DMC1B:	Dystrophie musculaire des ceintures de type 1B
DMED-AD :	Dystrophie Musculaire d’Emery Dreifuss Autosomale-Dominante
DMEM :	Dulbecco’s modified eagle’s medium
DMSO :	Diméthyl sulfoxyde
dNTP :	déoxy Nucléotide Triphosphate
DR :	Dermopathie Restrictive
EGFP :	Enhanced Green Fluorescent Protein.

ABBREVIATIONS

Eomes :	Eomesodermine
EN :	Enveloppe Nucléaire
EP :	Endoderme Primitif
EPI :	Epiblaste
EpiSC :	Epiblast Stem Cells – Cellules souches épiblastiques
ERK :	Extracellular signal Regulated-Kinase
EV :	Endoderme Viscéral
EVA :	Endoderme viscéral antérieur
FGF :	Fibroblast Growth Factor (facteur de croissance fibroblastique)
FI :	Filaments Intermédiaires
FTase :	Farnésyltransferase
GDF:	Growth and Differentiation Factor
GMEM :	Glasgow Minimum Essential Medium
GSC :	Goosecoïd
GSK3 β :	Glycogen Synthase Kinase de type 3 β
hES :	human Embryonic Stem (cell) (Cellule souche embryonnaire humaine)
HMT :	Histone Méthytransferase
HP1	Hétérochromatin Protein 1
HSA:	Human Serum Albumin - Sérum albumine humaine
ICMT :	Isoprenylcysteine Carboxyl Methyltransferase
IgG :	Immunoglobuline de type G
I κ BKAP:	I- κ -B kinase complex-associated protein
iPS :	induced Pluripotent Stem cell (cellule souche à pluripotence induite)
Jnk:	c-Jun N-terminal kinases
KO :	Knock-Out (Mutagénèse ciblée qui altère la séquence du gène étudié)
KSR :	Knock-out Serum Replacement (Sérum synthétique)
LAP2:	Lamin Associated Polypeptide 2
LAPs :	Lamina Associated polypeptides - Protéines associées à la lamine (PALs)
LBR:	Lamin B Receptor
LEF:	Lymphoïd Enhancer Factor
LIF:	Leukemia Inhibitory Factor
LINC:	Linker of Nucleoskeleton and Cytoskeleton
LFPD :	Lipodystrophie Partielle Familiale de Dunnigan
Lsd1 :	Lysine specific demethylase 1
MAPK :	Mitogen-Activated Protein Kinase
MCI :	Masse Cellulaire Interne
MEF :	Mouse Embryonic Fibroblast (fibroblaste embryonnaire murin)

ABBREVIATIONS

MesP :	Mésoderme postérieur
miARNs :	micros Acides Ribonucléiques
Min :	minutes
Mlc2v :	Myosin light chain 2v (spécifique du ventricule)
Na/Pyr :	Sodium/Pyruvate
NICD :	Notch Intracellular Domain (domaine intracellulaire de Notch)
OD :	Oreillette Droite
ODP :	Oreillette Droite Primitive
OG :	Oreillette Gauche
OGP :	Oreillette Gauche Primitive
OMIM:	Online Mendelian Inheritance in Man
PBS:	Phosphate Buffer Saline
PCNA:	Proliferating cell nuclear antigen
PCR :	Polymérase Chain Réaction (réaction de polymérisation en chaîne)
qPCR :	quantitative Polymérase Chain Réaction (réaction de polymérisation en chaîne quantitative)
PP2A:	Protein Phosphatase 2A
R-Smads:	Regulatory Smad
Rb :	Rétinoblastome
RCE :	Ras Converting Enzyme
RE :	Réticulum Endoplasmique
RNA Pol II :	RNA polymérase II
Rpm:	Rotation Par Minute
RPMI:	Roswell Park Memorial Institute medium
RT :	Reverse Transcription (transcription inverse)
SCC :	Second Champ Cardiaque
SCID:	Severe Combined Immunodeficiency – Immunodeficiency sévère combinée.
SDS:	Sodium Dodécylsulfate
Shh:	Sonic hedgehog
ShRNA :	Short hairpin RNA (acide ribonucléique à structure en épingle à cheveux)
SIV :	Septum interventriculaire
SLN :	Signal de Localisation Nucléaire
SRF:	Serum Response Factor
SSEA-1, 3, 4:	Stage Specific Embryonic Antigen 1, 2, 3
SVF :	Sérum de Veau Fœtal
TAA :	Tronc Artériel afférent
TAE :	Tronc Artériel efférent

ABBREVIATIONS

TCF :	T-Cell Factor
TBP:	TATA-Binding Protein
TEM:	Transition Epithélio-Mésenchymateuse
TERT:	Telomerase reverse transcriptase
TGF:	Transforming Growth Factor
Tm :	melting Temperature (température de fusion)
Tnt :	Troponine T
TP :	Tronc pulmonaire
Tr :	Trabéculations
Tra-1-60,81:	Tumour Rejection Antigen 60, 81
VCI :	Veine Cave Inférieure
VCS :	Veine cave supérieure
VD :	Ventricule droit
VG :	Ventricule Gauche
VP:	Veine pulmonaire
Wnt:	Wingless/in
WT:	Wild Type
Xi:	Chromosome X inactif
ZMPSTE 24:	Zinc metalloproteinase Ste24

INDEX DES TABLEAUX

INDEX DES TABLEAUX

Tableau 1: Les sous types de filaments intermédiaires et leurs caractéristiques d'après Hyder et al. et Hutchison et al. (Hyder et al., 2011; Hutchison, 2002).....	28
Tableau 2 : Cellules à pluripotence induites créés pour modéliser une pathologie modifié d'après Robinton et Daley (Robinton and Daley, 2012).....	94
Tableau 3 : Primers utilisés pour le clonage du pEGFPC1	111
Tableau 4 : Séquences d'oligonucléotides utilisées pour les qPCRs sur les échantillons murins	116
Tableau 5 : Séquences d'oligonucléotides utilisées pour les qPCRS sur les échantillons humains.	117
Tableau 6 : Liste des anticoprs primaires utlisés.....	119

INDEX DES FIGURES

INDEX DES FIGURES

Figure 1 : L'enveloppe nucléaire d'après Voeltz et al. (Voeltz et al., 2002)	23
Figure 2: Les produits du gène LMNA d'après Anne T. Bertrand et al. 2011 (Bertrand et al., 2011).....	25
Figure 3 : Expression de la lamine au cours de l'évolution d'après Dittmer et Mistelli 2011 (Dittmer and Misteli, 2011).....	26
Figure 4 : Structure de la lamine d'après Broers et al. (Broers et al., 2006).....	29
Figure 5 : Modifications post-traductionnelles de la prélamine A et des lamines de type B d'après Worman et collaborateurs (Worman et al., 2009).	31
Figure 6 : Assemblage des lamines de type A et B d'après Ben-Harush et al.(Ben-Harush et al., 2009).....	32
Figure 7 : Phénotypes tissus-spécifiques causés par des mutations dans le gène <i>LMNA</i> , d'après Dauer et Worman (Dauer and Worman, 2009).	35
Figure 8 : Correlation génotype-phénotype dans les laminopathies d'après Worman et al. 2010 (Worman et al., 2010).	40
Figure 9 : Interactions de la lamine avec les protéines de la membrane nucléaire interne, d'après Worman et al. 2009 (Worman et al., 2009).....	45
Figure 10 : Organisation du pore nucléaire d'après Perez-terzic et al. (Perez-Terzic et al., 2003).....	46

INDEX DES FIGURES

Figure 11 : Les facteurs de transcription et les protéines interagissant avec la lamine dans le noyau d'après Vigouroux et al. (Vigouroux, 2005)	48
Figure 12: La voie Wnt/ β -caténine d'après Andres et Gonzales 2009 (Andres and Gonzalez, 2009).....	51
Figure 13: La voie du TGF β d'après Andrès et Gonzalèz 2009 (Andres and Gonzalez, 2009).....	52
Figure 14 : Les différents rôles de la lamine dans l'architecture nucléaire (Dittmer and Misteli, 2011)	55
Figure 15 : La polarisation dans l'embryon de mammifère (Fujimori, 2010).	60
Figure 16 : La spécification du trophoctoderme dans l'embryon de mammifère (Cockburn and Rossant, 2010).....	62
Figure 17 : Formation du second lignage (Cockburn and Rossant, 2010).....	64
Figure 18 : La phase de préimplantation dans l'embryon de mammifère d'après Cockburn et Rossant (Cockburn and Rossant, 2010)	65
Figure 19 : La gastrulation d'après Liu et Foley 2010 (Liu and Foley, 2010).....	67
Figure 20 : Morphogénèse du cœur de souris d'après Buckingham. et coll (Buckingham et al., 2005).....	69
Figure 21 : Origine et régulation des progéniteurs cardiaques d'après S.Vincent et M.Buckingham (Vincent and Buckingham, 2010)	70
Figure 22 : Les réseaux de régulation cardiaque d'après Blin et al. (Blin et al., 2010).....	73

INDEX DES FIGURES

Figure 23 : La voie Wnt d'après Gessert et Kühl (Gessert and Kuhl, 2010).....	75
Figure 24 : Origine des cellules souches.....	82
Figure 25 : La voie LIF/STAT3 et le contrôle de la pluripotence dans les CSEm d'après Hirai et al. 2011 (Hirai et al., 2011) et Chen et al. (Chen et al., 2008)	83
Figure 26: Origine des cellules souches pluripotentes d'après Hanna et al. 2010 (Hanna et al., 2010b).....	85
Figure 27: La pluripotence et la différenciation dans les CSE et iPS D'après Pera et Tam 2010 (Pera and Tam, 2010).....	89
Figure 28: Création d'iPS pour des applications médicales modifiée d'après Blin et Al. 2009 (Blin et al., 2009).....	92
Figure 29 : Les gènes impliqués dans la différenciation cardiaque d'après Murry et Laflamme (Laflamme and Murry, 2012).....	97
Figure 30 : Vue d'ensemble des différents protocoles existants pour la différenciation cardiaque des cellules pluripotentes humaines d'après Mummery et al. (Mummery et al., 2012).....	100
Figure 31 : Plasmide pEGFPC1/hLMNA (Favreau et al., 2004).....	110
Figure 32 : Plasmide pEGFP-C1/hLMNA/Promoteur α -Actine Cardiaque	111
Figure 33: Pluripotence des CSEm.	121
Figure 34: Expression des lamines dans les CSEm pluripotentes	122

INDEX DES FIGURES

Figure 35 : Expression des lamines de type A dans des CEs à 12 jours de différenciation...	123
Figure 36 : Western Blot de l'apparition de la lamine au cours de la différenciation.....	124
Figure 37: Activité contractile des corps embryoïdes <i>Imna</i> ^{+/+} et <i>Imna</i> ^{+/H222P}	125
Figure 38: Différences morphologiques entre les CEs de type sauvage <i>Imna</i> ^{+/+} et les CEs de type muté <i>Imna</i> ^{+/H222P} au jour 5 de différenciation.....	127
Figure 39 : Expression des gènes cardiaques dans les CE sauvages et mutés au cours de la différenciation.	129
Figure 40 : Immunofluorescence sur les clones sauvages et mutés <i>Imna</i> ^{+/h222P} contre l'alpha actinine.	130
Figure 41: Introduction du gène de la lamine sauvage sous le promoteur de l'alpha actine cardiaque dans les clones porteurs de la mutation <i>Imna</i> ^{+/H222P} , effets sur la morphologie et la contractilité des clones.	133
Figure 42 : Expression des gènes cardiaques dans les CEs au cours de la différenciation	134
Figure 43 : Immunofluorescences contre les protéines Nkx2.5 (A), Isl1 (B), Mef2C (C) et Alpha actinine (D).....	136
Figure 44: Expression des gènes du mésendodermE, endoderme et ectoderme dans les clones sauvages, porteurs de la mutation H222P et corrigés.....	138
Figure 45: Immunofluorescence sur les différents clones IPs contre les gènes SSEA4 et Oct4.	140

INDEX DES FIGURES

Figure 46: Expression des lamines de type A dans les iPS pluripotentes et après 4 jours de différenciation au BMP2	141
Figure 47: Formation de CE à partir d'iPS pluripotentes	142
Figure 48 : Expression des facteurs de pluripotence Nanog et Oct4 au cours de la différenciation	143
Figure 49: Expression génique des différents clones IPS après 4 jours de différenciation au BMP2	144
Figure 50 : Expression du facteur de transcription Brachyury (T) dans les clones IPS après 7 jours de traitement au BMP2.....	145
Figure 51: Expression du facteur de transcription Sox17 dans les clones IPS après 7jours de traitement au BMP2.	146
Figure 52: Expression du facteur de transcription Isl1 dans les clones IPS après 7jours de traitement au BMP2.	147
Figure 53 : Induction du mésendoderme par les facteurs Wnt3a et BMP2.....	149
Figure 54 : Effet de la mutation sur la différenciation cardiaque des cellules souches pluripotentes (CSP).	154
Figure 55 : La voie de signalisation du TGF β d'après Wharton et Derynck (Wharton and Derynck, 2009).....	156
Figure 56: La lamine et ses interactions avec la chromatine d'après Dechat et al. 2008 (Dechat et al., 2008).....	158

INDEX DES FIGURES

Figure 57 : Marques épigénétiques défectueuses dans les cellules KO LEK1 d'après Julia Leschik.....	159
Figure 58: La Dystrophie Musculaire d'Emery Dreifuss : conséquences sur la fonction cellulaire cardiaque	161

AVANT-PROPOS

AVANT PROPOS

Les laminopathies représentent un groupe de maladies génétiques rares dues à des mutations du gène *LMNA* codant pour les lamines de type A. Plus de 400 mutations de ce gène sont connues aujourd'hui, entraînant l'apparition de troubles musculaires, cardiaques, neurologiques, osseux ou cutanés ayant pour conséquence un vieillissement accéléré à l'échelle du tissu affecté, ou encore de l'individu. La découverte récente de l'origine de ce groupe de maladies rares a permis de nombreuses études sur le gène *LMNA*, la communauté scientifique montrant un intérêt grandissant pour ces recherches.

Les lamines de type A sont des protéines ayant un rôle de maintien de la structure nucléaire. Elles s'associent entre elles pour former la lamina. Si cette structure est mal formée à cause d'une mutation, la forme du noyau est affectée et certaines fonctions cellulaires seront mal assurées. Parmi ces fonctions, les lamines de type A jouent un rôle majeur dans la régulation de la transcription, la réplication, ainsi qu'au niveau de la fonction et du positionnement des pores nucléaires (Hutchison, 2002). Un défaut de production de ces protéines entraîne notamment de graves troubles cardiaques, et c'est cette partie que nous avons choisi d'étudier.

Mon travail est centré sur une mutation située dans l'exon 4, conduisant à la substitution de l'histidine en position 222 par une proline (H222P). Cette mutation donne lieu à une maladie nommée la Dystrophie Musculaire d'Emery Dreifuss Autosomale Dominante (DMED-AD). Les patients atteints par cette maladie présentent des raideurs au niveau des coudes, du cou et des tendons d'Achille, une faiblesse musculaire et une atteinte cardiaque. Un modèle murin pour cette mutation a été créé, développant une dystrophie musculaire et une cardiomyopathie dilatée similaires à ce qui est observé chez les patients atteints de DMED-AD (Arimura et al., 2005).

Afin de modéliser cette maladie, nous utilisons au laboratoire deux types de cellules : les cellules souches embryonnaires et les iPS (induced Pluripotent Stem cells). Ces cellules sont

AVANT-PROPOS

pluripotentes en culture (Smith A, 2001) et représentent un excellent modèle pour étudier les maladies génétiques comme les laminopathies. En effet, les cellules souches pluripotentes, (comme les cellules souches murines et les cellules souches induites à la pluripotence) sont capables de récapituler toutes les étapes du développement d'une maladie et ainsi permettent de mieux en comprendre les mécanismes moléculaires en jeu. Le modèle des iPS présente en plus l'avantage de provenir de fibroblastes de patients reprogrammés, évitant les biais provoqués par l'insertion par génie génétique d'une mutation dans une cellule souche humaine.

INTRODUCTION

INTRODUCTION

1. Les lamines, des protéines majeures de la cellule :

1.1 L'enveloppe nucléaire et les lamines

Le noyau de la cellule eucaryote est fonctionnellement et structurellement organisé en différents sous-compartiments. Parmi ceux-ci, l'enveloppe nucléaire (EN) sépare les activités nucléaires et cytoplasmiques dans la cellule. Elle est composée de deux membranes nucléaires concentriques, interne (MNI) et externe (MNE), des pores nucléaires (CPN pour complexes des Pores Nucléaires), insérés dans cette double membrane, permettant les échanges nucléo-cytoplasmiques. Ces structures sont ancrées dans la MNI et la MNE qui sont séparées par le lumen. La membrane nucléaire externe forme un continuum avec le réticulum endoplasmique (RE) et est fusionnée avec la MNI à l'endroit d'insertion des pores nucléaires (Figure 1).

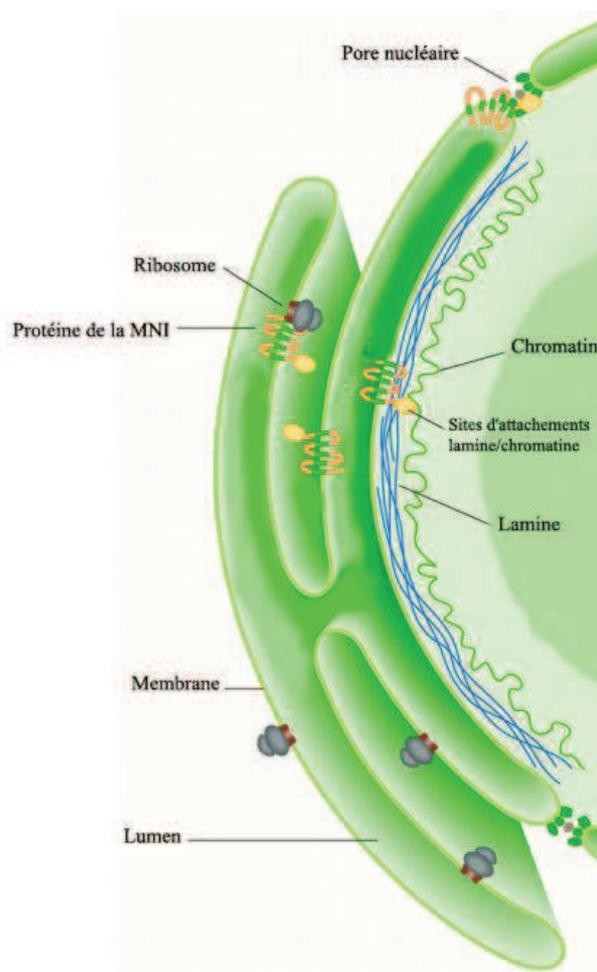


FIGURE 1 : L'ENVELOPPE NUCLEAIRE D'APRES VOELTZ ET AL. (VOELTZ ET AL., 2002)

La lamina nucléaire tapisse l'intérieur de l'enveloppe nucléaire et permet de procurer au noyau une bonne stabilité. Elle possède de nombreuses fonctions dans le noyau et agit notamment sur le positionnement et l'organisation des pores nucléaires, la structure de la

INTRODUCTION

chromatine, l'assemblage et le désassemblage de l'EN durant la mitose, la réplication et la réparation de l'ADN, la progression du cycle cellulaire, la différenciation et le contrôle de la transcription.

1.1.1 Présentation des lamines

La lamina nucléaire est constituée d'un entremêlement de filaments intermédiaires connus sous le nom de lamines, localisés et étroitement associés avec la MNI qui assurent une stabilité mécanique au noyau (McKeon et al., 1986). Son épaisseur sous la MNI peut varier entre 10 et 20 nm selon le type cellulaire (Cohen and Sundeen, 1976). Il existe deux types de lamines : les lamines de type A et les lamines de type B. Contrairement aux lamines de type B, les lamines de type A sont aussi retrouvées à l'intérieur du noyau, dans le nucléoplasme (Bridger et al., 1993).

La lamina nucléaire a été définie en 1956 dans une étude structurale de Pappas GD comme un composant fibreux du noyau, résistant aux sels et aux détergents (Pappas, 1956a; Pappas, 1956b). En étudiant les sous-fractions de noyaux de foie de rats, les expérimentateurs ont mis en évidence une structure complexe permettant de lier les pores nucléaires entre eux (Dwyer and Blobel, 1976). Les études biochimiques et immunohistologiques ont révélé que la lamina nucléaire était composée de deux protéines majeures et plusieurs protéines mineures (Gerace et al., 1978). Les composants majeurs de la lamina nucléaire sont des polypeptides migrant entre 65 et 70kDa au cours d'une électrophorèse en gel SDS-polyacrylamide (Gerace and Blobel, 1980) : les lamines de type A et de type B.

La recherche sur les lamines nucléaires a connu un réel essor durant cette dernière décennie, ce domaine étant auparavant réservé à un petit groupe de biologistes cellulaires travaillant sur la mitose et la structure nucléaire (Worman et al., 2009). En effet, le nombre de publications contenant le mot clé « lamin » a doublé dans la base de recherche Pubmed au cours des dix dernières années.

INTRODUCTION

Chez l'homme, les lamines sont codées par 3 gènes différents : les gènes *LMNA*, *LMNB1* et *LMNB2*. Le gène *LMNA*, codant pour la lamine A et la lamine C principalement (Lin and Worman, 1993), fut caractérisé en 1993. Il contient 12 exons et a une masse de 57.6kb. Il est situé sur le chromosome 1q21.2-q21 (Lin and Worman, 1993) chez l'homme et sur le chromosome 3F1 chez la souris.

Ces lamines sont produites par épissage alternatif du pré-ARNm transcrit du gène *lmna* et les 566 premiers acides aminés (aa) de ces deux protéines sont identiques. La lamine C possède 6 acides aminés uniques dans sa partie C-terminale, tandis que la prélamine A, définie comme étant le précurseur de la lamine A en possède 98 (Fisher et al., 1986). La prélamine A va ensuite subir une série de modifications post-traductionnelles pour former la lamine A mature (Figure 2).

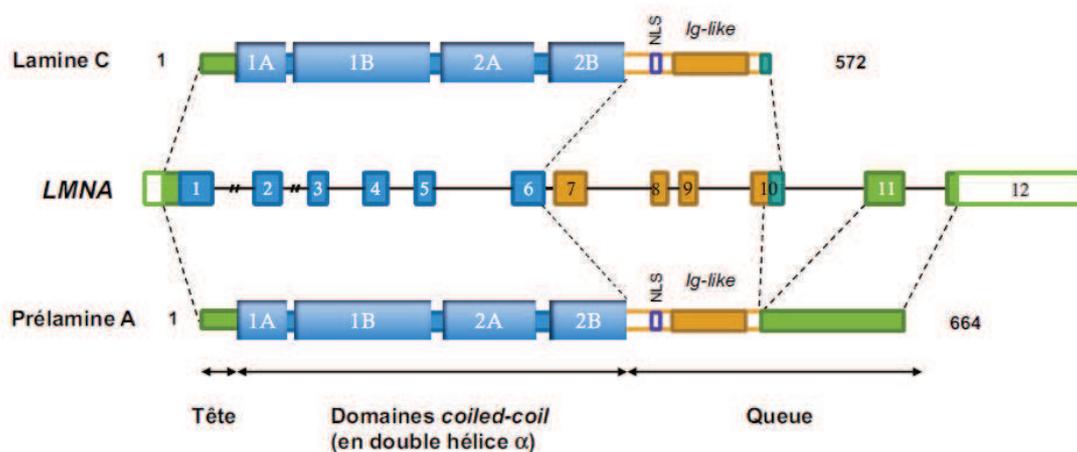


FIGURE 2: LES PRODUITS DU GENE LMNA D'APRES ANNE T. BERTRAND ET AL. 2011 (BERTRAND ET AL., 2011).

L'épissage alternatif du gène LNMA donne naissance à deux types de protéines : la prélamine A, de 664aa, et la lamine C, de 572aa

Les lamines de type B sont codées par le gène *LMNB1* localisé sur le chromosome 5q23-q31.1 et *LMNB2* sur le chromosome 19p13.3 (Biamonti et al., 1992; Lin and Worman, 1993) codants respectivement les lamines B1 et B2 exprimées dans presque tous les types de

INTRODUCTION

cellules somatiques. Ce type de lamine est essentiel pour la viabilité et le développement cellulaire (Vergnes et al., 2004).

Outre ces grands types principaux de lamines, on peut aussi noter la présence de la lamine B3, codée par le gène *LMNB2*, exprimée uniquement dans les cellules germinales par épissage alternatif, tout comme la lamine C2 (Furukawa and Hotta, 1993), et la lamine AΔ10, très peu étudiées (Machiels et al., 1996), ces deux dernières étant codées par le gène *LMNA*.

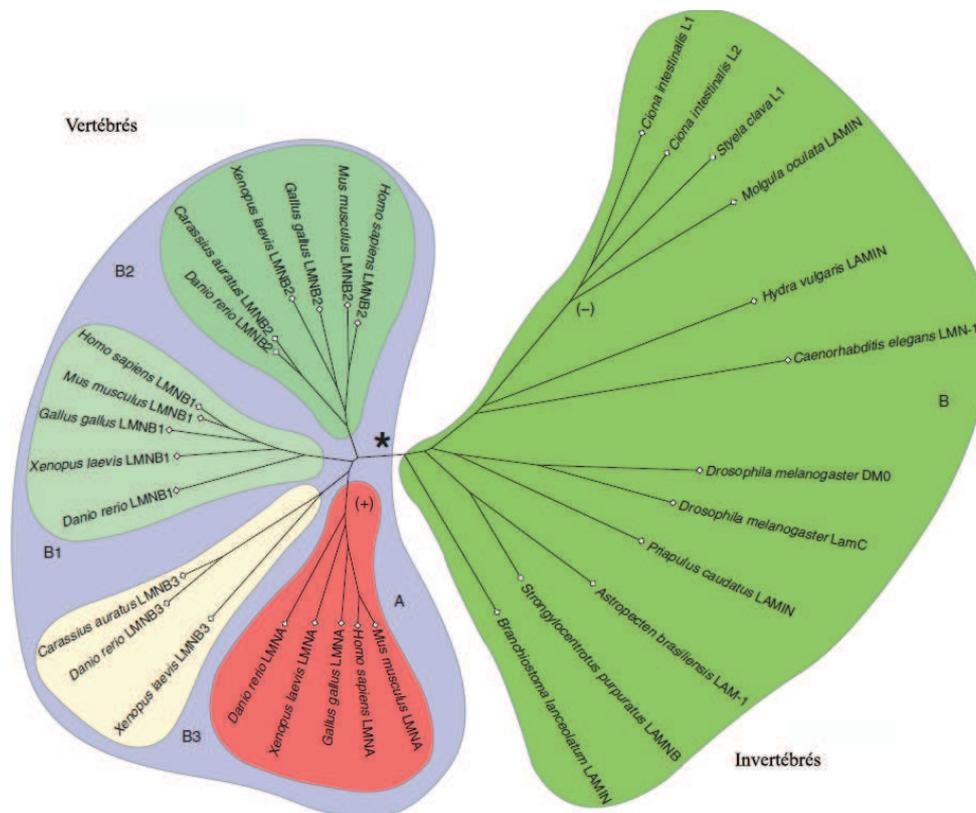


FIGURE 3 : EXPRESSION DE LA LAMINE AU COURS DE L'ÉVOLUTION D'APRÈS DITTMER ET MISTELLI 2011 (DITTMER AND MISTELLI, 2011).

La lamine de type B est exprimée chez tous les invertébrés. Chez les vertébrés, elle est ensuite divisée en 3 grands types : B1, B2 et B. La lamine de type A, quand à elle, est exprimée uniquement chez les vertébrés.

L'expression de lamines est retrouvée dans tous les types cellulaires chez les métazoaires mais n'est pas présente chez les levures, les autres organismes unicellulaires et les plantes (Melcer et al., 2007). Les lamines de type A apparaissent dans l'évolution à partir du poisson-zèbre, les organismes les plus primitifs ne possédant que les lamines de type B.

INTRODUCTION

Une exception existe cependant avec la drosophile qui possède une lamine de type B (lamin DmO) et la lamine C (Figure 3).

Les lamines de type A ne sont pas exprimées dans les cellules indifférenciées (Constantinescu et al., 2006; Rober et al., 1989) contrairement aux lamines de type B qui sont exprimées durant toute la vie embryonnaire. Les lamines de type A commencent à être exprimées à partir des jours 10-12 dans l'embryon de souris (Rober et al., 1989; Stewart and Burke, 1987). Les lamines de type A et B sont ensuite exprimées dans tous les types de cellules adultes, à l'exception des lymphocytes B et T qui ne possèdent que les lamines B (Adam and Goldman, 2011).

1.1.2 Structure des lamines : un filament intermédiaire pas comme les autres ?

Le modèle de l'oocyte de *xénope* a permis de démontrer que les lamines formaient des filaments ayant les mêmes dimensions que les filaments intermédiaires (Aebi et al., 1986; Fisher et al., 1986; Goldman et al., 1986). Ces filaments intermédiaires (FI) forment une famille de protéines comprenant plus de 70 membres divisés en 5 groupes (type I-V) et sont impliqués dans divers processus allant du développement au vieillissement cellulaire, de l'homéostasie aux contraintes mécaniques cellulaires (Lazarides, 1980) (Tableau 1). Ils constituent un réseau d'extension du cytosquelette qui s'étend à partir de l'enveloppe nucléaire dans tout le cytoplasme des cellules eucaryotes (Pallari and Eriksson, 2006). Ces structures sont régulées par des modifications post-traductionnelles, notamment au niveau de la tête globulaire et la queue, permettant de moduler leur assemblage, leur fonction et leur signalisation. Les lamines constituent à elles seules la famille des filaments intermédiaires de type V.

Tous les FI partagent des structures communes, très conservées au cours de l'évolution :

- Une tête globulaire N-Terminale

INTRODUCTION

- Un domaine central en tige
- Une queue globulaire C-Terminale

Type de FI	Tissu d'expression	Mode d'expression	Phénotype lors d'une mutation ou une perturbation d'expression	Références
Type I et II : Kératines	Epithélium	Hétérodimères : Type 1 et 2	Maladies de la peau et/ou du foie	(Ku et al., 2007; Uitto et al., 2007)
Type III : Vimentine, desmine, GFAP et périphérine	Vimentine : Tissu mésenchymateux Desmine : muscle	Homodimères	Desmine : cardiomyopathie GFAP et périphérine : cruciales pour le fonctionnement du système nerveux	(Capetanaki, 2000) (Hyder et al., 2008; Pallari and Eriksson, 2006) (Barclay et al., 2010) (Messing and Brenner, 2003)
Type IV : Neurofilaments, nestine, α -internexine, synemine et syncoiline	Système nerveux	Lourdes Moyennes Légères	Accumulation anormale de ces fibres	(Barry et al., 2007)
Type V : Lamines	Ubiquitaire	Homodimères	Laminopathies	(Worman and Bonne, 2007)
Type VI : Bsfp1 et Bsfp2	Cristallin	Homodimères	Désorganisation de l'architecture du cristallin et de ses propriétés optiques	(Song et al., 2009)

TABLEAU 1: LES SOUS TYPES DE FILAMENTS INTERMEDIAIRES ET LEURS CARACTERISTIQUES D'APRES HYDER ET AL. ET HUTCHISON ET AL. (HYDER ET AL., 2011; HUTCHISON, 2002).

INTRODUCTION

La famille des FI est constituée de protéines cytoplasmiques, à l'exception des lamines qui sont concentrées dans le noyau (Vassar et al., 1991). Tous les filaments intermédiaires proviendraient d'un progéniteur commun, ressemblant aux lamines (Dittmer and Misteli, 2011) (Figure 3). Les lamines possèdent 42 acides aminés supplémentaires, dans leur domaine central au cœur de leur hélice 1B et une tête globulaire plus courte (Figure 4), à la différence des filaments intermédiaires présents dans le cytoplasme (Hutchison and Worman, 2004). De plus, le domaine en queue des lamines possède un signal de localisation nucléaire (SLN), ainsi qu'un domaine de type immunoglobuline, situé à côté (Dhe-Paganon et al., 2002). Les lamines contiennent des sites consensus pour des protéines kinases actives dans le cycle mitotique, la phosphorylation de ces sites permettant le désassemblage de la lamina nucléaire au cours de la mitose (Nigg, 1992).

Au cours de la mitose, les lamines se désassemblent et l'on peut alors observer deux types de polypeptides : les lamines A et C de masse moléculaire respective de 70 et 65 kDa, qui sont alors dissoutes librement dans la cellule et les lamines B1 et B2 ayant une masse moléculaire de 67 et 68kDa, mais qui cette fois restent accrochées à la membrane nucléaire (Broers et al., 2006).

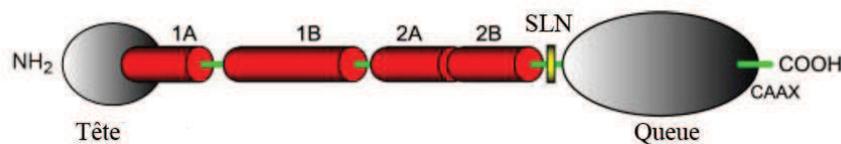


FIGURE 4 : STRUCTURE DE LA LAMINE D'APRES BROERS ET AL. (BROERS ET AL., 2006)
La lamine A possède une tête et une queue globulaire ainsi que 4 domaines centraux 1A, 1B, 2A et 2B mais aussi un signal de localisation nucléaire (SLN), lui permettant son adressage au noyau.

La plupart des lamines, à l'exception des lamines de type C, possèdent un domaine d'acides aminés au niveau de leur extrémité C-terminale, constituant un motif particulier CaaX, où C est une cystéine, a un acide aminé aliphatique (apolaire, hydrophobe), et X, n'importe quel acide aminé. Ce domaine permet d'initier des réactions enzymatiques comme la farnésylation ou la carboxyméthylation de la cystéine et le clivage endoprotéolytique du

INTRODUCTION

résidu -aaX (Rusinol and Sinensky, 2006) (Figure 4). Les domaines centraux des lamines sont composés de 4 segments constitués d'hélices α -enroulées, appelés 1A, 1B, 2A et 2B. Ces domaines sont constitués d'une succession d'heptapeptides (Parry et al., 1986).

1.1.3 Régulation et assemblage des lamines

Les lamines subissent des modifications post-traductionnelles, comme la farnésylation, une forme de prénylation qui consiste en l'ajout de 15 résidus sur leur partie C-terminale par une farnésyltransférase (FTase) (Clarke, 1992). Les lamines, après leur farnésylation, subissent un clivage des 3 derniers résidus de leur domaine C-terminal (-aaX) par une endoprotéase spécifique: RCE1 pour les lamines de type B, (Maske et al., 2003) et RCE1 ou ZMPSTE24 pour la prélamine A (Corrigan et al., 2005) (Figure 5). Les lamines de type B et la prélamine A sont ensuite méthylées par une enzyme nommée ICMT (Dai et al., 1998).

La prélamine A, contrairement aux lamines de type B, subit ensuite une dernière modification post-traductionnelle par la ZPSTE 24 dans la MNI, qui va cliver les 15 derniers acides aminés de la prélamine A (Pendas et al., 2002). La lamine A ou lamine C mature n'est plus farnésylée lorsqu'elle entre dans la lamina (Davies et al., 2009), ce qui peut expliquer qu'elle soit moins étroitement et moins fortement liée à la membrane que les lamines. Cela peut aussi expliquer que l'on retrouve 5 à 10% de ce type de lamine dans la partie intérieure du noyau et pas seulement à la membrane (Vlcek and Foisner, 2007). De plus, cette modification permettrait à la prélamine A d'être plus hydrophobe afin de pénétrer plus facilement dans la MNI (Holtz et al., 1989).

En effet, dans une revue parue en 2009, Worman et ses collaborateurs soulèvent l'hypothèse que la farnésylation et la méthylation augmenteraient l'hydrophobicité des peptides (Worman et al., 2009). C'est alors dans la membrane nucléaire interne que prélamine A subirait le clivage par la ZMPSTE24 bien que l'on retrouve cette enzyme dans le RE (Barrowman et al., 2008).

INTRODUCTION

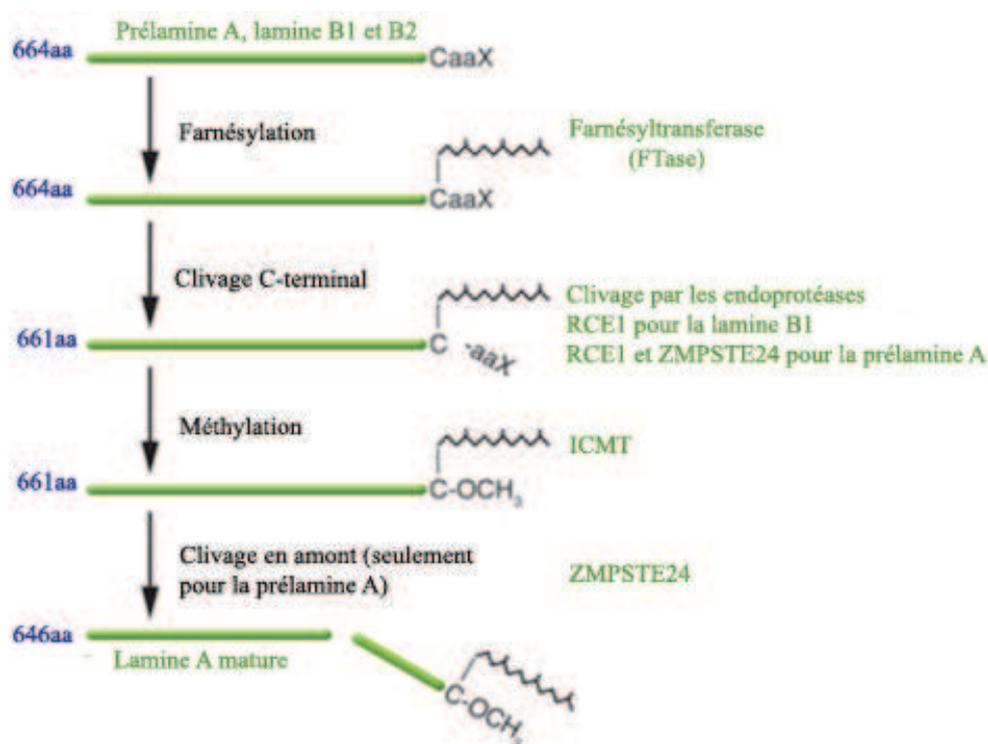


FIGURE 5 : MODIFICATIONS POST-TRADUCTIONNELLES DE LA PRELAMINE A ET DES LAMINES DE TYPE B D'APRES WORMAN ET COLLABORATEURS (WORMAN ET AL., 2009).

Les lamines subissent d'abord une farnésylation par la farnésyltransférase (FTase) avec d'être clivées dans leur partie C-terminales par la RCE ou ZMPSTE24, cette dernière étant spécifique de la prélamine A. Ces protéines sont ensuite méthylées par l'ICMT. Par la suite, a prélamine A va être clivée par la ZMPSTE24 pour former la lamine A mature.

Les lamines de type A s'assemblent et se désassemblent selon leur degré de phosphorylation au début de la mitose (Fields and Thompson, 1995). Pendant la mitose, la membrane nucléaire interne perd sa structure et ses protéines sont alors résorbées dans le réticulum endoplasmique (RE) (Ellenberg et al., 1997). Après leur déphosphorylation, les lamines (Gerace and Blobel, 1980) se retrouvent incorporées aux noyaux des cellules-filles pendant la transition télophase/Phase G1 (Moir et al., 2000). A la fin de la mitose, l'enveloppe nucléaire et la lamina nucléaire s'assemblent en plusieurs étapes, avec l'adressage des protéines de la MNI avec la chromatine, suivi d'un assemblage des pores nucléaires puis de la polymérisation de la lamine (Chaudhary and Courvalin, 1993). Contrairement aux lamines de

INTRODUCTION

type B qui restent associées à la membrane nucléaire, les lamines de type A s'accumulent dans le nucléoplasme de la fin de la mitose jusqu'au début de la phase G1 (Bridger et al., 1993).

La microscopie électronique a permis de mieux comprendre l'assemblage et le désassemblage des lamines *in vitro*. Une étude chez *C. Elegans* a permis de mettre en évidence que les monomères de lamines de type A et B s'assemblent par leur domaines centraux pour former des dimères (Figure 6A et B). Ces dimères possèdent à leurs extrémités deux domaines globulaires étroitement compactés et polarisés (voir les flèches sur la figure 6 pour le sens de la polarité), interagissant de manière antiparallèle (Figure 6C et D) (Ben-Harush et al., 2009). Ils s'associent ensuite pour former des polymères assemblés dans un motif de type « tête-à-queue » puis peuvent ensuite s'associer latéralement et former des filaments de lamines et des fibres paracrystallines dans des conditions de hautes forces ioniques (Figure 6E) (Karabinos et al., 2003).

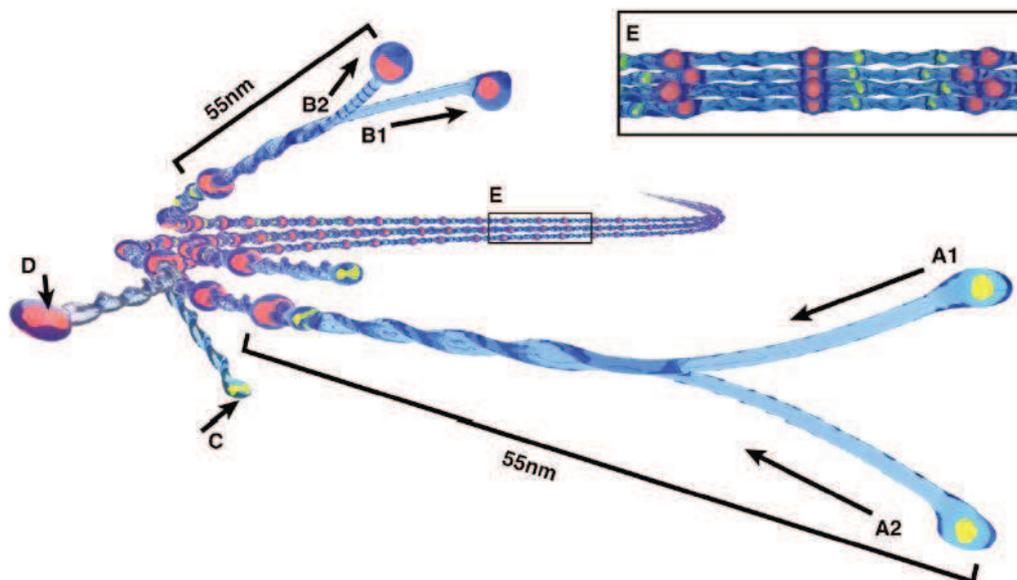


FIGURE 6 : ASSEMBLAGE DES LAMINES DE TYPE A ET B D'APRES BEN-HARUSH ET AL.(BEN-HARUSH ET AL., 2009).

Les polypeptides de lamines s'assemblent sous forme de dimères et s'associent ensuite longitudinalement pour former une structure polaire en tête à queue. Ces structures d'assemblent ensuite de manière anti parallèle pour former des protofilaments, qui s'assemblent par 3 ou 4 afin de former les filaments de lamines

INTRODUCTION

1.2 Les laminopathies : un gène pour différents types de maladies

1.2.1 La découverte des laminopathies

Les laminopathies représentent un groupe de maladies humaines qui sont associées avec des mutations dans les gènes codant pour les protéines de la lamina nucléaire (*LMNA*, *LMNB1* et *LMNB2*), des protéines associées avec le processus de maturation de la lamine après la transcription comme ZMPSTE24, ou encore des protéines interagissant avec les lamines comme l'émerine, LAP2, LBR, MAN-1, Nesprin-1. Ce type de pathologie est très rare et il y a, à ce jour environ 2000 patients connus (<http://www.umd.be/LMNA/>).

La première maladie causée par des mutations dans le gène *LMNA* identifiée par clonage positionnel chez l'homme fut la dystrophie musculaire d'Emery Dreifuss de type autosomale dominante (DMED-AD), découverte par l'équipe de Ketty Schwartz en 1999 (Bonne et al., 1999). Peu de temps après, de nouvelles mutations responsables de la DMED-AD furent découvertes (Raffaele Di Barletta et al., 2000) ainsi que des mutations responsables d'autres maladies telles que la cardiomyopathie dilatée de type 1A (CD1A) (Fatkin et al., 1999) mais aussi la dystrophie musculaire des ceintures de type 1B (DMC1B) (Becane et al., 2000). C'est en 2000 que l'on découvrit que les laminopathies ne provoquaient pas seulement des maladies des muscles striés mais aussi des lipodystrophies. C'est de cette manière que les laminopathies devinrent des maladies affectant différents tissus avec la découverte d'un locus en 1q21-22 causant la lipodystrophie partielle familiale de Dunnigan (LPFD); provoquant une désorganisation du tissu sous cutané adipeux (Barker et al., 2010; Jackson et al., 1998). Sachant que le locus du gène responsable de cette lipodystrophie était situé sur le chromosome 1q21-22 tout comme l'DMED-AD, Cao et Hegele formulèrent l'hypothèse qu'il pourrait y avoir un gène commun entre ces deux maladies. Le gène *LMNA* se révéla un candidat idéal. Ils identifièrent une autre mutation sur l'exon 8 résultant d'une substitution R482Q qui correspondait aux phénotypes de lipodystrophie dans 5 familles canadiennes (Hegele et al., 2006).

INTRODUCTION

Les avancées dans le domaine montraient alors clairement deux types de maladies dues à des mutations dans le gène de la lamine : les lipodystrophies partielles et les maladies affectant le muscle strié. Mais l'équipe de Nicolas Lévy permis de mettre en exergue la complexité de cette maladie en 2002 ; découvrant une forme autosomale récessive de la maladie de Charcot Marie Tooth 2 (CMT2) située sur le chromosome 1q21.2-q21.3 découlant d'une substitution R298C (De Sandre-Giovannoli et al., 2002). C'est plus tard au cours de cette même année que l'équipe de Novelli formula l'hypothèse que des mutations dans le gène *LMNA* pouvaient causer la Dysplasie Mandibulo-Acrale (DMA) (Capanni et al., 2010).

Enfin, alors que la Progéria d'Hutchison Gilford (PHG) fut décrite il y a plus d'un siècle (Gilford, 1904; Hutchinson, 1886), c'est la même année, en 2003, que les équipes de Francis Collins et celle de Nicolas Lévy, identifièrent encore une fois le gène *LMNA* comme responsable de la pathologie (De Sandre-Giovannoli et al., 2003; Eriksson et al., 2003).

Ces études génétiques ont permis de démontrer depuis à peine plus de 10 ans que des mutations dans le gène *LMNA* sont responsables d'une douzaine de tableaux cliniques. Bien que les lamines A/C soient exprimées de manière ubiquitaire, les phénotypes liés à ces mutations sont spécifiques à différents tissus. De même, des mutations retrouvées dans les gènes codant pour les lamines de type B ou pour des protéines associées aux lamines, bien qu'exprimées dans la plupart des cellules somatiques différenciées, seront associées à un tissu particulier (Figure 7).

Aujourd'hui, on compte plus de 400 types de mutations dans le gène de la lamine regroupées en 10 types de pathologies (<http://www.umd.be/LMNA/>).

INTRODUCTION

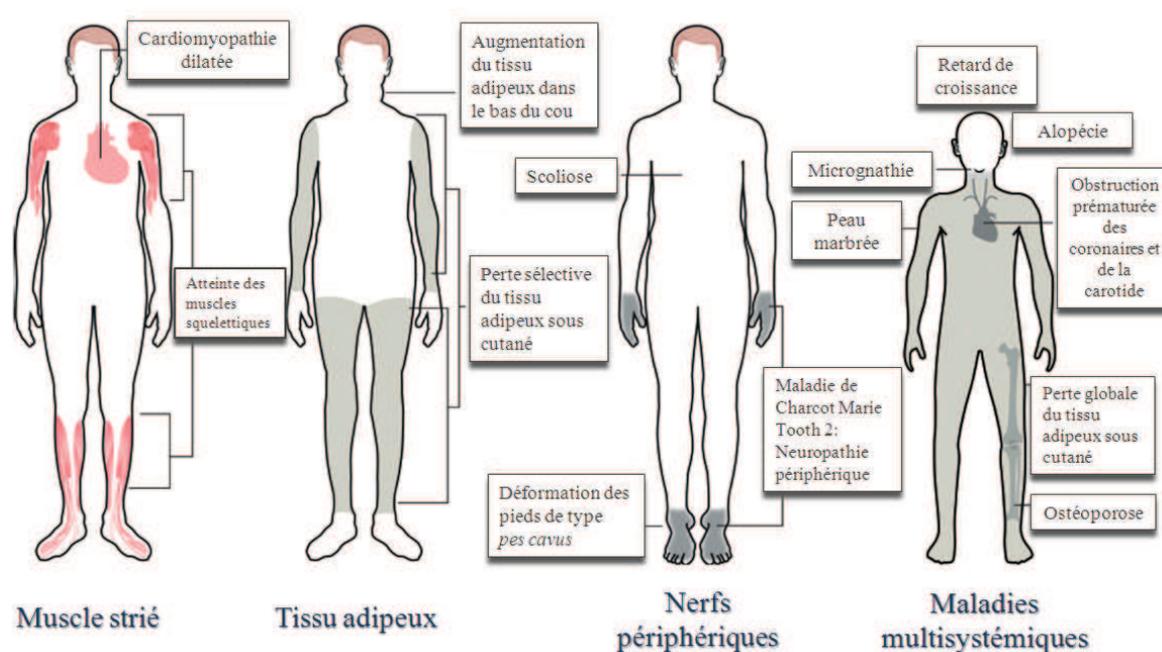


FIGURE 7 : PHENOTYPES TISSUS-SPECIFIQUES CAUSES PAR DES MUTATIONS DANS LE GENE *LMNA*, D'APRES DAUER ET WORMAN (DAUER AND WORMAN, 2009).

Les phénotypes spécifiques causés par des mutations dans le gène *LMNA* peuvent se regrouper en 4 grands groupes : Les maladies affectant le muscle strié, le tissu adipeux, les nerfs périphériques ou encore les maladies multisystémiques.

1.2.2 Les laminopathies causées par les lamines de type A :

Les laminopathies peuvent se diviser en 4 grands groupes de pathologies, en fonction du phénotype observé chez les patients : les laminopathies du muscle strié, du tissu adipeux, des nerfs périphériques mais aussi des maladies multisystémiques résultant en un vieillissement accéléré de l'individu. Certaines des pathologies présentées ci-dessous appartiennent à plusieurs groupes (Figure 7).

1.2.2.1 Les laminopathies du muscle strié

La plupart des laminopathies causées par le gène *LMNA* affectent le muscle cardiaque, sous la forme d'une cardiomyopathie dilatée. Cette cardiomyopathie est caractérisée par un élargissement des chambres et une dysfonction systolique d'un seul ou des deux ventricules, avec un bloc de conduction auriculo-ventriculaire précoce (Bonne et al., 1999).

INTRODUCTION

1.2.2.1.1 La dystrophie musculaire d'Emery Dreifuss

Il existe deux types de Dystrophies Musculaires d'Emery-Dreifuss : celles liées au gène *LMNA* situé sur le chromosome 1q21.2-q21.3, transmises de manière autosomale, dominante, (OMIM #181350) ou récessive (Raffaele Di Barletta et al., 2000) et celles liées aux mutations du gène *EMD*, codant pour l'émerine, situé sur le chromosome X (OMIM #310300). (Bione et al., 1994).

La mutation étudiée tout au long de ce travail de thèse est liée à l'DMED autosomale dominante et il sera exposé à la fin de ce chapitre les particularités pathologiques.

1.2.2.1.2 La cardiomyopathie dilatée de type 1A

La cardiomyopathie dilatée est à l'origine de plus de 10000 décès par an aux Etats-Unis, et présente une grande hétérogénéité clinique avec des mutations dans une 30^{aine} de gènes, en ce qui concerne les formes familiales. 7.5% des cas de cardiomyopathies dilatées sont dus à une mutation dans le gène *LMNA* (Taylor et al., 2003). Cette maladie a été décrite pour la première fois en 1961 (Whitfield, 1961). Cette cardiomyopathie dilatée est due à une mutation hétérozygote du gène *LMNA* et présente un phénotype comprenant une dilatation cardiaque accompagnée d'une fonction systolique réduite et d'un bloc de conduction auriculo-ventriculaire (OMIM#115200). Les crises cardiaques et morts subites arrivent fréquemment dans ces familles (Fatkin et al., 1999), mais l'implantation d'un défibrillateur permet de diminuer le risque de morts subites. La plupart des patients décèdent vers l'âge de 60 ans.

Un modèle murin pour cette pathologie a permis de mettre en évidence une désorganisation des sarcomères et des disques intercalaires, soulevant l'hypothèse que les mutations du gène *LMNA* pouvaient causer une cardiomyopathie en désorganisant la structure du sarcomère ou en altérant l'expression génique des facteurs de transcription essentiels au développement cardiaque (Mounkes et al., 2005). Contrairement à la Dystrophie Musculaire d'Emery Dreifuss, le muscle squelettique n'est pas affecté.

INTRODUCTION

1.2.2.1.3 Le syndrome « Cœur-main » de type Slovène

Ce syndrome a été rapporté en 2005 (Sinkovec et al., 2005) (OMIM#610140) dans une famille slovène présentant des problèmes de conduction ainsi que des doigts et des pieds très courts. Il a été observé plus tard sur ces patients une myopathie (Renou et al., 2008). Cette maladie est due à une mutation hétérozygote présente dans un site d'épissage de l'intron 9 du gène *LMNA*, donnant lieu à une protéine tronquée de l'exon 10, avec une addition de 14 acides aminés en position C-terminale. L'analyse des fibroblastes provenant de ces patients a permis de mettre en évidence une localisation aberrante des lamines A/C, avec une accumulation intra nucléaire ainsi qu'une mauvaise organisation de l'EN.

1.2.2.1.4 La dystrophie musculaire des ceintures de type 1B

Un des phénotypes principaux causé par la dystrophie musculaire des ceintures de type 1B (DMC1B) est une atteinte spécifique des muscles squelettiques situés sur les ceintures pelviennes et scapulaires (OMIM#159001).

1.2.2.1.5 La dystrophie musculaire congénitale

La dystrophie musculaire congénitale est très rare et présente le phénotype le plus sévère de toutes les dystrophies causées par une mutation du gène *LMNA*, le début des symptômes apparaissant plus précocement au cours de la vie des patients. La plupart des cas de dystrophies congénitales sont causés par des mutations *de novo* du gène *LMNA*, bien que des cas de mosaïcisme germlinal aient été identifiés (Quijano-Roy et al., 2008).

1.2.2.2 Les autres types de laminopathies

Les lipodystrophies constituent un groupe de maladies caractérisées par des absences ou des réductions du tissu adipeux. Il existe actuellement deux types de maladies entrant dans ce groupe de laminopathies. Tout d'abord, la lipodystrophie partielle familiale de Dunnigan (LPFD) transmise de manière autosomale dominante. Dans 85 à 90% des cas, les mutations sont situées sur l'exon 8, menant à une substitution d'acides aminés ayant pour conséquence

INTRODUCTION

de changer la charge de surface du domaine de type immunoglobuline situé dans la queue de la lamine (OMIM#151660). Les patients naissent avec une distribution normale du tissu adipeux, qui tend à se délocaliser des membres et du tronc pour aller s'accumuler au niveau du cou et du visage au début de la puberté. On peut aussi noter l'apparition de troubles métaboliques comme une insulino-résistance, un diabète mellitus ou encore une intolérance au glucose (Dunnigan et al., 1974; Young et al., 2005). Des complications comme une stéatose hépatique ont aussi pu être observées (Ludtke et al., 2005).

La dysplasie Mandibulo-Acrale (DMA) appartient à la fois au groupe des lipodystrophies mais aussi à celui des laminopathies systémiques avec syndrome de vieillissement prématuré. La DMA est produite par des mutations faux-sens homozygotes sur le gène LMNA (OMIM #248370). Cette maladie est caractérisée par un retard de croissance, des anomalies du visage et du crâne, une ostéolyse des phalanges distales et des clavicules, et un défaut de pigmentation cutanée. Un aspect lipodystrophique important est aussi à prendre en compte, avec une perte du tissu adipeux et des complications métaboliques comme un diabète insulino-résistant (Garavelli et al., 2009; Young et al., 1971).

La Progéria, aussi appelée syndrome progéroïde d'Hutchison-Gilford, a été décrite il y a plus d'un siècle comme étant une maladie rare entraînant un vieillissement accéléré et prématuré (Gilford, 1904; Gilfrord, 1904; Hutchinson, 1886). Les patients atteints par cette maladie meurent généralement d'une attaque cardiaque ou cérébrale en moyenne vers l'âge de 13 ans (DeBusk, 1972; Merideth et al., 2008). Parmi les symptômes, on compte une peau sclérotique, des rétractions tendineuses, des yeux proéminents, une petite taille, une diminution du taux de cellules graisseuses sous cutanées, une alopecie, une peau ridée et marbrée ainsi qu'une ostéoporose (OMIM#176670). Les mutations responsables de la Progéria activent un site cryptique donneur induisant la synthèse d'une protéine tronquée de 50 acides aminés dans le site C terminal de la prélamine A. Cette protéine mutée, appelée progérine, reste farnésylée. Cette protéine mutée réduit la concentration cytoplasmique de la GTPase Ran, inhibe la localisation nucléaire de Ubc9, une protéine impliquée dans la

INTRODUCTION

SUMOylation, et inhibe TPR, une protéine faisant partie du pore nucléaire sur le côté interne de la membrane nucléaire (Kelley et al., 2011).

La maladie de Charcot-Marie-Tooth (CMT) est la neuropathie héréditaire la plus commune, avec une prévalence de 1 personne sur 2500. Elle est caractérisée par une perte progressive des muscles et de la sensibilité des extrémités avec une faiblesse chronique des muscles distaux (Dyck et al., 1983). Cette maladie peut être divisée en deux sous-types en fonction de la vitesse de conduction nerveuse avec la maladie CMT démyélinisante (CMT1) qui présente une vitesse de conduction très diminuée et la CMT axonale (CMT2) présentant une vitesse de conduction ralentie ou normale. La maladie de Charcot-Marie-Tooth de type 2B1 (CMT2B1) (OMIM #605588) est la forme autosomique récessive d'une CMT causée par une mutation liée au gène *LMNA*, la seule connue pour être responsable d'un phénotype concernant uniquement les nerfs périphériques. On observe chez les patients une baisse de la vitesse de conduction des nerfs, une perte des fibres myélinisées et une dégénérescence axonale (De Sandre-Giovannoli et al., 2002).

1.2.3 La corrélation génotype-phénotype dans les laminopathies

Comme nous avons pu le voir dans la partie précédente, les laminopathies liées au gène *LMNA* résultent en une myriade de symptômes. L'étude de la corrélation entre le génotype et le phénotype des altérations de la structure la lamine de type A, suggère fortement qu'il existe une relation étroite entre certains domaines de la protéine et sa fonction dans un tissu particulier (Figure 8). En effet, ce phénomène tissu spécifique est retrouvé dans plusieurs groupes de laminopathies.

Dans la LPFD, 90% des mutations produisent une substitution d'acides aminés dans le domaine « Ig fold » de la lamine, situé dans la queue de celle-ci. La plupart des mutations donnant lieu à des altérations du système nerveux périphérique proviennent d'une substitution R298C située dans le domaine central de la lamine. Dans le cas de la DMA, c'est une substitution d'acides aminés que l'on retrouve près du résidu 527 dans le domaine « Ig-like »

INTRODUCTION

et pour la Progeria, toutes les mutations sont situées dans l'exon 11, donnant lieu à une prélamine A tronquée de 50 acides aminés au niveau de sa queue.

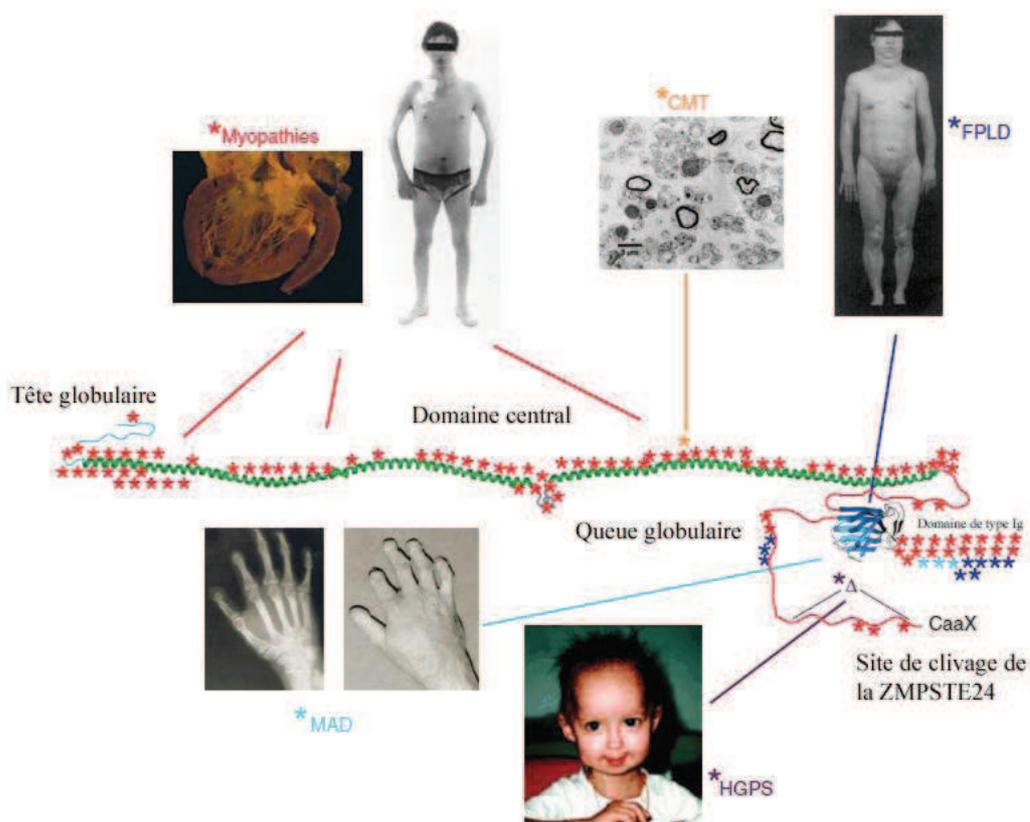


FIGURE 8 : CORRELATION GENOTYPE-PHENOTYPE DANS LES LAMINOPATHIES D'APRES WORMAN ET LA. 2010 (WORMAN ET AL., 2010).

Une corrélation entre la place de la mutation sur le gène de la lamine et le phénotype observé a été mise en évidence. En effet, alors que pour les myopathies les mutations sont réparties sur l'ensemble du gène (étoiles rouges), pour la MAD (étoiles turquoise), CMT (étoiles oranges), FPLD (étoiles bleues) ou la Progeria (étoiles violettes), ces mutations sont situées à un endroit précis du gène *LMNA*.

Les mutations donnant lieu à des laminopathies du muscle strié sont réparties sur l'ensemble du gène de la prélamine A bien que le phénotype reste tissu-spécifique (Figure 8). Ces observations suggèrent que les phénotypes musculaires observés pourraient être dus à une perte partielle de l'expression des lamines de types A. Une autre hypothèse serait que ces variants interfèrent avec la structure globale de la lamine (Worman et al., 2010).

INTRODUCTION

1.2.4 La dystrophie musculaire d'Emery-Dreifuss Autosomale Dominante : une laminopathie multifactorielle

1.2.4.1 Découverte de la pathologie

La première description d'une dystrophie musculaire associée à des rétractions des coudes et des hanches associées à une cardiomyopathie fut publiée à Paris en 1902 par Cestant et Lejonne, sur deux jeunes patients de la même fratrie (Cestan and Lejonne, 1902). Les parents n'étaient pas affectés mais les enfants présentaient des rétractions sévères au niveau des coudes, des poignets, des chevilles et des muscles extenseurs du cou. Un autre cas fut décrit d'un patient provenant de Virginie en 1966 par Dreifuss et Emery. Ces derniers analysèrent cette pathologie comme un variant de la dystrophie musculaire liée à l'X (Emery and Dreifuss, 1966). En 1979, un autre cas fut décrit par Rowland et al. (Rowland et al., 1979) sur un homme avec cette fois ci une atteinte cardiaque, venant s'ajouter à la liste des symptômes découverts préalablement. Dans le milieu des années 80, Emery ré-ausculta le patient de Virginie, et découvrit que lui aussi avait une atteinte cardiaque, qui, en plus des capacités de mouvement limitées des coudes et du cou, constituait la signature d'origine de la Dystrophie Musculaire D'Emery-Dreifuss.

1.2.4.2 Description clinique et traitements existants

Les symptômes de la DMED-AD apparaissent dans la première décennie de la vie des patients (Emery, 1987). Tout commence par des rétractions, arrivant avant la fonte et la faiblesse musculaire, ce qui est contraire à l'histoire naturelle des autres dystrophies. Ces rétractions affectent les coudes, les muscles extenseurs du cou, et les tendons d'Achille, empêchant la complète extension des muscles et ainsi la mobilité nécessaire à la posture et à la marche (OMIM#181350).

Durant la deuxième décennie de la vie du patient, apparaît une seconde vague de symptômes consistant en une fonte et une faiblesse musculaire au niveau des biceps, des triceps et du péroné. C'est ensuite qu'arrive l'atteinte cardiaque, sans relation particulière

INTRODUCTION

avec la sévérité de l'atteinte musculaire. Les premiers symptômes consistent en un bloc de conduction auriculo-ventriculaire (Bialer et al., 1991), compliquée ensuite par l'extension de la cardiomyopathie dilatée, conduisant à des tachycardies et des arythmies ventriculaires.

Afin de pallier à ce dernier symptôme, responsable de nombreux décès par crise cardiaque, l'implantation d'un défibrillateur est nécessaire (Becane et al., 2000).

1.2.4.3 Les modèles animaux de la pathologie

Il existe plusieurs modèles murins de la DMED. Le premier à avoir été créé est la souris *Lmna*^{-/-} (Sullivan et al., 1999), (qui en fait présente une lamine A tronquée (Jahn et al., 2012)) développant une faiblesse musculaire et une cardiomyopathie, concordant avec le phénotype DMED observé chez l'homme. La souris hétérozygote, *Lmna*^{+/-}, développe une cardiomyopathie vers l'âge d'un an. Les séquences nucléotidiques du gène LMNA chez l'homme et la souris présentant entre elles une forte homologie, la création de modèles murins pertinents pour la pathologie a pu être mise au point par Knock-In (KI). La souris H222P (*Lmna*^{H222P/H222P}) (Arimura et al., 2005) et la souris N195K (*Lmna*^{N195K/N195K}) (Mounkes et al., 2005) ont été mises au point. La souris *Lmna*^{N195K/N195K} permet de modéliser l'aspect DCM de l'DMED-AD, tandis que la souris *Lmna*^{H222P/H222P} récapitule entièrement le phénotype retrouvé chez l'homme. Ce phénotype comprend une dystrophie musculaire et une cardiomyopathie dilatée avec des défauts de conduction.

1.2.4.4 Mécanismes physiopathologiques impliqués dans la DMED-AD :

Différentes hypothèses ont été proposées pour essayer de comprendre la pathologie. L'une d'entre elles est que les lamines de type A et C ont pour fonction de maintenir l'intégrité mécanique des cellules subissant un stress, comme c'est le cas des cellules du muscle strié. De ce fait, les cellules mutées pour le gène LMNA ne sont plus capables de supporter ces forces mécaniques et ne peuvent plus protéger la cellule des dommages causés par ce stress mécanique. Celles-ci adoptent alors une morphologie montrant un noyau déformé et une rigidité diminuée (Lammerding et al., 2004).

INTRODUCTION

Pour essayer de comprendre les mécanismes menant à une altération de la fonction cardiaque, Muchir et collègues en 2007 (Muchir et al., 2007) ont utilisé des puces à ADN afin d'analyser l'expression des gènes perturbés dans les cœurs de souris portant la mutation *Lmna*^{H222P/H222P}. Ils ont alors mis en évidence une activation de la voie ERK (Extracellular signal Regulated-Kinase) et JNK (c-Jun N-terminal kinases) appartenant à la voie de signalisation des MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase), bien avant que des anomalies cardiaques ne soient détectées dans le cœur des souris *Lmna*^{H222P/H222P}. Une altération de la voie Wnt a aussi été mise en évidence dans le cœur des souris *Lmna*^{H222P/H222P} au travers de cette étude. Très récemment, ces données ont été analysées à nouveau, permettant de mettre en évidence que la branche p38 α de la voie des MAPK se retrouve perturbée dans le cœur des souris *Lmna*^{H222P/H222P} (Muchir et al., 2012a). De plus, les auteurs ont confirmé l'activation anormale de la voie du TGF β et l'altération de la voie Wnt.

Cette activation des MAP kinases au niveau des cardiomyocytes subissant un stress mécanique (Baines and Molkentin, 2005) et une suractivation de la voie ERK et JNK est délétère pour les cœurs des souris H222P KI. Un traitement de ces souris avec un inhibiteur de cette voie permet de prévenir le développement d'une cardiomyopathie (Muchir et al., 2009).

1.2.5 Pistes thérapeutiques pour les laminopathies

Actuellement, il n'existe pas de traitement permettant la guérison des patients atteints de laminopathies. Néanmoins, il existe des traitements symptomatiques comme la kinésithérapie et la chirurgie orthopédique. Les problèmes cardiaques liés aux laminopathies peuvent être évités à l'aide d'un pacemaker ou encore avec la pose d'un défibrillateur. Les traitements utilisés pour les neuropathies sont des traitements médicamenteux anti-convulsion.

Néanmoins, la découverte récente de la toxicité de l'accumulation de prélamine A dans le cas des patients atteints de Progeria a permis de mettre en place un essai clinique médicamenteux en Europe (NCT00731016). Dans cet essai, deux molécules sont utilisées :

INTRODUCTION

les statines (une classe d'hypolipémiants) et les aminobiphosphonates (utilisés dans l'ostéoporose). Ces molécules permettent d'éviter l'accumulation toxique de progéline dans les cellules des patients. Un autre essai est actuellement en cours aux Etats-Unis.

De plus, des études de recherche fondamentale sont actuellement en cours pour un futur traitement des patients atteints de DMED-AD avec des inhibiteurs de la voie ERK comme le selumetinib, une molécule utilisée dans le traitement des cancers chez l'homme, ou la rapamycine (Muchir et al., 2012b; Ramos et al., 2011; Wu et al., 2010). Ces molécules améliorent la fonction cardiaque des souris porteuses des mutations *Lmna*^{H222P/H222P} ou *Lmna*^{-/-}

1.3 Les multiples rôles et interactions des lamines

1.3.1 La lamine et ses interactions dans le noyau :

1.3.1.1 Les protéines et facteurs de transcription associés à la lamine

Alors que la MNE partage beaucoup de ses protéines avec le réticulum endoplasmique (RE), la MNI possède son propre groupe de protéines, et la plupart de ces protéines interagissent avec la lamina. Les protéines associées à la lamina nucléaire ont été découvertes par extraction du noyau (Foisner and Gerace, 1993). Elles forment un groupe de protéines appelées Polypeptides Associées à la Lamine (PALs ou LAPs), ancrées dans l'EN. Ces interactions stables et fortes (par leur résistance aux sels et aux détergents) sont indispensables pour maintenir l'intégrité structurale du noyau (Figure 9).

Les protéines interagissant avec la lamine dans le noyau sont nombreuses. On compte parmi elles l'émerine, MAN1, le récepteur de la lamine B ou Lamine B Receptor (LBR), les polypeptides associés à la lamine ou LAPs, nesprine 1 α , SUN mais aussi les pores nucléaires, la chromatine, Rb, BAF (Barrier Autointegration Factor), SREBP, MOK, ERK, l'actine nucléaire, et PCNA (Proliferating Nuclear Antigen). Par soucis de concision, nous ne parlerons ici que des interactions nécessaires pour la suite de l'introduction.

INTRODUCTION

La protéine **LAP2 α** résulte de l'épissage alternatif du gène *LAP2*, possédant des caractéristiques uniques parmi les 6 isoformes existantes pour ce gène (Berger et al., 1996) (Figure 9). Lorsque l'on empêche la lamine A/C de se localiser à la membrane, on observe l'agrégation de celle-ci dans le nucléoplasme de la cellule, mais aussi une redistribution de la protéine LAP2 α (Dechat et al., 2000), permettant de conclure que ces deux protéines interagissent à l'intérieur du noyau. LAP2 α , comme toutes les isoformes LAP2, contient un domaine LEM-Like en partie N-terminale, qui peut interagir directement avec l'ADN (Cai et al., 2001). De ce fait, on peut supposer que la lamine A/C interagit fortement avec la protéine LAP2 α pour former un complexe permettant de lier la chromatine et ayant un rôle sur l'organisation et la régulation de celle-ci. LAP2 α cible les télomères pendant l'anaphase et s'assemble avec la chromatine pendant la télophase (Dechat et al., 2004).

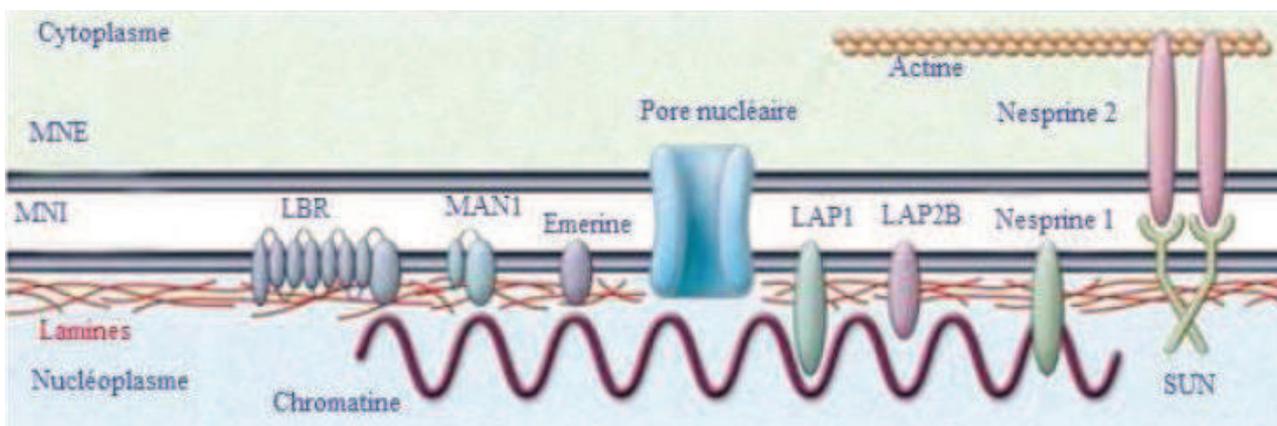


FIGURE 9 : INTERACTIONS DE LA LAMINE AVEC LES PROTEINES DE LA MEMBRANE NUCLEAIRE INTERNE, D'APRES WORMAN ET AL. 2009 (WORMAN ET AL., 2009).

Les protéines de la MNI partagent de nombreuses interactions avec la lamine. La protéine SUN, ancrée dans la MNI, permet de connecter la lamine au cytoplasme par l'intermédiaire des Nesprines, ancrées dans la MNE, elles même connectées à l'actine. MNE : Membrane Nucléaire Externe ; MNI : Membrane Nucléaire Interne ; LBR : Lamin B receptor ; LAP2 : Lamina Associated Polypeptide type 2

Les protéines **SUN 1** (Dreger et al., 2001) et **2** (Hodzic et al., 2004) permettent d'assurer un continuum entre le noyau et les protéines du cytoplasme à travers leurs

INTRODUCTION

interactions avec les lamines (Figure 9). Ce sont des protéines de la MNI contenant un domaine d'homologie de type Sad1-UNC qui s'étend dans l'espace périnucléaire, interagissant avec les Nesprin. Ces dernières, aussi connues sous le nom de protéines Syne, Myne ou NUANCE forment une grande famille de protéines codées par deux gènes distincts : *Nesprin 1*, et *2* donnant lieu à de multiples isoformes par épissage alternatif. Elles possèdent de multiples domaines de répétitions spectrines et un domaine d'activation de l'actine. Les nesprines, en plus d'interagir avec la lamine dans la membrane nucléaire interne sont aussi retrouvées dans la membrane nucléaire externe mais aussi dans le Golgi (Gough et al., 2003). La nesprine 1 α , une protéine de 131kDa, interagit directement avec la lamine et l'émerine (Mislow et al., 2002).

MAN1 interagit avec les protéines Smad2/3, en réponse aux cascades de signalisation liées au TGF β et Bone Morphogenic Proteins (BMPs). Une souris KO pour cette protéine possède un cœur anormal avec une symétrie gauche-droite non respectée (Ishimura et al., 2008), due à une augmentation de la voie du TGF β (Figure 10).

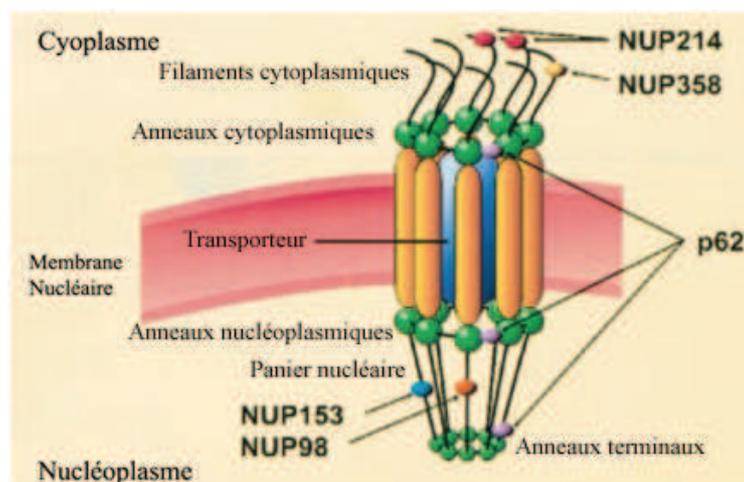


FIGURE 10 : ORGANISATION DU PORE NUCLEAIRE D'APRES PEREZ-TERZIC ET AL. (PEREZ-TERZIC ET AL., 2003)

Le pore nucléaire est composé de nombreuses nucléoporines (NUP), permettant la formation de structures cytoplasmiques (filaments et anneaux cytoplasmiques) et nucléaires comme les anneaux terminaux et nucléoplasmiques, mais aussi le panier nucléaire, ayant un rôle important dans le nucléoplasme.

INTRODUCTION

Les **pores nucléaires** sont de larges canaux composés de multiples protéines appelées nucléoporines, à travers lesquelles le noyau et le cytoplasme peuvent communiquer (Figure 9, 10 et 11). Cette structure contrôle les transports actifs d'ions et de petites molécules. Dans chaque pore nucléaire, on peut noter la présence d'au moins 30 types de nucléoporines différentes (Rout et al., 2000).

L'**émerine**, quant à elle, régule la voie de la β -Caténine, impliquée dans l'adhésion cellule-cellule et l'activation transcriptionnelle (Markiewicz et al., 2006). Dans la plupart des cas, cette protéine n'est pas localisée dans la membrane nucléaire interne (Nagano et al., 1996). Avec la lamine, cette protéine permet de donner une structure au noyau (Clements et al., 2000). Une mutation dans le gène *EMD* codant pour cette protéine est responsable de la DMED liée à l'X (Figure 9, 10 et 11).

La protéine **BAF** est une petite protéine empêchant l'intégration de l'ADN viral dans la génome de l'hôte infecté (Lee and Craigie, 1998) en formant un complexe avec LAP2 α (Suzuki et al., 2004). Les dimères de BAF lient et forment des ponts avec l'ADN double brin sans cibler une séquence spécifique, utilisant deux paires de motifs d'hélices-doubles-hélices localisés sur la surface opposée des dimères de BAF (Zheng et al., 2000). BAF joue un rôle dans la compaction de la chromatine, permettant la formation d'hétérochromatine et la régulation de l'expression génique, en agissant comme un répresseur transcriptionnel (Segura-Totten et al., 2002). De plus, la protéine BAF peut aussi interagir avec les protéines contenant un domaine de type LEM, comme LAP2 α ou LAP2 β (Furukawa, 1999), régulant d'autres protéines nucléaires à domaines de types LEM (Shimi et al., 2004). L'expression d'une protéine BAF mutante, incapable d'interagir avec les domaines de type LEM, inhibe l'assemblage nucléaire et cause la mort de la cellule après la mitose (Haraguchi et al., 2001). En 2010, Capanni et collègues ont démontré que la prélamine A était responsable de l'intégration de BAF dans la MNI (Capanni et al., 2010).

Le facteur **Rb**, produit du gène rétinoblastome, interagit avec le complexe lamine-LAP2 α à l'intérieur du noyau (Markiewicz et al., 2002) (Figure 11 et 14). Il a été

INTRODUCTION

démontré que cette petite protéine forme un hétérodimère avec la lamine A *in vitro* (Kennedy et al., 2000) en la liant au niveau de son domaine central. La forme hypophosphorylée de Rb (pRb) lie les hétérodimères E2F-DP et empêchent ainsi leur action favorisant la prolifération cellulaire (Brehm et al., 1998). Rb régule aussi Apaf1, un facteur de transcription impliqué dans l'apoptose, ayant un été proposé comme responsable de la fonte musculaire chez les patients atteints d'DMED (Bonne et al., 2003). Pendant la phase G1, la forme pRb (répresseur) lie la lamine et LAP2 α directement (Mancini et al., 1994). Une surexpression de LAP2 α menant à l'apoptose, la liaison de Rb à ce facteur est indispensable dans la cellule. C'est de cette manière que la lamine pourrait alors réguler indirectement la prolifération cellulaire. De plus, il a été démontré le rôle de Rb dans la cardiogenèse associée avec la protéine LEK (Papadimou et al., 2005). La lamine lie aussi **PP2A** (Protein Phosphatase 2A), permettant la déphosphorylation des SMAD nucléaires ou celle de pRb.

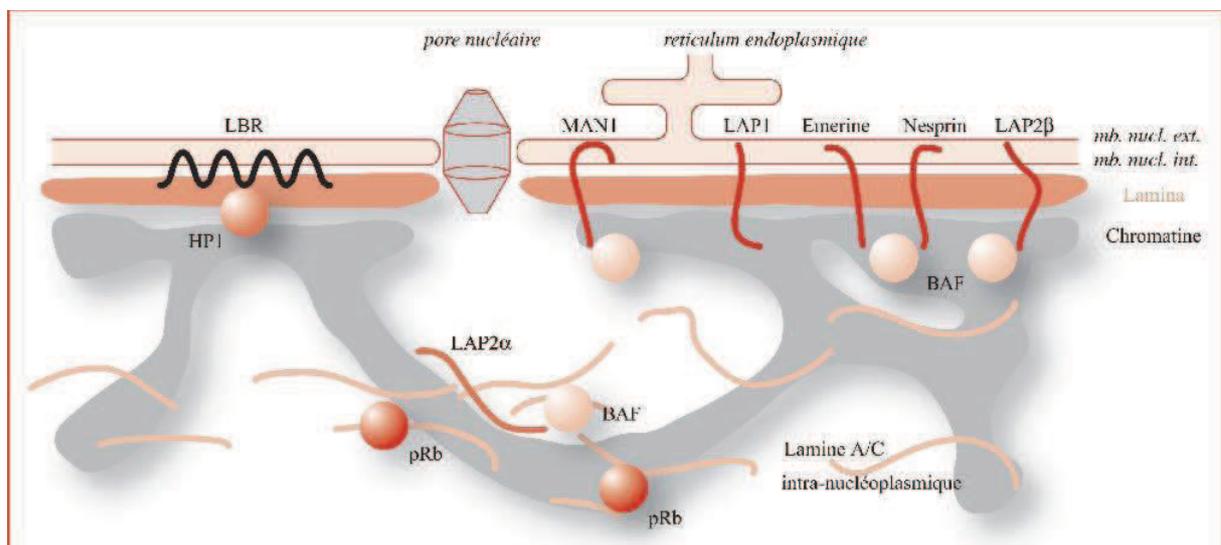


FIGURE 11 : LES FACTEURS DE TRANSCRIPTION ET LES PROTEINES INTERAGISSANT AVEC LA LAMINE DANS LE NOYAU D'APRES VIGOUROUX ET AL. (VIGOUROUX, 2005)

En plus de la lamine adressée à la membrane, il existe une lamine intra-nucléoplasmique. La lamine de type A/C interagit aussi avec pRb et BAF dans le nucléoplasme.

INTRODUCTION

Le facteur de transcription **c-Fos** appartient à la famille des facteurs de transcription AP-1. Ces facteurs permettent la régulation de nombreux processus cellulaires comme la prolifération et la différenciation, ou encore l'apoptose (Eferl and Wagner, 2003) La lamine régule l'activité de AP-1 (Activating protein 1) en séquestrant **c-Fos** dans l'enveloppe nucléaire via l'activité ERK1/2 (Ivorra et al., 2006).

MOK2 est un facteur de transcription de type répresseur interagissant avec les lamines A et C. Cette protéine réprime l'expression des gènes activés par les protéines Crx (cone-rod homeobox protein) en entrant en compétition avec eux pour les sites de liaison à l'ADN. MOK2 se lie aux lamines A/C au niveau de leur domaine central enroulé sous sa forme dimérisée (Dreuillet et al., 2002). Cette interaction confirme que la lamine n'a pas de site répresseur seulement au niveau de ses parties globulaires mais aussi au niveau de son domaine central.

1.3.1.1 L'ADN et la chromatine

La lamine de type A interagit directement avec les acides nucléiques et la chromatine. Cette interaction a été mise en évidence par des analyses biochimiques effectuées par Bouvier et ses collaborateurs en 1985 (Bouvier et al., 1985). Plus tard, l'équipe de Takata et collaborateurs identifièrent la lamine comme une protéine conservée à la périphérie des chromosomes humains en métaphase (Takata et al., 2007). L'affinité de la lamine avec la chromatine est très faible, ce qui suggère que cette interaction met en œuvre des processus dynamiques. De plus, les lamines s'associent plus facilement avec les régions pauvres en gènes et sont étroitement liées à l'hétérochromatine (Fawcett, 1966; Paddy et al., 1990). Elles s'associent aussi avec la chromatine à travers ses partenaires dans la lamina (Dorner et al., 2007), l'exemple le plus illustratif étant BAF (Margalit et al., 2007). Les interactions entre la lamine et la chromatine impliquent les domaines N et C terminaux de la queue des histones, ainsi que le NLS des lamines (Mattout et al., 2007). La lamine pourrait être impliquée dans l'ancrage et l'organisation des chromosomes pendant l'interphase (Galiova et al., 2008), des expériences ayant montré que la lamine se lie aux chromosomes mitotiques et aux particules

INTRODUCTION

polynucléosomales *in vitro* (Goldberg et al., 1999; Taniura et al., 1995). Les fonctions de cette interaction seront détaillées par la suite dans ce chapitre.

1.3.2 Les lamines du nucléoplasme

Des expériences d'expression d'une protéine de fusion Lamine A/GFP ont montré que 90% des lamines étaient localisées à la périphérie du noyau et 10% d'entre elles dans le nucléoplasme (Broers et al., 1999).

Les lamines nucléoplasmiques sont détectées dans les tissus prolifératifs sous forme de filaments dont l'organisation semble moins régulière que celle des lamines assemblées à la membrane (Belmont et al., 1993). Cette localisation intranucléaire des lamines a été détectée dans le tissu entier, ce qui confirme que cela n'est pas dû à un artefact *in vitro* (Naetar et al., 2008). Les lamines de type B ont aussi été retrouvées à l'intérieur du noyau au sein de foci nucléoplasmiques, co-localisés avec des sites de réplication de l'ADN (Moir et al., 1994) ou diffusant librement dans le noyau (Moir et al., 2000).

Contrairement aux lamines de type A, les lamines de type B situées à l'intérieur du noyau et non adressées à la MNI demeurent immobiles, associées avec des structures stables (Shimi et al., 2008). Ce pool de lamines intranucléaires, après son importation dans le noyau (Dyer et al., 1999) possède une demi vie allant de 30min à 3h (Lehner et al., 1986). Sa localisation nucléoplasmique pourrait être aussi due à un processus post-traductionnel sans avoir de fonctions cellulaires précises (Dechat et al., 2011).

Ces lamines du nucléoplasme jouent un rôle dans la transcription génique, la progression du cycle cellulaire et la différenciation, ainsi que dans l'organisation de la chromatine. Lorsque l'on surexprime les lamines mutées, elles sont souvent délocalisées de la membrane à l'intérieur du nucléoplasme (Ostlund et al., 2001; Wiesel et al., 2008), en plus grande quantité, ou, à l'inverse, en moins grande quantité que dans les cellules normales. Il

INTRODUCTION

est donc concevable que certaines laminopathies seraient liées à une dérégulation des fonctions de la lamine nucléoplasmique.

1.3.3 Les voies de signalisation associées à la lamine

1.3.3.1 La voie ERK (Extracellular signal Regulated-Kinase)

Deux laminopathies, la dystrophie musculaire d'Emery Dreifuss (DMED) et la cardiomyopathie dilatée (CD) présentent une voie de signalisation des MAPK fortement perturbée. Une activation anormale de ERK et JNK est alors observée dans le cœur des souris porteuses de la mutation *Lmna*^{H222P/H222P} (voir le chapitre 1.2.4.4) mais aussi dans des cellules COS-7 ou C2C12 surexprimant la mutation par transfection (Muchir et al., 2007). De plus, une surexpression de la voie ERK est retrouvée dans les souris déficientes pour l'émerine (*EMD*^{-/ly}), modèle présentant une CD. Cette hyper-activation, responsable de la pathologie, été confirmée en 2009 par l'adjonction d'un inhibiteur de la voie ERK1/2 (PD98059) avant l'apparition des symptômes, permettant de bloquer le développement de la cardiomyopathie.

1.3.3.2 La voie Wnt-β-Caténine

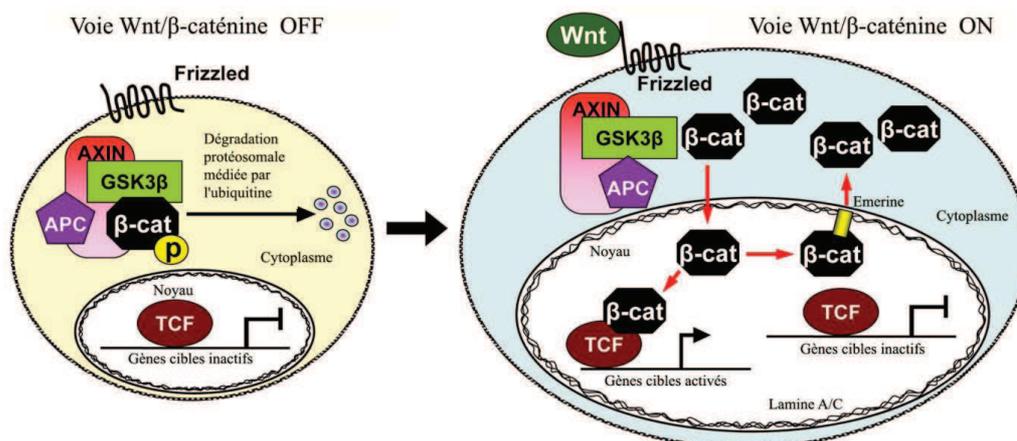


FIGURE 12: LA VOIE WNT/B-CATENINE D'APRES ANDRES ET GONZALES 2009 (ANDRES AND GONZALEZ, 2009)

Lorsque Wnt n'est pas lié à son récepteur Frizzled, la β-Caténine est prise en charge par le complexe Axin, APC et GSK3β, puis adressée au protéasome. Lorsque Wnt est lié à son récepteur, on observe alors une accumulation de β-caténine dans le cytoplasme qui va être ensuite transloquée dans le noyau et se lier à TCF afin d'activer ses gènes cibles.

INTRODUCTION

Les Wnts sont des glycoprotéines sécrétées, impliquées dans le développement embryonnaire (Clevers, 2006) (Figure 12). En absence de signal Wnts, la β -caténine est dégradée par le protéasome (Andres and Gonzalez, 2009) tandis que lorsque Wnt est présent, il se lie à son récepteur membranaire Frizzled, entraînant l'accumulation cytoplasmique de la β -caténine, qui est ensuite transportée au noyau, où elle lie les facteurs TCF (T-Cell Factor) et LEF (Lymphoid Enhancer Factor), permettant d'induire l'expression des gènes cibles, impliqués dans la différenciation cellulaire (Brantjes et al., 2002).

Cette voie est régulée par l'émerine, car on peut observer une accumulation nucléaire de la β -caténine (Markiewicz et al., 2006) dans les fibroblastes KO pour cette protéine. De plus, cette voie a été mise en évidence dans le cœur des souris porteuses de la mutation *Lmna*^{H222P/H222P}. De manière intéressante, cette voie est aussi impliquée dans la différenciation cardiaque et sera développée dans la dernière partie de cette introduction.

1.3.3.3 La voie du TGF β

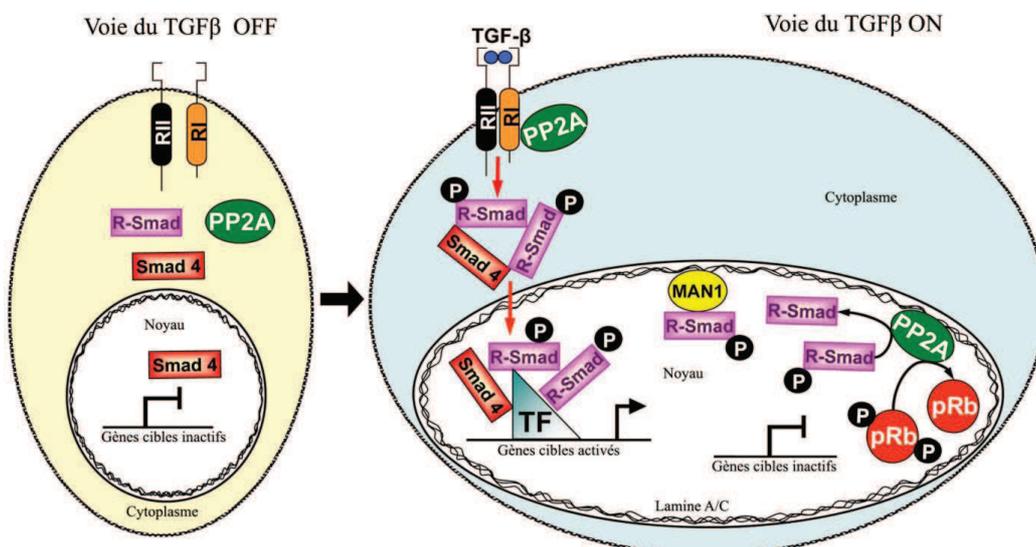


FIGURE 13: LA VOIE DU TGF β D'APRES ANDRES ET GONZALEZ 2009 (ANDRES AND GONZALEZ, 2009)
En absence de TGF β , les Smads s'accumulent dans le cytoplasme. Lorsque les récepteurs du TGF β sont activés par le TGF β , ils se lient entre eux, permettant par la suite la phosphorylation des Smads. Ces Smads vont alors former des oligomères permettant l'activation de leurs gènes cibles.

INTRODUCTION

La superfamille du TGF β régule la différenciation, la prolifération et l'apoptose dans de nombreux types cellulaires (Massague, 2000) (Figure 13). La liaison des récepteurs du TGF β de type I et II entraîne la phosphorylation des R-Smads (Receptors regulated Smads) qui forment des oligomères avec d'autres Smads comme Smad4, importés dans le noyau et régulant la transcription de nombreux gènes. Cette voie pourrait être régulée par MAN1, qui peut séquestrer les Smads actifs et ainsi inhiber la voie du TGF β (Gruenbaum et al., 2005; Lin et al., 2005). De plus, les lamines peuvent moduler l'activité de la voie du TGF β via la protéine PP2A (Protéin Phosphatase 2A) (Van Berlo et al., 2005).

Cette voie a été identifiée comme défectueuse dans les souris porteuses de la mutation *Lmna*^{H222P/H222P}. Cette voie a aussi un rôle important dans le développement et sera étudiée en détails dans la seconde partie de cette introduction.

1.3.3.4 La voie Notch

La voie de signalisation dépendante des Notch régule le destin des cellules souches et leur différenciation (Bray, 2006). Les protéines Notch sont des récepteurs membranaires possédant un domaine transmembranaire, un grand domaine extracellulaire et un domaine intracellulaire (NICD). L'activation de Notch par son ligand produit le clivage du NICD, permettant sa translocation dans le noyau (Fiuza and Arias, 2007). Un défaut de cette voie de signalisation a été identifié chez les patients atteints de la Progeria (Scaffidi and Misteli, 2005).

1.3.4 Fonctions des lamines:

La lamina permet de donner un support structurel au noyau, mais a aussi un rôle dans la régulation de la chromatine, de la transcription et de l'expression génique (Dechat et al., 2008) (Figure 14). Son rôle exact dans le noyau de la cellule reste cependant très peu connu.

INTRODUCTION

1.3.4.1 La lamine : Le support du noyau.

Les composants principaux responsables de la forme et de la rigidité du noyau sont les filaments cytoplasmiques (Olins and Olins, 2004) qui lient les protéines de la MNI, via leur domaines SUN et KASH en formant le complexe LINC (Linker of Nucleoskeleton and Cytoskeleton) (Crisp et al., 2006; Ostlund et al., 2009). Une déformation du noyau est observée dans les MEFs porteuses d'une mutation du gène *LMNA* (Vigouroux et al., 2001). De plus, il a été observé une déformation plus grande du noyau dans les cellules souches embryonnaires humaines (CSEh). En effet, ces cellules ne possèdent pas de lamines de type A, contrairement aux cellules différenciées (Pajeroski et al., 2007). Ces interactions entre les lamines de type A et le cytosquelette sont importantes, car la perte de lamines A/C provoque des défauts de polarisation, de migration cellulaire mais aussi une désorganisation des microfilaments, du réseau de vimentine et les microtubules (Houben et al., 2009).

1.3.4.2 Dans l'apoptose

Le rôle des lamines dans l'organisation de la chromatine est aussi illustré lors de l'apoptose. En effet, la mort cellulaire et la condensation de l'ADN sont grandement retardés dans les cellules exprimant des mutants de la lamine de type A ou B, les rendant non clivables par les caspases (Rao et al., 1996).

1.3.4.3 Dans la régulation de la chromatine

Le fait que les lamines soient en contact direct avec la chromatine pourrait être un mécanisme de modulation de l'expression génique (Dechat et al., 2010). Des gènes inactifs sont fréquemment retrouvés en association avec les lamines, suggérant que les lamines pourraient avoir un rôle d'extinction de certains microdomaines de la chromatine (Boyle et al., 2001). Les lamines seraient aussi impliquées dans le positionnement des territoires chromosomiques. Par exemple, les territoires chromosomiques 13 et 18, normalement retrouvés à la périphérie du noyau, sont déplacés à l'intérieur du noyau dans les cellules de patients porteurs de mutations donnant lieu à des laminopathies (Meaburn et al., 2007). Les

INTRODUCTION

lamines de type A sont préférentiellement associées avec les régions chromatiniennes riches en gènes et les lamines de type B sont quant à elles préférentiellement associées avec les régions chromatiniennes pauvres en gènes.

Les lamines jouent aussi un rôle au niveau des télomères. Les cellules dépourvues de lamines de type A présentent des télomères plus courts avec une structure altérée comparativement aux cellules normales (Gonzalez-Suarez et al., 2009). De plus, les lamines interagissent avec D4Z4, une séquence subtélomérique, agissant aussi avec CTCF (CCCTC-Binding factor). Ainsi, les lamines de type A pourraient être responsables de l'organisation de certaines régions spécifiques de la chromatine et donc influencer l'expression des gènes (Ottaviani et al., 2009a; Ottaviani et al., 2009b).

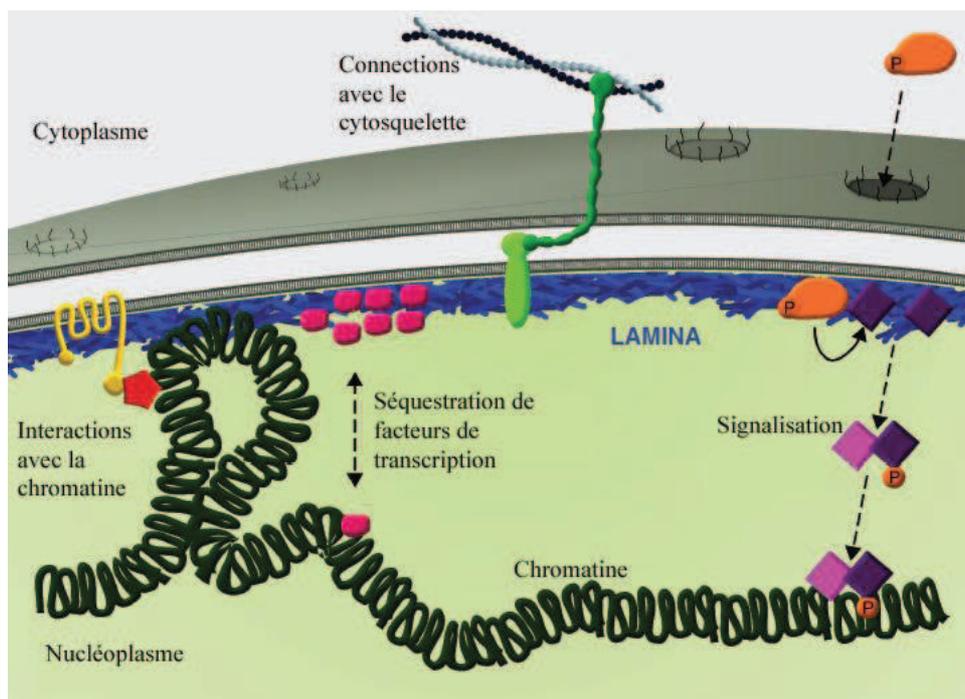


FIGURE 14 : LES DIFFERENTS ROLES DE LA LAMINE DANS L'ARCHITECTURE NUCLEAIRE (DITTMER AND MISTELI, 2011)

La lamine de type A/C possède de nombreuses fonctions dans le noyau de la cellule eucaryote résumées dans ce schéma. Elle est impliquée dans la connexion de la cellule avec le cytosquelette au travers des protéines Nesprines et Sun, la séquestration des facteurs de transcription permettant de réguler leur activité. La lamine possède aussi un rôle dans la signalisation intra-cellulaire, ainsi qu'une forte interaction avec la chromatine.

INTRODUCTION

1.3.4.1 Dans la différenciation :

Les lamines ne sont pas exprimées de la même manière aux différentes étapes du développement. Elles ont donc un rôle certain dans la différenciation cellulaire. Par exemple, durant la différenciation musculaire, le pool de lamine soluble du nucléoplasme diminue (Muralikrishna et al., 2001). Dans une publication de 2006 parue dans la revue *gènes & développement*, Frock et ses collaborateurs démontrent que la différenciation des myoblastes est perturbée dans les cellules *lmna*^{-/-} (Frock et al., 2006). Dans ces cellules, la différenciation adipocytaire est aussi perturbée (Boguslavsky et al., 2006). Les lamines A/C sont impliquées dans la différenciation osseuse, la disparition de leur expression provoquant une mauvaise ostéoblastogénèse et une ostéoclastogénèse RANK-L dépendantes accélérées dans les cellules stromales de moelle osseuse humaine (Rauner et al., 2009).

1.3.4.2 Dans le nucléoplasme :

Le pool de lamines nucléoplasmiques joue un rôle important dans la cellule, notamment au niveau de la réplication de l'ADN (Kennedy et al., 2000; Moir et al., 2000), du mécanisme général du contrôle de la transcription (Spann et al., 2002), ainsi que dans la progression du cycle cellulaire et la différenciation (Johnson et al., 2004).

1.3.4.3 Dans la prolifération cellulaire :

Les lamines A/C jouent un rôle important dans l'assemblage et le désassemblage du noyau après la mitose. Benavente et Krohne ont démontré qu'une micro-injection d'anticorps anti-lamines dans des cellules mitotiques provoquait un arrêt de celles-ci en télophase, laissant les chromosomes dans un état condensé (Benavente and Krohne, 1986).

Au cours de ce premier chapitre, nous avons pu voir que les lamines étaient des protéines majeures de la cellule, impliquées dans de nombreux processus cellulaires. En effet, les lamines agissent sur la différenciation, la prolifération, la transcription, la modulation de la chromatine. Afin de moduler toutes ces fonctions, la lamine interagit avec de nombreuses

INTRODUCTION

protéines et facteurs de transcription, et interviennent dans diverses voies de différenciation, comme la voie Wnt, qui sont toutes impliquées dans le développement embryonnaire précoce. Cette protéine possède donc un rôle central dans la cellule, et un défaut de celle-ci entraîne des conséquences graves sur l'individu. La lamine agit sur diverses voies de différenciation comme la voie du TGF β , la voie Notch ou encore la voie Wnt, celles-ci étant impliquées dans le développement embryonnaire cardiaque.

INTRODUCTION

2 Le développement embryonnaire précoce :

La cardiogenèse est définie comme une formation *de novo* des tissus cardiaques. C'est un mécanisme cellulaire et moléculaire qui mène à la spécification et à l'engagement (c'est-à-dire la détermination) des progéniteurs cardiaques à partir du mésoderme primitif indifférencié (Lopez-Sanchez et al., 2002) (Garcia-Martinez and Schoenwolf, 1993). Le développement embryonnaire des vertébrés a été beaucoup étudié chez le poulet et la souris. En effet, les embryons du poulet sont très faciles d'accès, permettant une visualisation et une manipulation plus simple que celle des embryons de mammifères comme la souris. De nombreuses expériences fondamentales comme celles de la chimère caille-poulet, réalisées par Nicole Le Douarin et ses collaborateurs ont permis de comprendre le fonctionnement de la crête neurale. Néanmoins, les patrons d'expression génique peuvent être facilement manipulés grâce à la transgénèse chez la souris. En dépit des variations de structures pouvant exister entre les embryons de ces différents vertébrés, les voies de signalisation de bases comme celles des Wnt, TGF β ou des FGF restent conservées (Arnold and Robertson, 2009), ce qui en fait des modèles pertinents pour comprendre le développement embryonnaire humain.

2.1 Les premières étapes du développement embryonnaire chez les mammifères :

2.1.1 Phase de pré-implantation :

Le développement embryonnaire murin commence par la libération par l'ovaire des oocytes suivi d'une fécondation ayant lieu dans l'oviducte (Maatman et al., 2003). Le sperme entre en contact avec l'oocyte, alors au stade métaphase II, par le biais de la zone pellucide, leur contact formant alors une protubérance appelée « cône de fertilisation » (Maro et al., 1984). La méiose reprend alors, entraînant l'expulsion du deuxième globule polaire. La première division du blastomère a lieu 24h après la fécondation, entraînant l'apparition d'un embryon à deux cellules.

INTRODUCTION

2.1.2 Activation génomique du zygote :

C'est l'ARNm maternel qui va permettre de produire les premières protéines dans le zygote au cours des premières divisions, puis celui-ci sera remplacé par les transcrits du zygote lui-même. Ce processus se nomme l'activation génomique du zygote (AGZ ou ZAGA). L'AGZ se met en place juste après le stade une cellule chez la souris (Hamatani et al., 2004). Cette activation se fait par vagues. La seconde, qui a lieu juste après le stade deux cellules, est plus importante que la première et est responsable de la destruction des transcrits maternels (Bachvarova and Moy, 1985). Néanmoins, les protéines transcrites peuvent ensuite persister dans le développement de l'embryon (Larue et al., 1994). Chez l'homme, cette vague a lieu au stade 8 cellules (Larue et al., 1994), illustrant le fait que le temps de développement pré-implantatoire diffère entre l'homme et la souris.

2.1.3 La compaction :

L'œuf fertilisé subit une série de divisions, produisant un nombre croissant de cellules de plus en plus petites, sans changer la taille totale de l'embryon. Jusqu'au stade 8 cellules, les extrémités des blastomères sont claires et chacune est clairement identifiable. Jusqu'à ce stade, les blastomères ne montrent pas de signes de polarité cellulaire. C'est à ce moment que les extrémités des cellules commencent à devenir de moins en moins claires et vont alors se former les jonctions adhérentes et serrées entre les cellules de l'embryon, se traduisant par une augmentation de l'expression de l'E-cadhérine (Larue et al., 1994; Shirayoshi et al., 1983). Cette adhésion cellule-cellule est médiée par cette molécule, qui réagit à la concentration de calcium intracellulaire (Ducibella et al., 1977) mais aussi par la β -caténine, ces deux molécules étant phosphorylées par les protéines GTPases de la famille Rho (Clayton et al., 1999).

Ce phénomène, appelé compaction, permet à chaque blastomère d'acquérir une polarité apico-basale (Figure 15). Au stade 8 cellules, tous les blastomères sont en contact avec l'environnement extérieur, par leur surface apicale. Au clivage suivant, ils adoptent une localisation déterminée : soit ils ont une position externe permettant de maintenir le contact

INTRODUCTION

avec l'environnement extérieur, soit ils restent à l'intérieur et sont complètement entourés par les autres cellules. Cette étape se révèle comme essentielle pour la séparation entre les 3 lignages embryonnaires. Les cellules internes, elles, restent apolaires et forment la masse cellulaire interne (MCI). Une fois que l'embryon au stade 8 cellules est polarisé et compacté, il subit deux cycles de division jusqu'au stade 32 cellules, où la cavité du blastocœle est formée. Celle-ci se forme par des transports actifs d'ions et d'eau, régulés par le système Tead4-Yap. (Kurotaki et al., 2007). Contrairement aux embryons murins, l'étape de compaction n'arrive pas au stade 8 mais au stade 16 cellules chez l'embryon humain (Edwards et al., 1981).

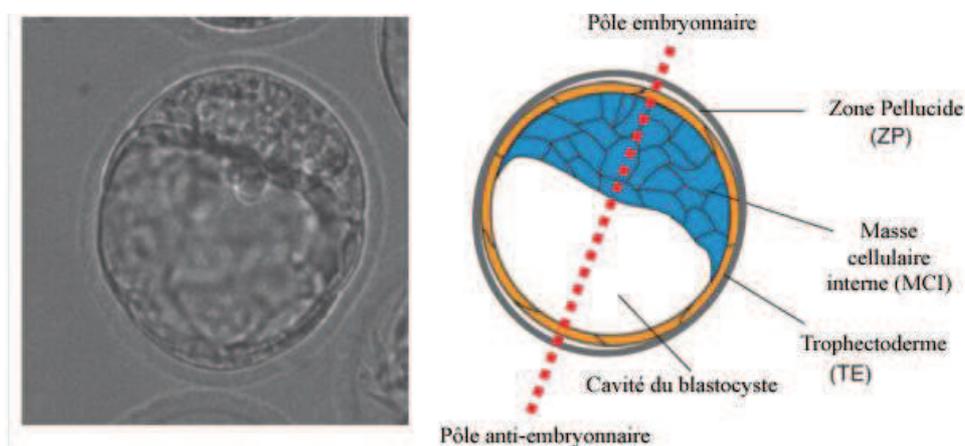


FIGURE 15 : LA POLARISATION DANS L'EMBRYON DE MAMMIFERE (FUJIMORI, 2010).

Le blastocyste est composé de deux pôles : le pôle embryonnaire et le pôle anti embryonnaire, définissant l'axe de celui-ci. Il est composé de deux couches de la zone pellucide et d'une couche de cellules internes appelées trophoblaste (TE), entourant la masse cellulaire interne (MCI) et une cavité, appelée la cavité du blastocyste.

2.1.4 Le premier lignage cellulaire: division entre la masse cellulaire interne et le trophoblaste :

Le stade blastocyste, chez la souris, arrive au stade E3.5 jours après la fécondation, suite à 5 cycles de divisions cellulaires. On peut alors observer deux types de cellules : les cellules du trophoblaste (TE) et les cellules de la masse cellulaire interne (MCI), plus petites. Les cellules TE sont caractérisées par l'expression des facteurs Cdx2 (caudal-like transcriptionnel

INTRODUCTION

factor with homeodomain) et les cellules de la MCI expriment, quand à elles, le facteur de transcription à homéodomaine Oct4 (codé par le gène *Pou5f1*) (Niwa et al., 2005; Ralston and Rossant, 2008). On peut noter à ce stade que l'expression d'Oct4 est détectable dans les cellules TE au stade blastocyste chez l'homme ou le primate, alors que ce niveau d'expression devient indétectable dans ces même cellules chez la souris. Ce facteur de transcription est exprimé en continu dans tous les blastomères de la fécondation jusqu'au stade 32 cellules. L'expression de *Cdx2* est détectable dès le stade 8 cellules et augmente dans les cellules externes jusqu'au stade 16 cellules. Ces deux facteurs de transcription sont exprimés exclusivement par un seul de ces deux types cellulaires. Leur expression complémentaire peut être expliquée par une régulation négative mutuelle à travers une interaction directe permettant une différenciation stable (Niwa et al., 2005).

Le premier lignage permettant de spécifier l'embryon préimplantatoire est le TE. Différentes hypothèses ont alors été formulées afin de savoir comment cette décision d'aller vers un lignage ou un autre est prise lors de la phase pré-implantatoire de l'embryon (Figure 17). C'est dans cette optique que le modèle « intérieur –extérieur » (Inside-outside model) a été créé. Selon ce modèle, les cellules de l'intérieur et de l'extérieur de l'embryon sont exposées à différents contacts cellulaires et différents microenvironnements, ces différences se traduisant alors par différentes décisions cellulaires (Johnson and Ziomek, 1981).

Plus tard, avec la découverte de la polarisation du blastomère, le modèle de la « polarité cellulaire » (Cell polarity model) a été mis en place (Figure 16). Dans ce modèle, c'est la polarité cellulaire qui se traduit dans la décision d'aller vers un lignage de type TE, bien que la relation entre le lignage cellulaire et la polarité reste obscure. Une des possibilités serait que le facteur de transcription *Cdx2* soit localisé dans le domaine apical des blastomères au stade 8 cellules (Jedrusik et al., 2008). Les cellules externes, polarisées, activent la voie hippo/*Tead4* (codant pour le facteur de transcription *TEF-3*) et *Yap*, qui engendre une cascade de signalisation ayant pour fonction d'activer la surexpression du facteur *Cdx2* (Yagi et al., 2007). La protéine *Yap* est retrouvée le long de l'axe interne-externe de l'embryon et

INTRODUCTION

constitue une cible en aval de la voie Hippo (Zhao et al., 2008). Cette voie est majeure dans le contrôle du facteur de transcription Cdx2, impliqué dans la spécification du TE, bien que la protéine Tead4, agissant de concert avec Yap est distribuée ubiquitairement dans toutes les cellules de l'embryon (Nishioka et al., 2008). Les récentes études de la voie de signalisation de Hippo et de la localisation de Yap ont alors mené à un troisième modèle pour expliquer la spécification du TE, dans lequel la position cellulaire et la polarisation sont nécessaires pour diriger les deux lignages et expliquer la ségrégation entre le lignage de la MCI et du TE (Figure 16).

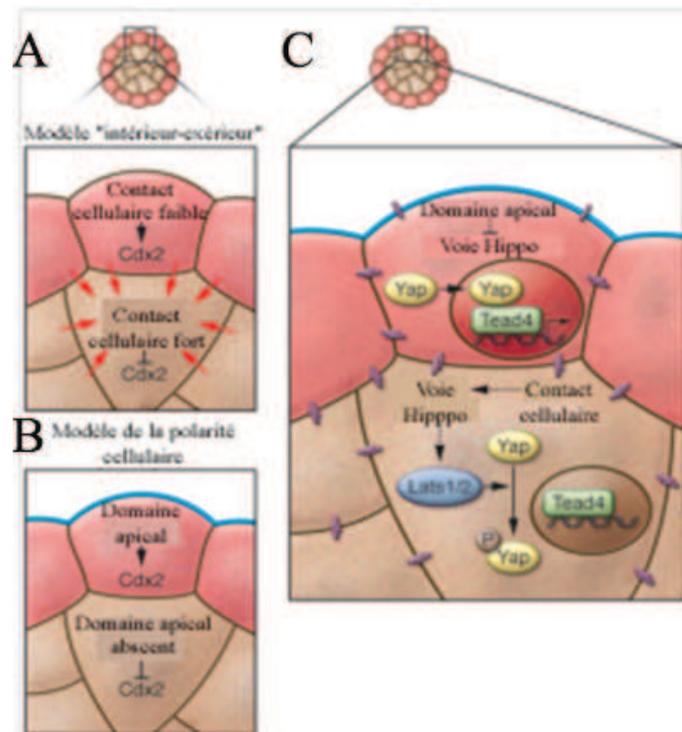


FIGURE 16 : LA SPECIFICATION DU TROPHECTODERME DANS L'EMBRYON DE MAMMIFERE (COCKBURN AND ROSSANT, 2010)

Trois modèles ont été développés quand à la spécification du TE dans l'embryon de souris : A : Le modèle « intérieur-extérieur » dans lequel les cellules de l'intérieur et de l'extérieur ne reçoivent pas le même taux de contacts cellulaires, se traduisant par des différences dans l'expression de leurs facteurs. B : Le modèle de la polarité cellulaire où la présence et l'absence d'un domaine apical est traduit par des différences dans l'expression de leurs facteurs. C : Un troisième modèle, basé sur les deux premiers, illustré par la voie Hippo, permet de mettre en lumière le rôle des protéines Yap et Tead4 dans la spécification du TE.

INTRODUCTION

Les embryons de poulet et de souris sont composés de deux feuillets cellulaires, l'épiblaste et l'hypoblaste (chez le poulet) ou encore l'endoderme primitif (chez la souris), avant la gastrulation. L'épiblaste contribue à tout l'embryon ainsi qu'à quelques tissus extra-embryonnaires. Avant la gastrulation, deux axes, antéro-postérieurs et gauche-droite (ou proximaux distaux) semblent se dessiner en fonction de l'expression génique locale (Thomas et al., 1998).

2.1.5 Le second lignage cellulaire : Ségrégation entre l'endoderme primitif (EP) et l'épiblaste (EPI) :

L'endoderme primitif (EP) est formé d'un seul feuillet cellulaire le long de la surface de l'épiblaste faisant face au blastocœle tandis que l'épiblaste (EPI) constitue une masse cellulaire située entre le EP et le TE. Les facteurs de transcription Gata4 et Gata6 sont importants pour la maturation de l'EP. Une surexpression de ces deux facteurs dans des cellules souches pluripotentes suffit à les transformer en cellules de l'EP (Fujikura et al., 2002). Nanog, quant à lui, est un facteur essentiel pour les cellules épiblastiques (Mitsui et al., 2003). Gata4 et Gata6 permettent de privilégier l'EP tout en supprimant le lignage EPI et, à l'inverse, Nanog permet de privilégier le lignage EPI tout en supprimant l'EP. En effet, l'expression de ces facteurs est souvent mutuellement exclusive, de manière aléatoire, dans un motif « poivre et sel ». En effet, une co-expression de ces deux facteurs dans une même cellule est rarement retrouvée. Avant le stade E3.5 chez la souris, les cellules de la MCI co-expriment Nanog et Gata 6, et leur expression se restreint ensuite à un seul de ces deux facteurs au cours de la maturation de la MCI (Plusa et al., 2008) (Figure 17).

Les embryons qui n'expriment pas le facteur de croissance FGF2 ne peuvent former l'EP (Arman et al., 1998), suggérant un rôle primordial de la signalisation du FGF2 dans l'engagement cellulaire vers l'endoderme primitif.

INTRODUCTION

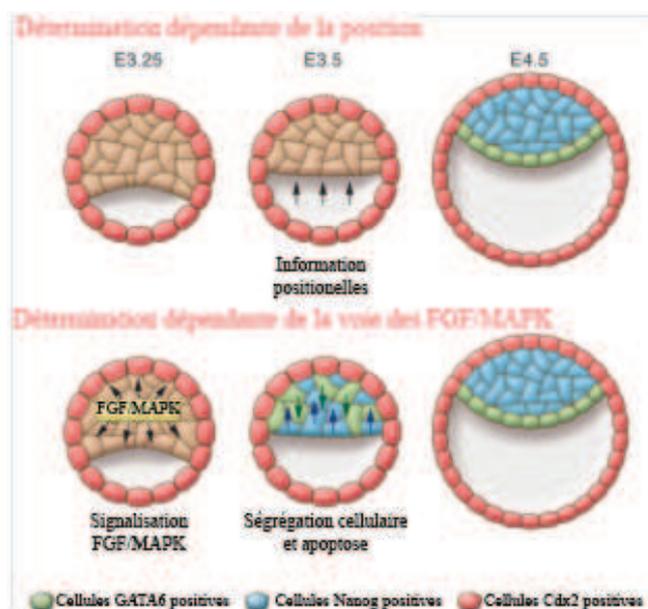


FIGURE 17 : FORMATION DU SECOND LIGNAGE (COCKBURN AND ROSSANT, 2010)

Deux modèles sont proposés pour la formation du second lignage. Un modèle dont la détermination cellulaire est dépendante de la position des cellules dans la MCI du blastocyste murin à E3.5, composé de cellules bi-potentes entourées des cellules de l'endoderme primitif. Dans un second modèle, la détermination est dépendante de la signalisation des FGFs et MAPKs. Dans ce modèle, les cellules sont à la base bi-potentes, et ce sont les différences dues à la voie de signalisation des FGFs qui va les rendre positives pour le facteur GATA4 ou le facteur Nanog. Les cellules de l'endoderme primitif, expriment, quand à elles, le facteur de transcription Cdx2.

2.1.6 La préimplantation de l'embryon humain :

Bien que l'échelle de temps de développement de l'embryon humain diffère de celui de l'embryon de souris, les événements cellulaires et moléculaires se produisant durant la phase pré-implantatoire sont très similaires entre ces deux organismes (Figure 18). L'étude de l'embryon précoce humain, pour des raisons éthiques, reste encore très difficile à réaliser, même avant la phase de pré-implantatoire. Toutefois, quelques données ont été obtenues et on sait que les régulateurs du lignage primaire comme Oct4, Sox2, Nanog et Cdx2 sont présents dans le blastocyste humain (Adjaye et al., 2005). L'expression du facteur de transcription Oct4 n'est pas réduite à la MCI, mais est retrouvée dans tout l'embryon humain, même après la phase blastocytaire (Cauffman et al., 2009). Cdx2 n'est pas exprimé avant E5.0, lorsque l'épithélium externe du blastocyste est formé (Chen et al., 2009), suggérant que la phase de restriction des lignages dans le blastocyste est plus tardive chez l'humain que chez la souris.

INTRODUCTION

La formation du second lignage est encore moins bien documentée. On sait que Nanog n'est pas exprimé par toutes les cellules du blastocyste humain (Kimber et al., 2008), mais on ne sait pas comment cette expression peut influencer la restriction des lignages secondaires dans l'embryon humain, ni à quels jours embryonnaires ceux-ci se produisent, ni même si le FGF est important ou non dans l'établissement de ces lignages.

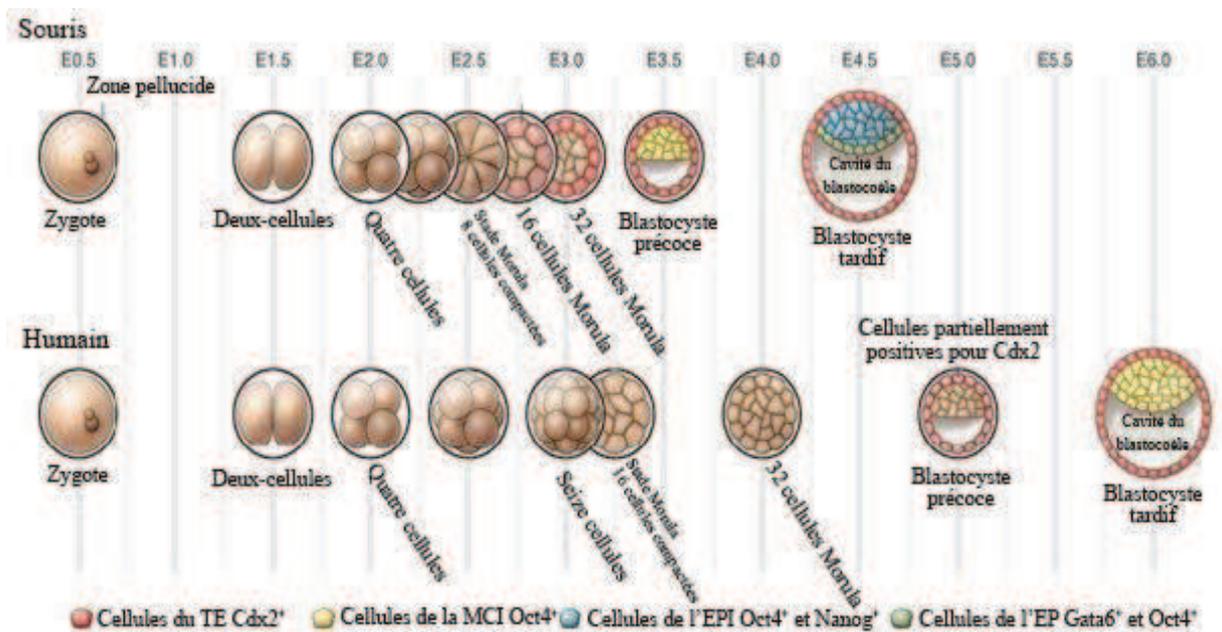


FIGURE 18 : LA PHASE DE PREIMPLANTATION DANS L'EMBRYON DE MAMMIFERE D'APRES COCKBURN ET ROSSANT (COCKBURN AND ROSSANT, 2010)

Le développement de l'embryon murin et humain est relativement similaire. Le stade blastocyste précoce est défini à jour E3.5 chez la souris, tandis qu'il apparaît à E5 chez l'humain. Le stade blastocyste tardif, observé à E4.5 chez la souris, est observé à E6 dans l'embryon humain. Les cellules du trophoctoderme, positives pour le facteur de transcription Cdx2 sont ici colorées en rouge et les cellules positives pour Oct4, de la masse cellulaire interne, en jaune. Les cellules de l'épiblaste (EPI) positives pour Oct4 et Nanog en bleues, tandis que les cellules positives pour Oct4 et GATA6 sont colorées en rouge.

2.1.7 L'implantation :

Quatre jours après la fécondation, les embryons commencent à interagir avec l'épithélium utérin, ce qui va initier l'implantation. C'est à ce moment qu'un autre type de cellules commence à apparaître dans la MCI faisant face à la cavité du blastocyste. Cette population de cellules est alors appelée « endoderme primitif » et contribuera alors à toutes les annexes embryonnaires après implantation. Cette population va alors perdre l'expression

INTRODUCTION

du facteur de transcription Nanog (Chambers et al., 2003). A ce stade, une faible proportion de ces cellules commence à exprimer le facteur de transcription GATA6, de manière aléatoire et dispersée (Rossant et al., 2003). L'endoderme primitif va alors donner naissance à deux types de cellules, les cellules de l'endoderme pariétal, et celles de l'endoderme viscéral, ce dernier ayant un rôle important dans la spécification de la partie antérieure de l'embryon (Brennan et al., 2001).

2.1.8 La gastrulation :

La gastrulation débute par l'apparition de la ligne primitive commençant à l'extrémité postérieure de l'embryon, là où se forme le nœud. C'est un processus fondamental de l'embryogénèse animale mettant en jeu des réarrangements cellulaires et des mouvements permettant le repositionnement et l'arrangement structural des lignages, créant ainsi une organisation interne ayant un impact sur la forme externe de l'animal en cours de développement (Solnica-Krezel and Sepich, 2012). C'est durant ce processus que les 3 feuillets de l'embryon acquièrent une spécification (Arnold and Robertson, 2009). Contrairement aux autres embryons, les embryons de mammifères initient la gastrulation alors qu'ils ne possèdent qu'une centaine de cellules (Tam et al., 2007). Chez les primates et les rongeurs, la gastrulation se met en place alors que l'embryon est déjà implanté tandis que chez les autres mammifères, le plus souvent, il bouge librement dans l'oviducte (Eakin and Behringer, 2004). La première ségrégation des cellules au sein de l'embryon donne naissance à deux types cellulaires distincts. Une couche inférieure, l'hypoblaste, appelée aussi l'endoderme primitif, et une couche extérieure, juste au dessus, appelée épiblaste, constituant le reste de l'embryon (Gilbert, 2003). L'épiblaste consiste en une monocouche de cellules organisées comme un épithélium pseudostratifié, qui peut être plat (chez les primates et les marsupiaux) ou ovoïde (souris, rongeurs). Les mouvements de la gastrulation sont initiés lorsque la ligne primitive est formée dans la partie proximale postérieure des cellules de l'épiblaste, initiant alors la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) (Williams et al., 2012). Cette ligne joue un rôle de porte d'entrée pour l'internalisation des cellules endodermiques et mésodermiques. Les cellules du mésoderme envahissent alors l'espace

INTRODUCTION

entre l'épiblaste et l'endoderme viscéral tandis que la ligne primitive s'allonge de façon distale le long du côté postérieur de l'embryon. Ce mésoderme internalisé va ensuite se propager à partir de la ligne primitive, tout comme l'endoderme (Ewald et al., 2004) (Figure 19). C'est à ce moment que l'on détecte les premiers transcrits du facteur de transcription Brachyury (T) dans l'embryon de souris dans le mésoderme postérieur, à côté de la ligne primitive ainsi que dans l'endoderme (Wilkinson et al., 1990).

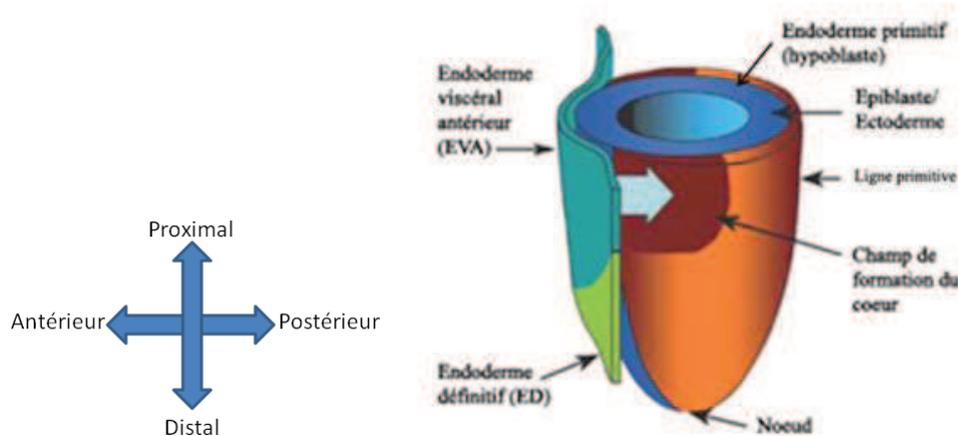


FIGURE 19 : LA GASTRULATION D'APRES LIU ET FOLEY 2010 (LIU AND FOLEY, 2010)

Au niveau postérieur, la ligne primitive, qui va donner le noeud est responsable de l'initiation de la gastrulation et de la formation des 3 feuillets embryonnaires. Une fois l'axe antéropostérieur établi, la gastrulation débute avec l'allongement de la ligne primitive nouvellement formée guidée par le centre organisateur précoce (noeud). Certaines cellules de l'épiblaste opèrent une transition épithélio-mésenchymateuse et migrent vers l'intérieur de la ligne primitive pour former l'endoderme et le mésoderme tandis que les cellules qui conservent un caractère épithélial et restent confinées en dehors de la ligne primitive constituent l'ectoderme.

Les cellules perdent alors l'E-cadhérine, s'autonomisent et migrent à travers la ligne primitive (Burdal et al., 1993). L'endoderme va ensuite se spécifier pour donner naissance à l'endoderme définitif, par le biais de la voie Nodal (Takenaga et al., 2007). Cette migration et spécification cellulaire dépendent des FGFs, les cellules de la ligne primitive étant capables à la fois de synthétiser ces molécules et d'y répondre (Ciruna and Rossant, 2001; Lu et al., 2001). Parmi d'autres facteurs, le FGF8 joue un rôle primordial dans ce processus cellulaire. En effet, les embryons invalidés pour ce gène sont incapables de former ni le mésoderme, ni l'endoderme, les cellules ne pouvant plus migrer le long de la ligne primitive (Sun et al.,

INTRODUCTION

1999). Pendant ce temps, les cellules extra-embryonnaires forment des tissus qui permettent à l'embryon de survivre dans l'utérus maternel. Les cellules du trophoblaste donnent naissance au cytotrophoblaste, permettant à l'embryon de s'implanter à l'endomètre par le biais de molécules d'adhérence mais aussi d'enzymes protéolytiques exprimées par ce tissu. Un deuxième tissu est aussi formé, appelé syncytiotrophoblaste, permettant la progression de l'embryon dans la paroi de l'utérus (Fisher et al., 1989).

2.2 La cardiogenèse :

Chez les vertébrés, le cœur est le premier organe à être formé. Il possède un rôle vital dans la distribution des nutriments et de l'oxygène dans l'embryon. Au début de l'embryogénèse, cet organe fonctionne principalement comme un tube cardiaque et permet, par sa force contractile, de pomper le sang à travers le corps comme une pompe centrale.

2.2.1 La morphogénèse du cœur :

Les progéniteurs cardiaques sont les premières cellules à subir la gastrulation, émergeant de la ligne primitive (Tam et al., 1997). Ces cellules, dérivées du mésoderme sont formées dans la plaque latérale au cours de la TEM et ont été identifiées par des expériences de cartographie de l'embryon à E6.5 (Rossant and Tam, 2004) (Figure 20a).

Le mésoderme de la plaque latérale forme deux nouveaux feuilletts cellulaires, le somatopleure et le splanctopleure. Ce dernier subit une deuxième TEM pour donner naissance au mésoderme splanchnique à l'origine du champ cardiaque primaire (CCP) et sans doute d'une partie de l'endocarde. Les cellules mésodermiques vont ensuite migrer latéralement et cranialement pour former deux groupes de cellules de part et d'autre de la ligne médiane. La fusion de ces deux groupes formera le croissant cardiaque au dessous de l'ébauche craniale (Lough and Sugi, 2000). Le tube cardiaque précoce se forme ensuite à E8 par fusion de la ligne primitive et du croissant cardiaque (Figure 20b et 21b). Des cellules du second champ cardiaque (SCC) dérivées du mésoderme pharyngé, à plus fort potentiel prolifératif migrent vers la ligne médiane pour se positionner dorsalement par rapport au tube

INTRODUCTION

primaire en formation (Figure 21c). Ces cellules permettent l'allongement du tube à ses deux pôles (Cai et al., 2003).

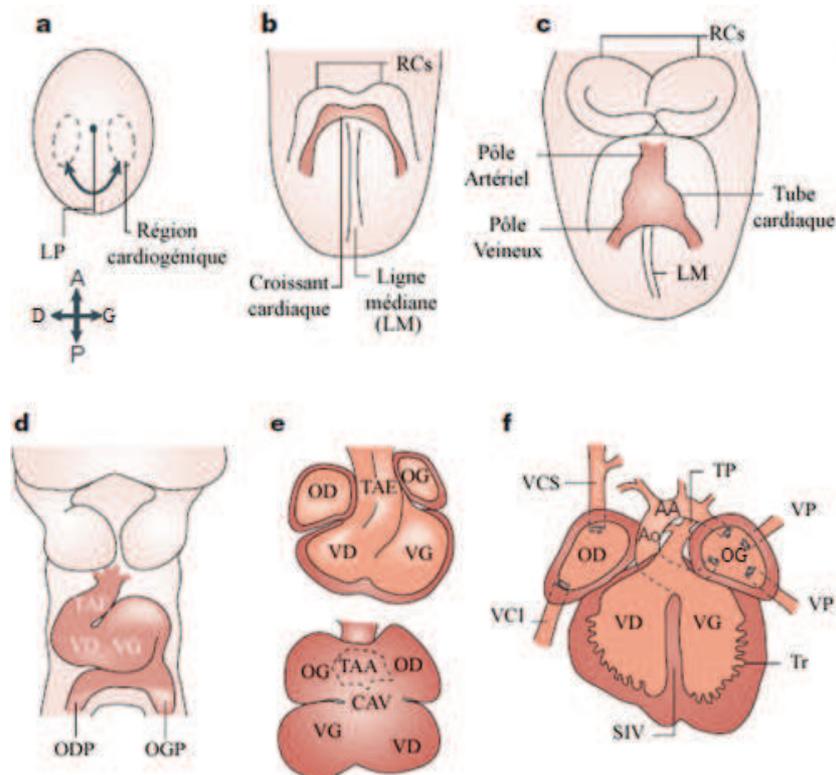


FIGURE 20 : MORPHOGENESE DU CŒUR DE SOURIS D'APRES BUCKINGHAM. ET COLL (BUCKINGHAM ET AL., 2005)

AA : Arc Aortique ; Ao : Aorte ; CAV : Canal Atrio-Ventriculaire ; OD : Oreillette Droite ; ODP : Oreillette Droite Primitive ; OG : Oreillette Gauche ; OGP : Oreillette Gauche Primitive ; PT : Tronc pulmonaire ; RC : Repli cardiaque ; SIV : Septum interventriculaire ; TAA : Tronc Artériel afférent ; TAE : Tronc Artériel efférent ; Tr : Trabéculations ; VCI : Veine Cave Inférieure ; VCS : Veine cave supérieure ; VD : Ventricule droit ; VP : Veine pulmonaire ; VG : Ventricule Gauche

Le tube cardiaque subit ensuite une torsion par la droite, sa région postérieure se retrouvant alors en position antérieure, permettant d'arriver à un cœur possédant des chambres délimitées. Ces chambres se forment par expansion du myocarde et prolifération des cellules du SCC (Figure 20d). A E10.5, le cœur acquiert des chambres bien définies, même si son organisation reste encore rudimentaire (Figure 20e). C'est à E14.5 que l'on pourra observer la septation, qui va permettre la séparation des chambres. Cela permettra d'observer deux types

INTRODUCTION

de circulation après la naissance : la circulation artérielle (systémique) et la circulation pulmonaire. Cette organisation est possible grâce à la connexion des chambres au tronc pulmonaire (TP) et l'aorte (Ao) (Figure 20f). Le sang désoxygéné rentre alors dans le cœur à travers l'oreillette droite (OD) et est amené aux poumons à travers le ventricule droit (VD). Le sang oxygéné est ramené des poumons vers le cœur à travers l'oreillette gauche (OG) et est distribué à travers le corps entier via l'aorte (Ao) grâce à sa propulsion par le ventricule gauche (VG).

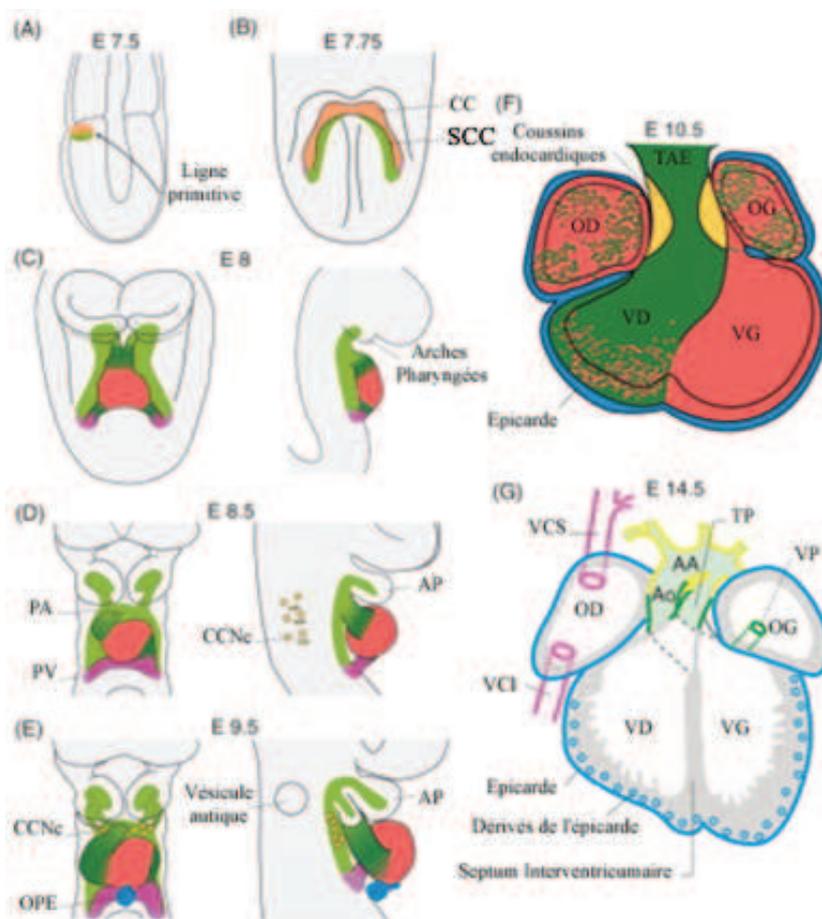


FIGURE 21 : ORIGINE ET REGULATION DES PROGENITEURS CARDIAQUES D'APRES S.VINCENT ET M.BUCKINGHAM (VINCENT AND BUCKINGHAM, 2010)

AA : Arc Aortique ; Ao : Aorte ; AP : Arches Pharyngées ; CC : Croissant Cardiaque ; CCNc : Cellules de la crête neurale de type cardiaque ; SCC : Second champ cardiaque ; OD : Oreillette Droite ; OG : Oreillette Gauche ; OPE : Organe Proépicaudique ; PA : Pole artériel ; PV : Pole Veineux ; TP : Tronc Pulmonaire ; VCI : Veine Cave Inférieure VCS : Veine cave supérieure ; VD : Ventricule droit ; VP : Veine pulmonaire ; VG : Ventricule Gauche

INTRODUCTION

2.3 Les facteurs de transcription contribuant à la cardiogenèse :

Les facteurs de transcription spécifiquement mésodermiques les plus précoces sont MesP1 (Mesoderm postérieur 1) et MesP2 (Mesoderm postérieur 2). Exprimés de manière transitoire dans l'embryon, ils sont nécessaires à la migration des cellules cardiaques pendant la gastrulation (Saga et al., 1999) et sont régulés par le facteur de transcription Tbx6 (Yasuhiko et al., 2008). Ces facteurs sont nécessaires au dédoublement de ces cellules de la ligne primitive, autrement appelée délamination (Saga et al., 1999). Ils agissent comme un acteur principal du destin cellulaire des cellules souches embryonnaires (Bondué et al., 2008). L'injection de l'ARN de MesP1 dans le *Xénopus* mène à la formation d'un cœur ectopique. Ce facteur de transcription aurait un rôle indirect sur la voie de signalisation Wnt, en induisant l'inhibiteur de celui-ci, Dkk1, ce qui a été démontré *in vitro* (Lindsley et al., 2008), en montrant aussi que les cellules exprimant MesP1 subissaient une transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) (Kitajima et al., 2000).

Le cœur n'est pas seulement un organe composé de muscles, il est aussi composé de l'endocarde, un endothélium vasculaire qui revêt la partie interne de celui-ci. Il partage l'expression de facteurs de transcription comme GATA4, GATA5 et Nkx2.5 avec le myocarde primitif. Après les facteurs de transcription MesP, les facteurs GATA4 et Nkx2.5 sont exprimés dans le croissant cardiaque où la différenciation myocardique se met en place. Les facteurs de transcription appartenant à la famille des T-Box (Tbx5, Tbx20), des bHLH (Hand1/2) ou encore à la famille des MADS-box (Mef2c) se révèlent comme étant cruciaux à la morphogénèse du cœur et sont impliqués très tôt dans la différenciation des cellules du croissant cardiaque. Le facteur de transcription Gata4 (Laforest and Nemer, 2011), en association avec Baf60c, va activer Nkx2.5 qui agit avec Gata4 afin d'initier le programme cardiaque (Takeuchi and Bruneau, 2009).

Une disparition de l'expression des gènes Nkx2.5, Mef2c ou encore GATA4 n'est pas capable d'empêcher une abrogation complète de la différenciation myocardique mais peut altérer la fusion des champs cardiaques bilatéraux dans la ligne primitive (Molkentin et al.,

INTRODUCTION

1997), ou encore impacter sur une diversification du muscle cardiaque, d'une formation des chambres myocardiques, ou de la maturation du myocarde (Lin et al., 1997; Lyons et al., 1995; Prall et al., 2007). SRF (Serum Response Factor) constitue aussi un facteur de transcription important dans la différenciation cardiaque. Des souris KO pour ce facteur meurent à un stade très précoce du développement, bien avant de développer le mésoderme (Arsenian et al., 1998). La famille des facteurs de transcription Hand constitue aussi un pool important de facteurs de transcription permettant de contribuer au développement du cœur. Hand1, un facteur de transcription Nkx2.5 dépendant, est un marqueur précoce du ventricule gauche (Biben and Harvey, 1997) et Hand 2, exprimé dans le ventricule droit, est nécessaire à la morphogénèse de celui-ci. Les autres facteurs de cette famille sont exprimés plus tardivement au cours du développement cardiaque. Ces facteurs de transcription contrôlent la différenciation du myocarde primitif (où les chambres ne sont pas encore formées), mais aussi des oreillettes et des ventricules. Enfin, Isl1, un facteur de transcription de type LIM-homeobox, se révèle comme étant essentiel à la cardiogenèse. Exprimé par des cellules dérivées des 3 feuilletts, on croyait son expression spécifiquement cardiaque et restreinte aux cellules du second champ cardiaque (Cai et al., 2003; Sun et al., 2007). Cependant, son expression a été retrouvée dans le champ primaire dans une publication parue dans la revue *Cell* en 2007 (Prall et al., 2007).

Les interactions de ces molécules sont complexes. Nkx2.5 après MesP, est le premier de ces facteurs de transcription à être exprimé, et est impliqué dans l'expression des gènes comme SRF, GATA4, Mef2c, Tbx20, Tbx2, Tbx5 ou encore Hand1 qui eux-mêmes régulent l'expression de Nkx2.5 (Tanaka et al., 1999). Ceux-ci ont ensuite une influence sur l'expression des gènes de l'appareil contractile comme Mlc2v, cTnt, et l' α -actinine cardiaque mais aussi sur les différents domaines cardiaques en agissant sur Nppa, la connexine 40, myocardine ou encore, l'ANP (Atrial Natriurétique Peptide) (Akazawa and Komuro, 2005; Mori et al., 2006).

INTRODUCTION

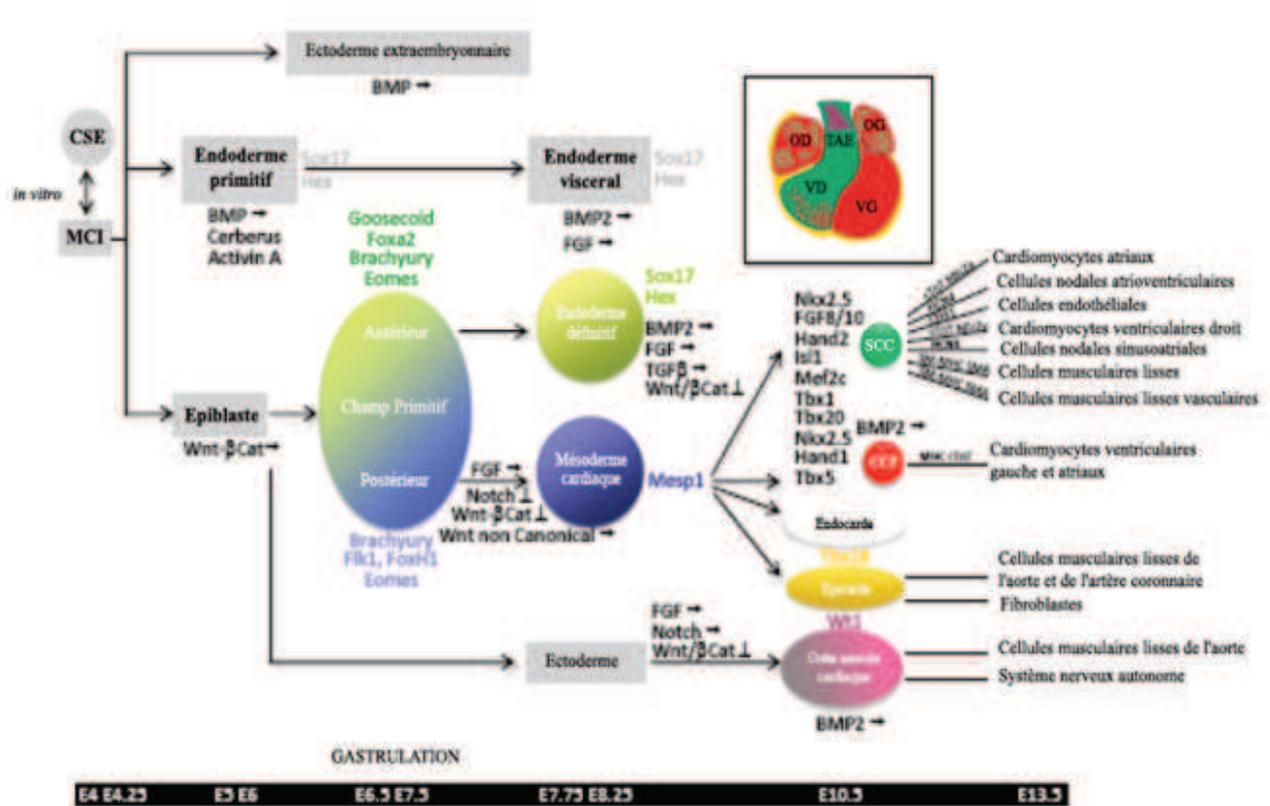


FIGURE 22 : LES RESEAUX DE REGULATION CARDIAQUE D'APRES BLIN ET AL. (Blin et al., 2010)

Les facteurs ayant un effet gène-dosage sont en bleu. FoxH1 : Forkhead box H1 ; GATA4/6 : GATA-Binding protein 4 and 6 ; Hand2 : Heart and neural crest derivatives expressed transcripts 2 ; Isl1 : Insulin gene enhancer protein (Facteur de transcription à domain LIM) ; Mef2c : Myocyte enhancer factor 2C ; MesP1 : Mesoderm Postérieur 1 ; Nkx2.5 : NK2 transcription Factor related, locus 5 ; Sox17 : Sex-determining region Y-box17.

Tous ces facteurs de transcription permettent, avec les voies de signalisation associées d'aboutir à différents types cellulaires hautement spécialisés, contribuant à la cardiogenèse (Figure 22).

2.4 Les voies de signalisation impliquées dans le développement embryonnaire des mammifères :

Les progéniteurs cardiaques répondent à différents signaux provenant de l'endoderme pharyngé permettant la différenciation en différents tissus cardiaques (Lough and Sugi, 2000). Ces signaux appartiennent à la superfamille du TGFβ (Puceat, 2007), Shh (Zhang et al., 2001)

INTRODUCTION

ou encore des FGFs (Lopez-Sanchez et al., 2002). Ils peuvent aussi être indépendants de l'endoderme, comme la voie canonique des Wnts, produite par l'ectoderme et la notochorde (Schneider and Mercola, 2001) ou encore le mésoderme pré-cardiogénique avec la voie de signalisation de Notch (Rones et al., 2000) (Figure 22).

2.4.1 La voie Wnt

La voie Wnt est essentielle pour la formation du cœur mais aussi pour le blocage de celle-ci. Les Wnts peuvent se diviser en deux classes, en fonction de leur mode de régulation : la voie canonique, activant le complexe β -Caténine/TCF dans le noyau, et la voie non canonique. Ces deux voies sont essentielles pour la formation du cœur.

2.4.1.1 La voie canonique

En absence de Wnt, la β -Caténine est liée au complexe Axine, APC et GSK3 β qui la phosphorylent, entraînant son adressage au protéasome. Lorsque Wnt est présent, il lie ses récepteurs Lrp6 et Fz, résultant en une activation de Dsh. Ce phénomène entraîne alors l'inhibition de l'Axine, qui se désagrège du complexe qu'elle forme avec APC et GSK3 β . La β -Caténine peut alors s'accumuler dans le cytosol (Figure 23).

L'accumulation nucléaire de β -Caténine est responsable de l'activation transcriptionnelle des facteurs responsables de la localisation de l'endoderme et du mésoderme dans l'embryon. Les embryons KO pour cette molécule se retrouvent alors dans l'incapacité de former du mésoderme (Huelsen et al., 2000). Il est possible que la β -Caténine ait une influence sur la formation du mésoderme en déterminant la position initiale du facteur de transcription Nodal dans l'embryon (Hashimoto-Partyka et al., 2003).

Ensuite, au cours de la formation du mésoderme, cette voie de signalisation n'est plus nécessaire mais au contraire va contribuer à l'inhibition de celui-ci (Marvin et al., 2001). Les facteurs d'inhibition de Wnt comme Crescent, Dkk1 (Schneider and Mercola, 2001) et XDbf4 vont alors activer la formation du cœur (Brott and Sokol, 2005). Les inhibiteurs de Wnt

INTRODUCTION

comme Dkk1 n'agissent pas directement sur le mésoderme précardiaque mais induisent l'expression de différents facteurs présents dans l'endoderme adjacent (Foley and Mercola, 2005) à l'aide de son activité C-terminale. Plus tard dans la cardiogenèse, la voie canonique des Wnts sera nécessaire à la maintenance et à la prolifération des progéniteurs cardiaques du second champ cardiaque, ainsi que pour la formation des coussins cardiaques et des valves (Rochais et al., 2009). La voie canonique des Wnts est donc nécessaire à la formation du cœur, à des temps très précis de la différenciation. En effet, la voie Wnt possède plusieurs effets, dépendants de la fenêtre d'activation au cours de la différenciation. Par exemple, chez le zébrafish, si on induit le facteur Wnt8 avant la gastrulation, plus de cardiomyocytes seront formés alors que si on l'induit après, c'est le contraire qui se produit.

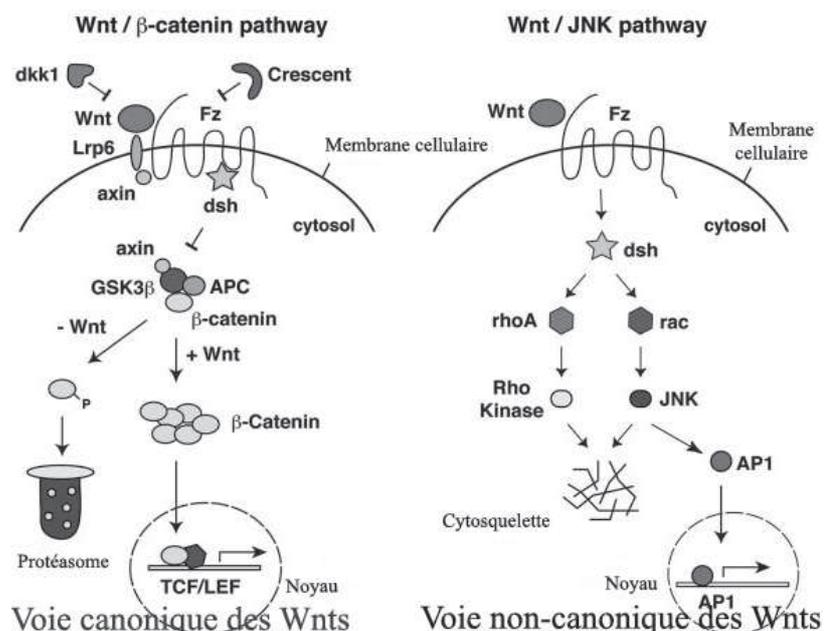


FIGURE 23 : LA VOIE WNT D'APRES GESSERT ET KÜHL (GESSERT AND KUHL, 2010)

Voie canonique : Lorsque Wnt n'est pas lié à son récepteur Frizzled, la β -Caténine est prise en charge par le complexe Axin, APC et GSK3 β , puis adressée au protéasome. Lorsque Wnt est lié à son récepteur, on observe alors une accumulation de β -caténine dans le cytoplasme qui va être ensuite transloquée dans le noyau et se lier à TCF afin d'activer ses gènes cibles.

Voie non-canonique : Lorsque Wnt se lie à Frizzled, son récepteur, la protéine dsh est activée, puis active ensuite les petites protéines Rho et Rac, activant respectivement Rho Kinase et Jnk, permettant le remodelage du cytosquelette. Jnk va aussi activer AP1, qui va activer ses gènes cibles après translocation au noyau.

INTRODUCTION

2.4.1.1 La voie non canonique :

La voie non canonique des Wnts commence par l'interaction de Wnt avec son récepteur Fz, menant à l'activation de Dsh qui active ensuite des petites GTPases comme RhoA et Rac. Cette activation résulte en un réarrangement du cytosquelette. Jnk peut aussi activer AP-1, qui va se transloquée dans le noyau pour activer les gènes cibles de la voie Wnt.

En plus de son activité en partie C-terminale qui permet de bloquer la voie Wnt/ β -caténine canonique, Dkk1 peut bloquer la voie non-canonique des Wnt en phosphorylant Jnk (Pandur et al., 2002). Cette phosphorylation s'effectue par le facteur Wnt11, qui peut à lui seul induire la cardiogenèse (Terami et al., 2004).

2.4.2 La voie du TGF β :

La voie principale du TGF β est divisée en deux : d'un côté, la voie TGF β /Nodal/activine, agissant via SMAD2 et 3, et de l'autre, la voie BMP et GDF, agissant par le biais de SMAD1, 5 et 8. Ces voies de signalisation jouent un rôle important dans l'établissement des axes embryonnaires, l'induction du mésoderme et la régulation de la différenciation, la prolifération et la différenciation terminale des cellules. Néanmoins, une partie de la voie du TGF β agit via des seconds messagers SMAD-indépendants (Derynck and Zhang, 2003).

2.4.2.1 Nodal :

Nodal, dès l'étape de pré-gastrulation chez l'embryon participe à la formation de l'axe antéropostérieur, à la TEM et à la spécification de l'endoderme (Arnold and Robertson, 2009). Il agit via son co-récepteur, cripto, et permet la différenciation cardiaque des cellules de l'embryon, en agissant indirectement sur le mésoderme via les cellules de l'endoderme. Dans l'embryon murin précoce, nodal est requis pour la formation de l'endoderme viscéral (EV), plus précisément pour la mise en place des marqueurs de l'endoderme viscéral antérieur (EVA) (Mesnard et al., 2006). Cet EVA est indispensable à la formation du cœur car les signaux provenant de celui-ci se sont révélés comme étant nécessaires et suffisants à la

INTRODUCTION

formation du cœur chez la souris (Nijmeijer et al., 2009), les amphibiens (Nascone and Mercola, 1995) et le poulet (Matsui et al., 2005). On peut aussi noter que cette activation de la formation du cœur par l'activine et nodal active aussi l'expression de l'inhibiteur de nodal, Cerberus, qui est requis pour la formation du cœur. En effet, on peut observer des défauts de septation chez les souris mutantes pour cette protéine (Marques et al., 2004).

2.4.2.2 BMPs (Bone Morphogenic Proteins) :

La liaison des BMPs sur leurs récepteurs induit l'activation de la voie du TGF β via la phosphorylation de SMAD2/3. Les BMPs peuvent aussi agir via une voie SMAD indépendante, la voie des MAP kinases : TAB2/TAK1 (van Wijk et al., 2007). Ces molécules sont nécessaires pour la gastrulation (Beppu et al., 2000; Mishina et al., 1995) et la formation du mésoderme. De plus, si on bloque la signalisation du BMP2 via son inhibiteur SMAD-6 ou par un dominant négatif de son récepteur, la différenciation terminale est bloquée (Edwards et al., 1981). Néanmoins, le blocage du récepteur ALK3 dans l'épiblaste de l'embryon de souris révèle que la voie de signalisation du BMP2 n'est pas nécessaire pour l'induction des marqueurs cardiaques mais est nécessaire pour maintenir leur expression (Mishina et al., 2002).

Les FGFs et Notch interviennent ensuite plus tard au cours du développement embryonnaire. Une fois que les champs cardiaques sont établis, ils contrôlent la prolifération et le destin des progéniteurs cardiaques.

2.4.3 La voie Notch

Notch agit à des temps différents de la cardiogenèse. Pendant la spécification des cellules cardiaques Notch supprime la cardiogenèse (Rones et al., 2000). Il a été observé une augmentation des progéniteurs Nkx2.5+ lors d'une délétion de Notch (Kwon et al., 2009), hypothétiquement due au fait que Notch pourrait atténuer l'effet de la voie canonique des Wnts. Notch possède aussi un rôle dans la prolifération et la trabéculatation des ventricules (Watanabe et al., 2006).

INTRODUCTION

2.4.4 La voie des FGFs

Les FGFs sont impliqués dans la survie et la prolifération des progéniteurs cardiaques (Sugi and Lough, 1995). Dans l'épicaarde, les FGFs contrôlent la prolifération du myocarde (Lavine et al., 2005). FGF8 est nécessaire à la prolifération du second champ cardiaque, permettant l'alignement du tronc cardiaque efférent avec les ventricules (Ilagan et al., 2006)

Dans ce chapitre, nous avons vu les principales étapes du développement embryonnaire et les mécanismes conduisant à la cardiogenèse. La morphogénèse du cœur est un phénomène complexe et multifactoriel qui dépend de nombreux paramètres. Nous avons pu passer en revue les principaux facteurs de transcription utilisés comme marqueurs de différenciation cardiaques *in vitro*, et lister les voies nécessaires à la différenciation. Les données provenant de l'embryogénèse sont donc indispensables pour travailler sur les cellules souches pluripotentes car ils permettent de comprendre les mécanismes mis en jeu dans la différenciation et nous apportent de nombreuses et précieuses informations pour la modélisation du développement cardiaque *in vitro*.

INTRODUCTION

3 Les cellules souches embryonnaires et les cellules à pluripotence induite : modèles de développement pour mieux comprendre les laminopathies :

3.1 La découverte des cellules souches :

Les cellules souches ont été découvertes dans le début des années 60 par une équipe Canadienne de Toronto, le Dr McCulloch et le Dr Till, respectivement biologiste et physicien. Ces scientifiques étudiaient alors les effets des radiations nucléaires émises par les bombes sur les soldats et utilisaient comme modèle des souris de type sauvage irradiées auxquelles ils fut injecté des cellules de moelle osseuse (McCulloch and Till, 1960). Il firent l'observation de colonies de cellules dans des nodules de rate des souris, apparaissant proportionnellement au nombre de cellules de moelle osseuse injectées (Till and McCulloch, 1961). C'est cette expérience qui leur permit de formuler l'hypothèse que chaque nodule provenait d'une seule cellule de moelle osseuse : peut être une sorte de cellule souche. C'est en 1963 qu'ils publient leurs travaux, les premiers démontrant l'existence des cellules souches hématopoïétiques avec Becker dans la revue *Nature* (Becker et al., 1963).

Les cellules souches pluripotentes ont été dérivées pour la première fois en 1975 par Martin et ses collaborateurs. Il s'agissait alors de cellules de tératocarcinomes (Martin, 1975) qu'ils réussirent à différencier en corps embryoides. Les premières cellules souches embryonnaires murines ont ensuite été dérivées en Angleterre par Kaufman and Evans (Evans and Kaufman, 1981). C'est ce qui leur valut l'obtention du prix Nobel de Physiologie et Médecine avec Capecchi and Smithie en 2007. Parallèlement aux travaux des anglais, Martin dérive pour la première fois la même année les premières cellules souches d'un embryon de souris aux Etats-Unis (Martin, 1981).

Il faut attendre ensuite 15 ans, dans les années 1995, pour que les premières cellules souches de primates voient le jour. Deux ans plus tard, le groupe de Thomson isole les premières cellules souches embryonnaires humaines (CSEh) (Thomson et al., 1998).

INTRODUCTION

C'est en 2006 que le groupe de Yamanaka met au point les cellules souches à pluripotence induite avec des fibroblastes de peau de souris (miPS). Ce type de cellules a été obtenu par transfection des gènes c-Myc, Oct3/4, SOX2 et Klf4 dans des fibroblastes murins à l'aide d'un rétrovirus. Ces gènes ont été sélectionnés parmi 24 gènes candidats (Takahashi and Yamanaka, 2006). Ces cellules ont ensuite été sélectionnées pour leur capacité à exprimer Oct3/4 et Nanog, deux gènes impliqués dans la pluripotence, mais aussi leur faculté à former des chimères chez la souris adulte (Okita et al., 2007; Wernig et al., 2007). Les cellules souches humaines à pluripotence induite (hiPS) ont ensuite été établies en 2007 par deux jeux de facteurs de transcription: l'équipe japonaise de Yamanaka a utilisé c-Myc, Oct3/4, SOX2 et Klf4 et celle de Thomson aux Etats-Unis Oct3/4, SOX2, lin28 et Nanog pour reprogrammer des fibroblastes humains (Takahashi et al., 2007; Yu et al., 2007).

3.2 Définition d'une cellule souche :

La cellule souche est définie comme une cellule ayant la capacité de s'auto-renouveler et de se différencier (McCulloch EA and Till 1963). Une cellule progénitrice dérivée de cette cellule souche après division aura deux destinées : soit elle maintient les propriétés propres aux cellules souches, ce qui fait donc d'elle une cellule ayant la propriété de s'auto-renouveler ; soit elle perd cette capacité, et se différencie (Martin, 1975).

L'auto-renouvellement permet la création d'au moins une cellule fille identique à la cellule souche afin de maintenir le pool de cellules souches dans la niche cellulaire (Li and Xie, 2005), grâce à la division asymétrique (Neumuller and Knoblich, 2009). La différenciation, aboutissant à la production de progéniteurs ayant un potentiel de différenciation plus restreint permet par des division successives d'aboutir à un tissu organisé (McCulloch and Till, 2005).

Au-delà de ces deux propriétés fondamentales, les cellules souches sont identifiées et nommées en fonction de leur provenance (ex : cellules souches neurales) ou de leur place dans le développement (cellules souches embryonnaires ou cellules souches adultes). De

INTRODUCTION

même, on peut classifier les cellules souches en fonction de leur potentiel de différenciation (Figure 24) (Yamanaka and Blau, 2010) :

- La cellule totipotente peut donner lieu à tout type de cellule. Elle correspond au stade zygote ou œuf fertilisé et peut former, par divisions successives, un individu entier incluant les annexes extra embryonnaires comme le placenta. Ce sont les cellules les plus primitives. Elles apparaissent à la fécondation et disparaissent au stade 4 à 8 cellules.
- La cellule pluripotente (cellule souche embryonnaire) peut donner lieu à tous les types de cellules d'un individu à l'exception du placenta et des tissus extra-embryonnaires. Elle ne peut pas former d'embryon mais forment les trois feuillets embryonnaires (mésoderme, endoderme, ectoderme).
- La cellule multipotente, comme par exemple la cellule souche mésenchymateuse, peut former n'importe quel type de cellule du même lignage. Cette cellule a un potentiel de différenciation assez restreint car elle peut former un nombre limité de types cellulaires en fonction du tissu duquel elle provient. Ces cellules sont capables de s'auto-renouveler pendant toute la durée de vie d'un organisme.
- La cellule unipotente, quant à elle, va former un seul type de cellule dans le même lignage, comme par exemple les cellules satellites du muscle.

Afin d'étudier une maladie génétique comme les laminopathies comprenant un phénotype très précoce, le recours aux cellules souches pluripotentes semble être le modèle le plus pertinent, car il permet d'étudier les stades les plus précoces de la différenciation cardiaque *in vitro*, et ainsi de modéliser la maladie de manière très précoce.

INTRODUCTION

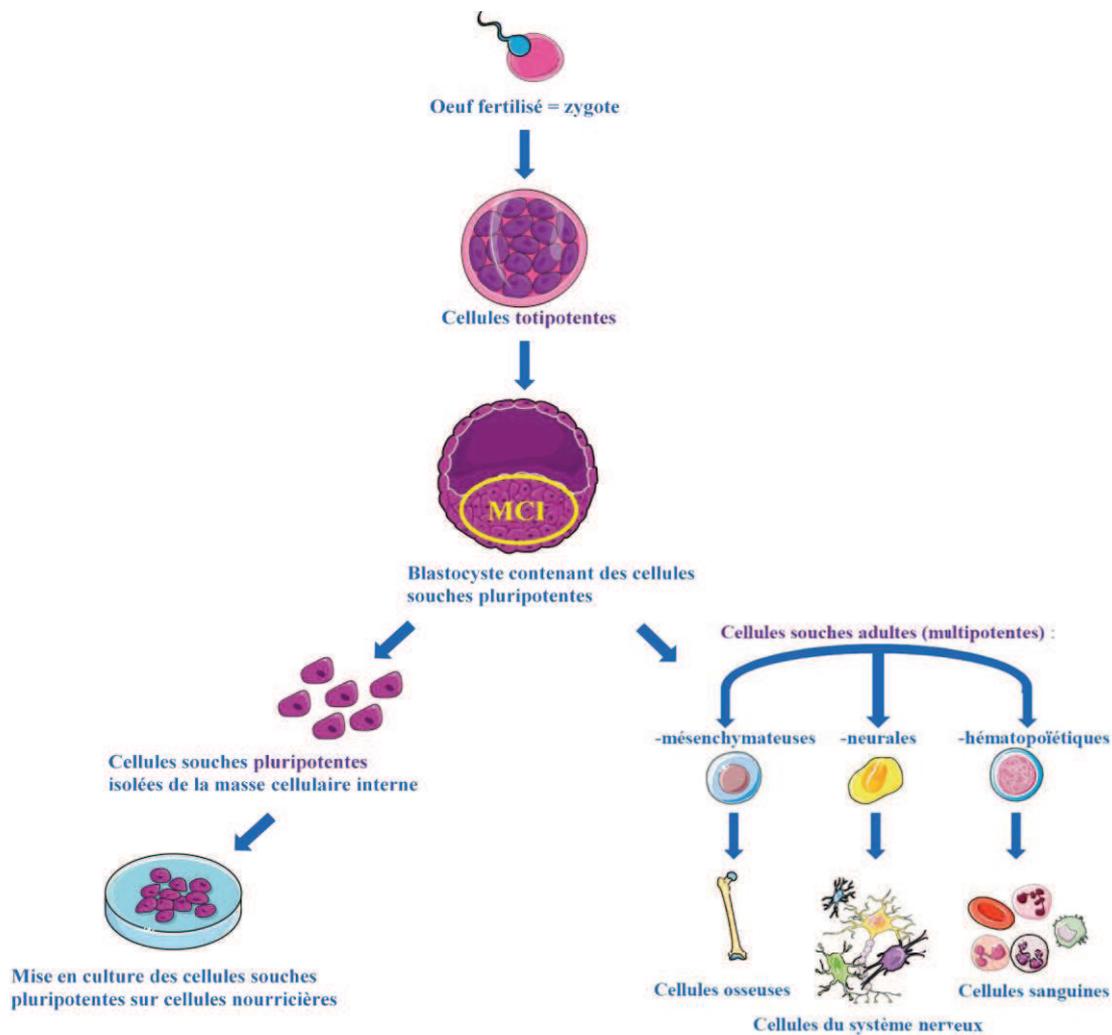


FIGURE 24 : ORIGINE DES CELLULES SOUCHES

Les cellules souches ont toutes la même origine : elles proviennent du zygote qui donnera ensuite naissance aux cellules totipotentes. Au fur et à mesure du développement le potentiel de ces cellules devient de plus en plus restreint, jusqu'à donner la cellule souche unipotente.

3.3 La pluripotence : Définition et mécanismes :

3.3.1 Définition de la pluripotence :

La pluripotence est définie comme la capacité d'une cellule à donner naissance à tous les types cellulaires d'un organisme. On distingue deux types de pluripotence : celle dite

INTRODUCTION

« naïve » qui implique la capacité des cellules à générer des chimères (Nichols and Smith, 2009) et celle dite « avancée » qui correspond au stade « cellules souches Epiblastiques » (EpiSC) (Brons et al., 2007; Tesar et al., 2007). De plus, les cellules au stade Epi possèdent déjà un chromosome X inactivé. Ces deux états de pluripotence dépendent de voies de signalisation qui sont antagonistes l'une de l'autre. Les TGF β et le FGF2 permettent l'auto renouvellement des cellules dont la pluripotence est avancée mais induit la différenciation des cellules possédant une pluripotence naïve. La capacité des cellules à générer des chimères constitue donc un point essentiel dans la définition de la pluripotence. Néanmoins, pour des raisons évidentes d'éthique, ce test de pluripotence ne peut pas être réalisé sur des cellules humaines. Un second test de pluripotence constitue donc la génération de tératomes par transplantation ectopique. Les cellules sont généralement injectées sous la peau d'une souris immunodéficiente (SCID).

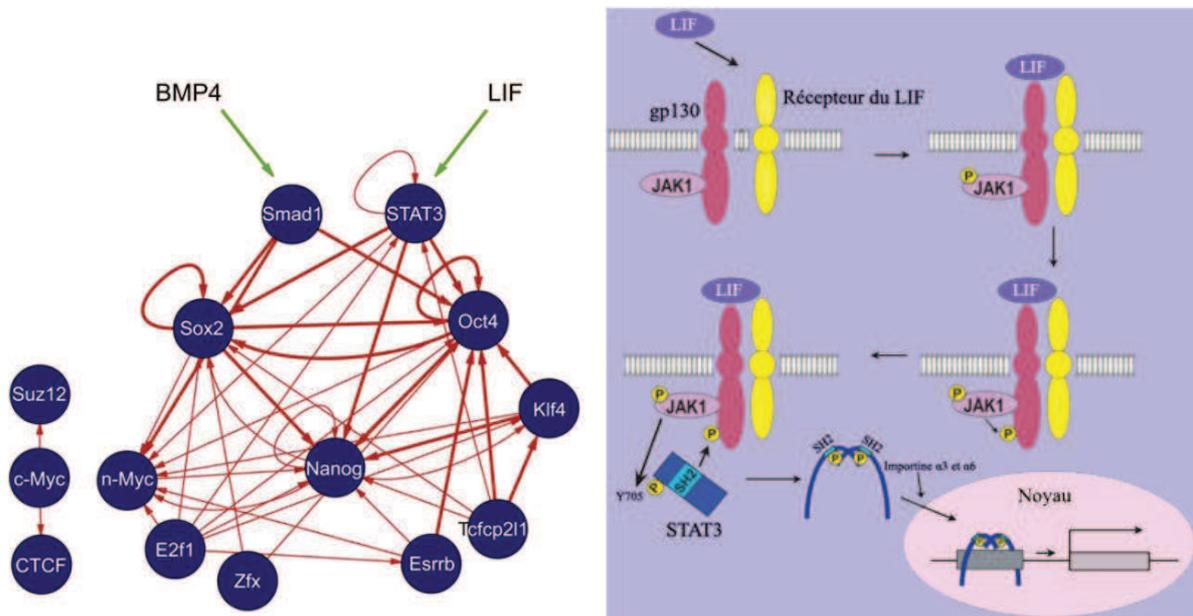


FIGURE 25 : LA VOIE LIF/STAT3 ET LE CONTROLE DE LA PLURIPOTENCE DANS LES CSEM D'APRES HIRAI ET AL. 2011 (HIRAI ET AL., 2011) ET CHEN ET AL. (CHEN ET AL., 2008)

La voie du LIF permet de réguler la pluripotence dans les CSEM et via son action sur STAT3, le LIF participe à la boucle de pluripotence retrouvée dans toutes les cellules pluripotentes composée de Nanog-Sox2 et Oct4, accompagnée d'autres facteurs comme C-myc ou Klf4

INTRODUCTION

Quelques facteurs de transcription peuvent définir la pluripotence, comme, Tcf3, Sox2, Nanog et Oct4 (Boyer et al., 2005). Oct4 est essentiel pour la formation de l'ICM et pour la maintenance des CSE *in vitro* (Nichols et al., 1998). Nanog, activé au stade 8 cellules, est important pour le maintien des CSE *in vitro* mais aussi pour la réactivation du chromosome X par son expression tardive dans un petit groupe de cellules de la masse cellulaire interne (Silva et al., 2009). La boucle de pluripotence est contrôlée par les facteurs de transcription Oct4-Sox2-Nanog (Figure 25).

3.3.2 Les mécanismes moléculaires de la pluripotence *in vitro* :

La pluripotence des CSE *in vitro* est maintenue grâce à l'ajout d'une cytokine appelée Leukemia Inhibitory Factor, le LIF. Le LIF agit via la voie STAT3 (Figure 25). Pour les CSEh et les iPS, ce facteur de pluripotence est le FGF2. Les cellules souches pluripotentes sont reconnaissables en culture par leur petite taille (2-3µm) et leur rapport nucléocytoplasmique élevé, ce qui les distingue des cellules nourricières irradiées sur lesquels elles sont entretenues. De part leur caractère souche, ces cellules indifférenciées possèdent un fort potentiel de différenciation et sont théoriquement capables de s'auto-renouveler à l'infini. Ce caractère très prolifératif est attribué à leur forte expression de la télomérase (TERT : télomérase reverse transcriptase) qui empêche l'entrée des cellules en sénescence en sauvegardant la longueur des télomères, régulées par la voie Wnt (Hoffmeyer et al., 2012).

3.3.3 Origine des cellules souches pluripotentes :

Il existe différents types de cellules souches pluripotentes, qui ont des origines diverses. La cellule totipotente provient du zygote, qui est le stade le plus vrai de la pluripotence, car la fécondation peut donner lieu à un individu entier. Ensuite viennent les cellules pluripotentes. Les cellules souches embryonnaires (CSE) proviennent de la MCI d'un blastocyste. Ces cellules expriment les gènes de pluripotence Nanog, Oct4 et Sox2, et possèdent leurs deux chromosomes X dans un état activé dans les cellules femelles (Nichols and Smith, 2009). Contrairement aux cellules de la MCI présentes *in vivo* qui ne sont pas capables d'auto-renouvellement et présentent un génome hypométhylé (Santos et al., 2002),

INTRODUCTION

les CSE sont capables de s'auto-renouveler en théorie à l'infini *in vitro*, et présentent un génome hyperméthylé (Meissner et al., 2008).

Les cellules peuvent être aussi dérivées au stade épiblaste, après l'implantation, et constituent les cellules souches épiblastiques (CSEpi) qui ne possèdent pas tout à fait les mêmes propriétés que les CSE. Les cellules souches germinales adultes (CSGa) permettent de générer des gamètes permettant de générer des cellules souches à leur tour. Enfin, les iPS sont des cellules pluripotentes obtenues à partir de cellules somatiques (Figure 26).

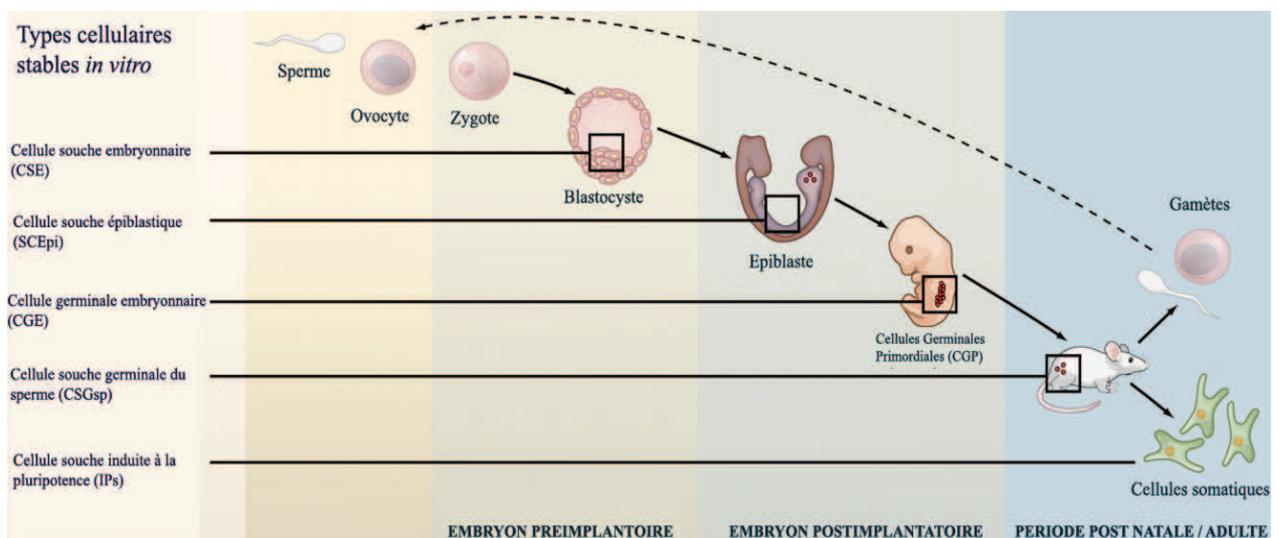


FIGURE 26: ORIGINE DES CELLULES SOUCHES PLURIPOTENTES D'APRES HANNA ET AL. 2010 (HANNA ET AL., 2010B).

Il existe différents types de cellules souches pluripotentes. La cellule souche embryonnaire (CSE) provient du blastocyste, cellules souche épiblastique (CSEpi) provenant de l'épiblaste, Les cellules souches germinales adultes (CSGa) et embryonnaires (CSGe) provenant des gamètes et enfin la cellule induite à la pluripotence (iPS).

INTRODUCTION

3.4 Les différents types de cellules souches pluripotentes :

3.4.1 Les cellules souches de l'épiblaste :

Les cellules souches pluripotentes peuvent être dérivées directement de l'épiblaste d'un embryon implanté. L'épiblaste constitue une seule couche de cellules épithéliales provenant de la MCI à 5.5-7.5 jours dans l'embryon de souris. Après leur dérivation, les cellules sont supplémentées avec du FGF2 et de l'activine (Brons et al., 2007) *in vitro*. Les cellules souches épiblastiques (CSEepi) sont capables de générer des corps embryoides (CE) et de former des tératocarcinomes. Leur voie d'auto-renouvellement est indépendante du LIF et elles sont moins efficaces que les CSE pour former des chimères. Elles ont un taux d'expression du facteur de transcription Nanog plus faible que les autres cellules souches pluripotentes mais possèdent déjà le CMHI (Complexe Majeur D'Histocompatibilité de classe I).

3.4.2 Les cellules souches germinales et la lignée germinale chez l'adulte :

Les cellules souches germinales (appelées aussi cellules souches germinales primordiales) sont isolées des embryons murins à 8.5 jours (Surani, 1999). Ces cellules sont pluripotentes, capables de générer des tératomes et des chimères. Elles sont en théorie « éternelles », puisqu'elles sont capables de faire le lien entre toutes les générations (Surani, 2007). Les cellules germinales adultes, fournissent elles aussi des cellules souches pluripotentes, mais avec moins d'efficacité que les cellules souches germinales provenant de l'embryon. Elles sont propagées en sérum et LIF, tout comme les CSEm (Kanatsu-Shinohara et al., 2004), et ont été isolées pour la première fois de tissus testiculaires adultes (Conrad et al., 2008).

INTRODUCTION

3.4.3 Les cellules souches embryonnaires :

3.4.3.1 Les cellules souches embryonnaires murines :

Les CSEm constituent un excellent outil pour étudier le développement, mimant la phase de pré-implantation pour les lignages extra-embryonnaires comme le TE et l'EP, et la péri et post implantation pour les lignages embryonnaires. De plus, ces cellules sont facilement génétiquement manipulables, et les recombinaisons se font plus facilement dans ce type de cellules que dans nombreux autres types cellulaires (Thomas and Capecchi, 1987).

Dans les cellules souches embryonnaires murines, la pluripotence peut être testée grâce à la création de souris chimériques. Ces cellules sont injectées dans des embryons au stade 8 cellules ou des blastocystes. Les CSEs injectées vont alors donner des cellules des trois lignages mais aussi des cellules de la lignée germinale si celles-ci sont vraiment pluripotentes (Bradley et al., 1984).

Les cellules souches embryonnaires murines sont maintenues dans un état de pluripotence *in vitro* grâce au LIF (Leukemia Inhibitory Factor), essentiel pour l'auto renouvellement des CSEm. Les cellules souches embryonnaires murines (CSEm) peuvent être maintenues *in vitro* grâce à des conditions de culture optimisées et peuvent différencier par des modifications de ce même milieu de culture ou par une modulation de l'expression génique (Niwa, 2007). Ces cellules ont contribué à la compréhension de la biologie du développement à travers la création de souris transgéniques (Capecchi, 1989).

Les CSEm peuvent se différencier grâce à la technique de formation des corps embryoïdes (CE) en gouttes pendantes (Maltsev et al., 1993). Cette structure permet de mimer le développement embryonnaire *in vitro* en reconstituant les 3 feuillets présents chez l'embryon. En effet, de nombreux types cellulaires dérivés des 3 feuillets y sont retrouvés, organisés en cercles concentriques comme les cellules musculaires squelettiques et musculaires lisses (Rohwedel et al., 1994), les cellules neuronales (Bain et al., 1995), hématopoïétiques, épithéliales (Bagutti et al., 1996), les adipocytes ou encore les ostéoblastes

INTRODUCTION

(Boheler et al., 2002). De plus, ces structures présentent des composants extracellulaires comme le collagène, la laminine ou la fibronectine (Fassler et al., 1996). Les cardiomyocytes apparaissent vers le 6^{ème} jour de différenciation au sein de des CE, permettant leur activité contractile. De plus, la différenciation des CE suit la même cinétique d'expression de gène qu'au cours du développement (Boheler et al., 2002). De ce fait, les CSEm constituent un excellent modèle de différenciation cardiaque *in vitro*.

Au cours de la différenciation cardiaque, les CSEm expriment en premier les gènes mésendoderme comme Brachyury (connu aussi sous le nom de T) mais aussi Mx11 ou encore Goosecoïd (Gsc). Tout de suite après le début de l'expression du facteur T, MesP1/2 commence à être exprimé dans les CE dérivés des CSEm (CEm). Par la suite sont exprimés ceux du mésoderme comme Nkx2.5 ou encore Mef2c qui vont alors induire les gènes codant pour les protéines contractiles cardiaques comme les myosines.

3.4.3.2 Les cellules souches embryonnaires humaines (CSEh) :

Tout comme les CSEm, les CSEh sont obtenues à partir de blastocystes humains entre le 5^{ème} et le 7^{ème} jour du développement embryonnaire avant leur implantation (Thomson et al., 1998). Ces cellules souches partagent de multiples caractéristiques avec les CSEpi. Tout d'abord, les colonies présentent un aspect plus plat, leur auto-renouvellement est assuré par la voie du FGF2 et leur chromosome X est inactivé. Ces caractéristiques suggèrent que ces cellules se trouvent plus dans un état de pluripotence avancé que dans état de pluripotence naïf, bien que venant de la MCI d'un embryon. Néanmoins, ces cellules peuvent retourner à un état de pluripotence naïf grâce à l'action du LIF et de deux inhibiteurs (conditions 2i), mais cet état de pluripotence ne perdure que sur une dizaine de passages (Hanna et al., 2010a).

Ces cellules sont maintenues sur des cellules nourricières, tout comme les CSEm, mais leur état de pluripotence est maintenu *in vitro* grâce au FGF2 (Figure 27) un facteur crucial pour ces cellules. Elles sont cultivées dans un milieu sans sérum additionné de diverses molécules chimiques (pour le cas des milieux définis) permettant d'augmenter leur

INTRODUCTION

croissance (Chase and Firpo, 2007). Au niveau moléculaire, les CSEh sont identifiables par l'expression d'un ensemble de marqueurs de surface dont les plus utilisés pour les caractériser sont SSEA-4 (Stage Specific Embryonic Antigen), SSEA-3, TRA-1-60 (Tumour Rejection Antigen), TRA-1-81, CD9, AC133, flt3 (CD135), et c-kit (CD117).

Diverses molécules sont utilisées pour leur différenciation *in vitro*, comme le BMP4 ou le BMP2, agissant via la voie des Smads (Figure 27).

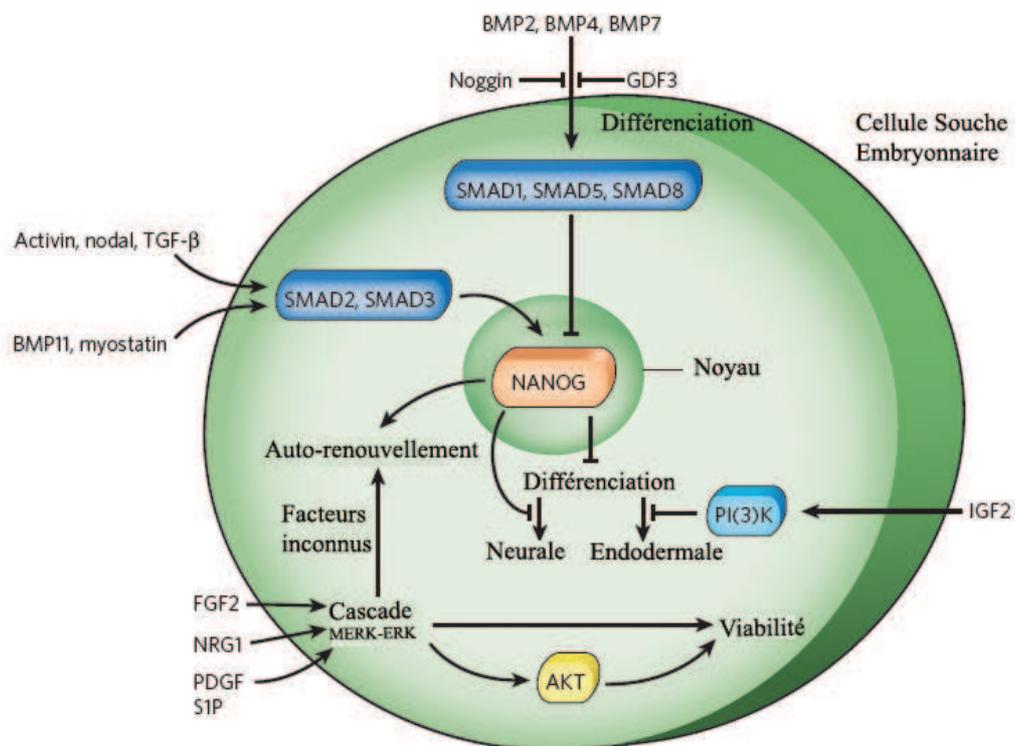


FIGURE 27: LA PLURIPOTENCE ET LA DIFFERENCIATION DANS LES CSE ET IPS D'APRES PERA ET TAM 2010 (PERA AND TAM, 2010).

TGFβ: Transforming Growth Factor β; FGF2: Fibroblast Growth Factor 2; NRG1: Neuregulin 1; PDGF: platelet-derived growth Factor; BMP: Bone Morphogenic Protein; GDF3: Growth differentiation factor-3 P(I)3k: Phosphatidylinositol 3-kinase; IGF2: insulin-like growth factor2

INTRODUCTION

3.4.4 Différence entre les cellules souches embryonnaires murines et humaines :

Les CSEm ne ressemblent pas tout à fait aux cellules CSEh bien qu'elles partagent de nombreuses caractéristiques communes. Tout d'abord, ces deux types de cellules expriment le facteur de transcription Oct4 et Nanog et ont les mêmes propriétés de pluripotence. Néanmoins, pour leur maintien *in vitro*, les CSEh nécessitent l'ajout de FGF2, tandis que cette même molécule dans les cultures de CSEm *in vitro* permet leur différenciation en cellules souches germinales. Dans l'embryon de souris *in vivo*, l'ajout de FGF2 permet la différenciation en EP. Ces différences fondamentales entre ces deux types de cellules permettent de suggérer que les cellules souches embryonnaires humaines sont plus similaires au feuillet épiblastique de l'embryon de souris que de la MCI de ces mêmes embryons.

3.4.5 Les cellules souches à pluripotence induite (iPS) :

Les cellules souches à pluripotence induite (iPS) possèdent les mêmes caractéristiques que les CSE au niveau de leur morphologie, de leur expression génique et ont le même statut épigénétique que les cellules souches pluripotentes. Elles ont la capacité de se différencier dans les 3 feuillets embryonnaires *in vitro* et *in vivo*.

3.4.5.1 Les différentes techniques d'obtention des iPS :

L'histoire de la reprogrammation nucléaire de cellules somatiques ne date pas de 2006, mais a commencé bien avant, avec les expériences de Gurdon en 1962, démontrant que les cellules intestinales d'amphibiens possèdent l'information nécessaire pour donner un être vivant dans son intégralité (Gurdon, 1962). Il existe plusieurs approches de reprogrammation nucléaire (Yamanaka and Blau, 2010), mais nous ne nous intéresserons ici qu'à l'induction de cellules souches à pluripotentes par la transduction de facteurs de transcription. Ces facteurs de transcription sont le plus souvent Oct3/4, SOX2, Klf4, lin28, Nanog et C-myc, et plus rarement ESRRB ou NR5A2, permettant la réactivation de la boucle transcriptionnelle de pluripotence des cellules souches (Ichida et al., 2009).

INTRODUCTION

Les iPS peuvent être obtenues à partir de différents types de cellules comme les fibroblastes de peau (Park et al., 2008), les kératinocytes (Aasen et al., 2008), les progéniteurs hématopoïétiques CD24⁺ (Loh et al., 2009) et les cellules T du sang périphérique (Seki et al., 2010). Outre le fait d'utiliser plusieurs types de cellules, il existe plusieurs méthodes d'obtention de ces cellules, qui ont évolué très rapidement depuis 2006. Tout d'abord, au niveau des gènes de reprogrammation, l'utilisation de C-Myc a été arrêtée pour la reprogrammation des cellules à visée thérapeutique du fait du risque de réactivation de cet oncogène chez les patients, qui pourrait produire des tumeurs. Même si la reprogrammation de ces cellules est moins efficace (Nakagawa et al., 2008), elles possèdent des capacités de formation de chimères, attestant de leur pluripotence, et leur différenciation est robuste et efficace (Nelson et al., 2009).

Le vecteur de reprogrammation des cellules constitue aussi un point important dans la génération des iPS. D'autres méthodes que celles par rétrovirus ou lentivirus ont été mises au point, celles-ci pouvant produire des altérations génétiques dans la cellule. Les iPS peuvent maintenant être produites par infection avec des adénovirus, les virus de Sendai et des vecteurs plasmidiques (Fusaki et al., 2009; Stadtfeld et al., 2008). Elles peuvent aussi être produites par des ARNm synthétiques génétiquement modifiés (Warren et al., 2010) ou encore par l'insertion directe de protéines recombinantes (Zhou et al., 2009). Les infections virales induisant une hétérogénéité dans l'expression des facteurs de reprogrammation, des techniques transgéniques ont été développées pour mieux contrôler cette hétérogénéité. Les systèmes inductibles comme DOX, les transposons ou encore les constructions polycistroniques permettent de mieux contrôler les infections (Woltjen et al., 2009) permettant l'induction d'une deuxième vague d'infection sans une autre adjonction de virus, qui s'avère cette fois plus homogène.

Ces méthodes ont ensuite été améliorées au niveau de l'efficacité de reprogrammation à l'aide de molécules chimiques, comme les inhibiteurs de l'ADN méthyltransférase (5'azacytidine et RG108) (Mikkelsen et al., 2008), des inhibiteurs des histones déacétylases

INTRODUCTION

(comme l'acide valproïque), de la voie du TGF β (Maherali and Hochedlinger, 2009) ou encore des facteurs de transcription comme Wnt qui, en supprimant les signaux spécifiques de différenciation, permettent d'augmenter l'efficacité de reprogrammation des iPS (Marson et al., 2008). L'inhibition de p53 constitue aussi un facteur permettant d'augmenter la reprogrammation entre 4 et 100 fois (Krizhanovsky and Lowe, 2009). Cette efficacité de reprogrammation est calculée en fonction du nombre d'apparitions de colonies de cellules d'iPS, en fonction du nombre de cellules infectées, à un certain moment de la reprogrammation entre 3 et 6 semaines.

3.4.5.2 Les cellules iPS : un modèle de développement dans les maladies génétiques :

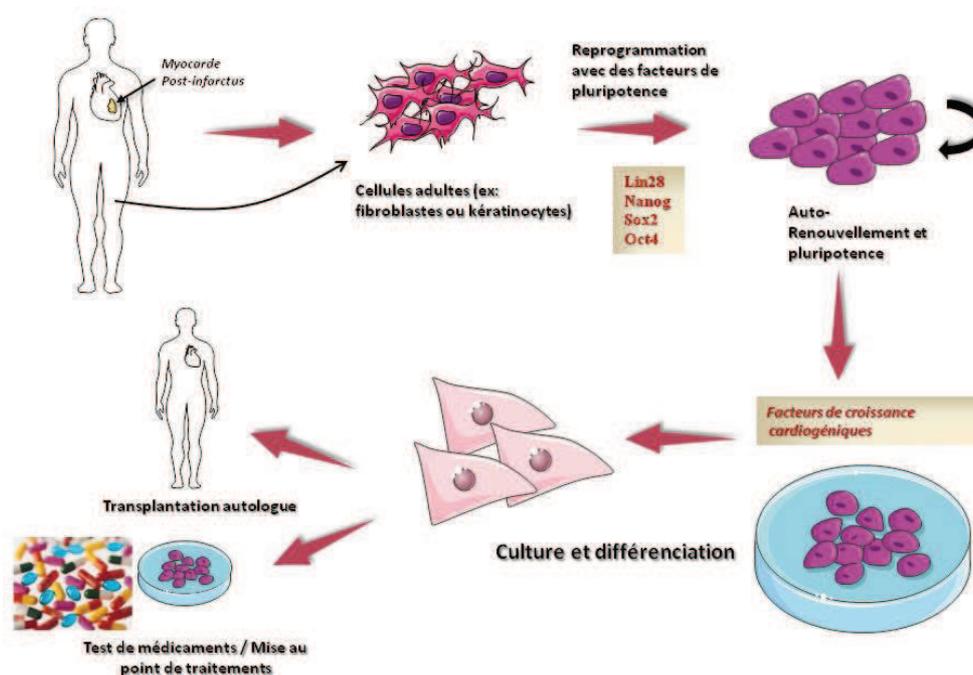


FIGURE 28: CREATION D'IPS POUR DES APPLICATIONS MEDICALES MODIFIEE D'APRES BLIN ET AL. 2009 (BLIN ET AL., 2009).

Après une biopsie sur le patient les cellules pourront être reprogrammées puis cultivées *in vitro* pour ensuite être infectée par des facteurs de pluripotence permettant sa reprogrammation. Après culture et amplification, les cellules induites à la pluripotence sont différenciées en cellules cardiaques qui pourront ensuite soit être utilisées en thérapie cellulaire pour transplantation autologue, soit être utilisées pour tester de nouveaux médicaments.

INTRODUCTION

Les iPS possèdent l'avantage de pouvoir récapituler les étapes précoces du développement, contrairement aux modèles existants précédemment issus de culture primaires de cellules de patients, ce qui en fait un excellent modèle pour les maladies génétiques comme les laminopathies.

Une fois qu'un phénotype robuste a été trouvé dans les cellules iPS spécifiques de patients ou dans les cellules différenciées issues de celles-ci, elles peuvent être utilisées comme modèles afin de tester de nouveaux traitements (Yamanaka, 2010; Yoshida and Yamanaka, 2010) (Figure 28).

Le premier exemple à avoir été développé provient d'iPS générées à partir de cellules de patients porteurs d'une dysautonomie familiale (DF), une maladie génétique rare due à une mutation dans le gène *IκBKAP* (I-κ-B kinase complex-associated protein). Ces cellules furent ensuite différenciées en précurseurs neuronaux, montrant un phénotype caractéristique d'un patient porteur d'une DF, comprenant un défaut d'épissage du gène *IκBKAP*, une neurogénèse lente et une migration cellulaire réduite. Des molécules ont ensuite été testées sur ces cellules par des méthodes à haut-débit, et un composé, le kinétine, a été trouvé comme ayant un effet sur le défaut d'épissage, la différenciation neurogénique et les défauts de migration (Lee et al., 2009). Cet exemple illustre que les iPS constituent un modèle puissant dans la découverte de nouveaux traitements.

INTRODUCTION

Maladie	Défaut moléculaire de la cellule donneuse	Type cellulaire différencié à partir des iPS	Phénotype retrouvé ? oui/non	Tests médicamenteux ? oui/non	Références
Cardiovasculaire					
Syndrome LEOPARD	Mutation hétérozygote de PTPN11	Cardiomyocytes	oui	Non	(Lin et al., 2012)
QT long de type 1	Mutation dominante sur KCNQ1	Cardiomyocytes	Oui	Non	(Moretti et al., 2010)
QT long de Type 2	Mutation non-sens sur KCNH2	Cardiomyocytes	Oui	oui	(Lahti et al., 2012)
Maladies génétiques					
Mucoviscidose	Mutation deltaF508 – Mutation homozygote dans le CFTR	Progéniteurs pulmonaires embryonnaires multipotents Cellules progénitrices des voies respiratoires	En cours d'étude	Non	(Mou et al., 2012)
Dystrophie musculaire Duchenne de	Délétion du gène de la dystrophine	Aucun – test de tératomes	En cours d'étude	non	(Kazuki et al., 2010)
Progéria	Mutation	Muscle lisse Cellules souches mésenchymateuses	oui	non	(Zhang et al., 2011) (Liu et al., 2011)

TABLEAU 2 : CELLULES A PLURIPOTENCE INDUITES CREEES POUR MODELISER UNE PATHOLOGIE MODIFIEE D'APRES ROBINTON ET DALEY (ROBINTON AND DALEY, 2012)

INTRODUCTION

3.4.6 Différences entre les cellules CSEh et les iPS :

D'un point de vue épigénétique, les CSEh et les iPS présentent un méthylome grandement similaire, attestant de la bonne reprogrammation de ces dernières même si certaines parties du méthylome montrent que les iPS ne sont jamais totalement reprogrammées (Lister et al., 2011). Néanmoins, ces différences résiduelles peuvent être compensées par la modification des conditions de culture, par l'ajout de Wnt3a exogène, le traitement avec des agents déméthylants ou le KO de la DNMT1 (Maro et al., 1984). De plus, il a été montré que le chromosome X n'était pas toujours inactivé dans les iPS femelles (Maherali and Hochedlinger, 2009). Les iPS ne sont donc pas équivalentes aux CSEh mais sont fonctionnellement équivalentes, en théorie. Il faut néanmoins noter que même si des différences persistent entre clones d'iPS, celles observées entre lignées de CSEh sont encore plus grandes (Martinez et al., 2012; Osafune et al., 2008). De ce fait, même si ces cellules ne sont pas équivalentes, ces cellules sont complémentaires pour la recherche médicale (Robinton and Daley, 2012). De plus, les cellules hiPS, contrairement aux CSEh, ne posent pas de problème éthiques, bien que cela soit discutable, car on peut créer des gamètes à partir d'iPS, et donc potentiellement recréer un être vivant *in vitro* (Kee et al., 2009).

3.5 Les cellules souches pluripotentes et la cardiogenèse :

Les CSE constituent un modèle puissant pour récapituler les stades précoces du développement embryonnaire. Ce concept peut être spécifiquement appliqué au développement cardiaque, celui-ci étant le premier à être mis en place au cours du développement dans l'embryon, le cœur étant le premier organe à se développer (Srivastava, 2006).

3.5.1 Les gènes impliqués dans la régulation cardiaque :

Le facteur de transcription Oct4 est un des premiers à être exprimé dans l'embryon (Niwa, 2007). Néanmoins, son expression perdure durant la différenciation, au stade épiblaste, au moment où les premiers facteurs de transcription cardiaques se mettent en place

INTRODUCTION

(Tam PPL, 1999). Ces données provenant de l'embryologie ont ensuite permis à notre équipe d'étudier en détails la fonction du facteur de transcription Oct4 dans les cellules souches embryonnaires murines et humaines, permettant de mettre en évidence l'implication de ce facteur dans la différenciation cardiaque *in vivo* et *in vitro* (Stefanovic and Puceat, 2007; Zeineddine et al., 2006). L'expression de l'ARNm codant pour Oct4 est modulée par la voie du TGF β /BMP/Smad à des temps précoces de différenciation, mais aussi par la fixation du facteur de transcription endodermale Sox17 sur le promoteur du gène codant pour Oct4 (Stefanovic et al., 2009). Cette différenciation cardiaque passe par une étape de type mésendoderme attestée par l'expression des gènes Goosecoïd (*GSC*), Brachyury ou Mx11 qui ont un effet paracrine sur le mésoderme cardiaque. L'augmentation de l'ARNm d'Oct4 est observée dans les cellules humaines, murines et de rhesus lorsque ces cellules s'engagent dans la voie de différenciation du mésoderme cardiaque, que ce soit dans les corps embryoïdes ou par l'induction du mésoderme par le BMP2.

Après une étape de type mésendoderme, modulée *in vitro* par Wnt3a permettant de moduler l'expression du BMP2 (Stefanovic et al., 2009), le mésoderme pré-cardiaque se forme, caractérisé par l'expression du facteur de transcription MesP1/2 et Tbx6. Viennent ensuite les progéniteurs cardiaques, exprimant les gènes Nkx2.5, Mef2c, GATA5, 6, Isl1 et Tbx5 (Figure 29). Ces facteurs vont ensuite travailler de concert (Harvey, 2002) afin d'induire les gènes impliqués dans la différenciation cardiaque plus tardive, permettant de donner sa structure à la cellule cardiaque, et favoriser l'expression des gènes de la myosine, de l'actine ou encore des connexines (Figure 29). En effet, Nkx2.5 va s'associer avec les membres de la famille des facteurs de transcription GATA et SRF pour activer les gènes cardiaques structuraux.

INTRODUCTION

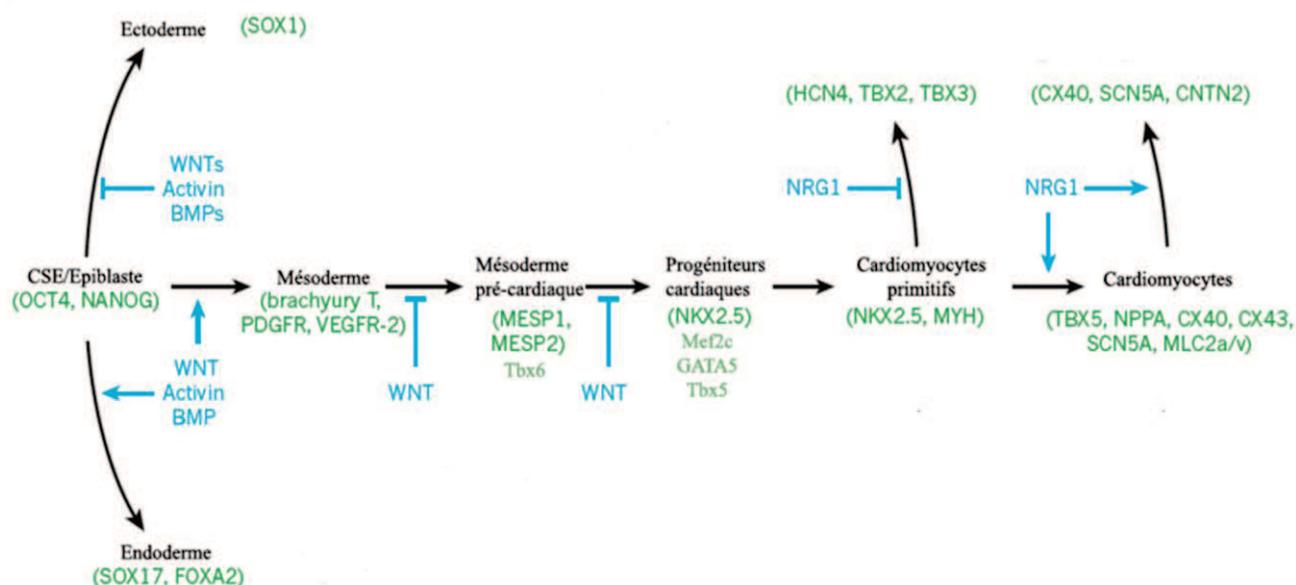


FIGURE 29 : LES GENES IMPLIQUES DANS LA DIFFERENCIATION CARDIAQUE D'APRES MURRY ET LAFLAMME (LAFLAMME AND MURRY, 2012)

Lors de la différenciation des cellules souches pluripotentes (CSP) *in vivo* le mésoderme va se former, caractérisé par le facteur de transcription brachyury (T), ensuite le mésoderme pré cardiaque, caractérisé par les facteurs de transcription MesP1 et 2 ca être formé. Ces deux feuilletts sont inhibés par la voie Wnt. Ensuite, les progéniteurs cardiaques, caractérisées par les facteurs Nkx2.5, Tbx5 et Mef2c vont apparaitre et permettre de former les cardiomyocytes primitifs puis les cardiomyocytes en régulant les gènes structuraux des cardiomyocytes. Ces différentes étapes sont régulées entre autre par les voies Wnt et BMP.

En plus des gènes qui régulent la destinée cardiaque des cellules, les micros ARNs (miARNs) possèdent un rôle de régulation au niveau transcriptionnel. miR-1, miR-16, miR-27, miR-30d, miR-126, miR-133, miR-143 et Let-7 sont impliqués dans la régulation cardiaque du développement (Cordes et al., 2009). Néanmoins, leur action sur les voies de signalisation du développement cardiaque est encore loin d'être élucidée.

3.5.2 L'apport des voies de signalisation dans la différenciation cardiaque *in vitro* :

Les facteurs de croissance ou morphogènes activent une cascade d'événements intracellulaires aboutissant à l'activation de facteurs de transcription. Ces morphogènes

INTRODUCTION

appartiennent essentiellement à la superfamille du TGF β incluant l'activine, nodal, les BMPs ou le TGF β , ainsi qu'à la famille des FGFs.

3.5.2.1 La voie du TGF β :

L'activine permet de mimer l'action de Nodal (Sugi and Lough, 1995). Le rôle de cette molécule dans la formation du cœur dans les embryons de poulet et d'amphibiens a été mis en évidence dans les années 1990 (Ishimura et al., 2008; Yatskievych et al., 1997), permettant la formation de l'axe antéro-postérieur. Un ajout de TGF β dans les cultures de CSE permet d'augmenter la différenciation cardiomyocytaire (Zeineddine et al., 2006). Il a été démontré qu'*in vitro*, l'ajout du cocktail Activin/BMP4 permet d'augmenter la proportion de cardiomyocytes (Yang et al., 2008), tout comme l'ajout de BMP2 (Blin et al., 2010). De plus, le BMP2 peut réguler le FGF8 et ceux-ci synergisent ensuite pour favoriser la spécification vers les lignages cardiaques (Brand, 2003). Le BMP2 agit aussi en régulant les gènes *Nkx2.5* et *Gata4* à travers les Smads. Les Smads 1/5/8 interagissent avec Smad4 qui est transposé dans le noyau, activant l'expression de *Nkx2.5* et *Gata*.

3.5.2.2 La voie Wnt/ β -caténine :

Cette voie est impliquée dans la différenciation et l'auto-renouvellement des CSE, selon le type de Wnt impliqué. Par exemple, Wnt 11 est le seul facteur à promouvoir la cardiogenèse (Eisenberg and Eisenberg, 1999). De plus, la voie Wnt est efficace pour la différenciation dans une fenêtre de temps donnée très courte. En effet, la voie Wnt permet de favoriser la cardiogenèse durant l'induction du mésoderme, mais inhibe la différenciation cardiaque au stade progéniteurs (Naito et al., 2006). C'est alors que *Dkk1*, un inhibiteur de la voie Wnt, permet de favoriser la différenciation cardiaque en inhibant cette voie.

La partie Nodal/Activine de la voie du TGF β , de concert avec la voie Wnt/ β -caténine pour former le mésendoderme *in vitro* dans les cellules souches pluripotentes (Van Vliet et al., 2012).

INTRODUCTION

3.5.2.3 La voie Notch :

Il a été démontré que le blocage de la voie de signalisation de Notch dans des CSEh permettait, au cours de la différenciation, de favoriser le mésoderme (Kwon et al., 2009).

3.5.3 La différenciation cardiaque *in vitro* :

Il existe 3 approches majeures pour la différenciation des cellules pluripotentes humaines *in vitro*. Les corps embryoïdes (CE), la culture en monocouche cellulaire et la co-culture.

3.5.3.1 Formation de corps embryoïdes :

La formation de corps embryoïdes, en plus de permettre d'obtenir des cardiomyocytes des progéniteurs cardiaques, permet d'attester de la pluripotence des cellules *in vitro*. En effet, une cellule souche pluripotente doit pouvoir former les 3 feuillets embryonnaires *in vitro*. Contrairement aux CSEm, le protocole de formation de CEh *in vitro* est plus compliqué à mettre en place pour obtenir des CEh calibrés. En effet, la plupart de ces cellules ne peuvent être dissociées enzymatiquement, permettant l'obtention de cellules unitaires. La plupart du temps, ces cellules subissent une apoptose. De ce fait des protocoles ont été développés de manière à effectuer des CEh à partir de petits amas de 3 à 20 cellules. Ces amas sont ensuite ensemencés dans des boîtes de pétri à faible attachement (Kehat et al., 2001). Par la suite, de nombreux protocoles ont été mis en place permettant d'améliorer cette calibration (Burridge et al., 2007) (Figure 30).

3.5.3.2 Protocoles de différenciation en deux dimensions :

Afin d'obtenir une population plus pure de progéniteurs, de nombreux protocoles ont été mis en place (Figure 30). Outre celui que nous utilisons au laboratoire, l'équipe de Murry induit la différenciation cardiaque des cellules souches humaines pluripotentes en ajoutant à une monoculture de sur Matrigel de l'activine pendant 24h, suivi de l'addition de BMP4 dans du RPMI/B27 sans sérum (Paige et al., 2012). Certaines équipes induisent leur cellules

INTRODUCTION

humaines pluripotentes par une co-culture de cellules, comme l'équipe de Mummery qui utilise des END-2 (Mummery et al., 2003).

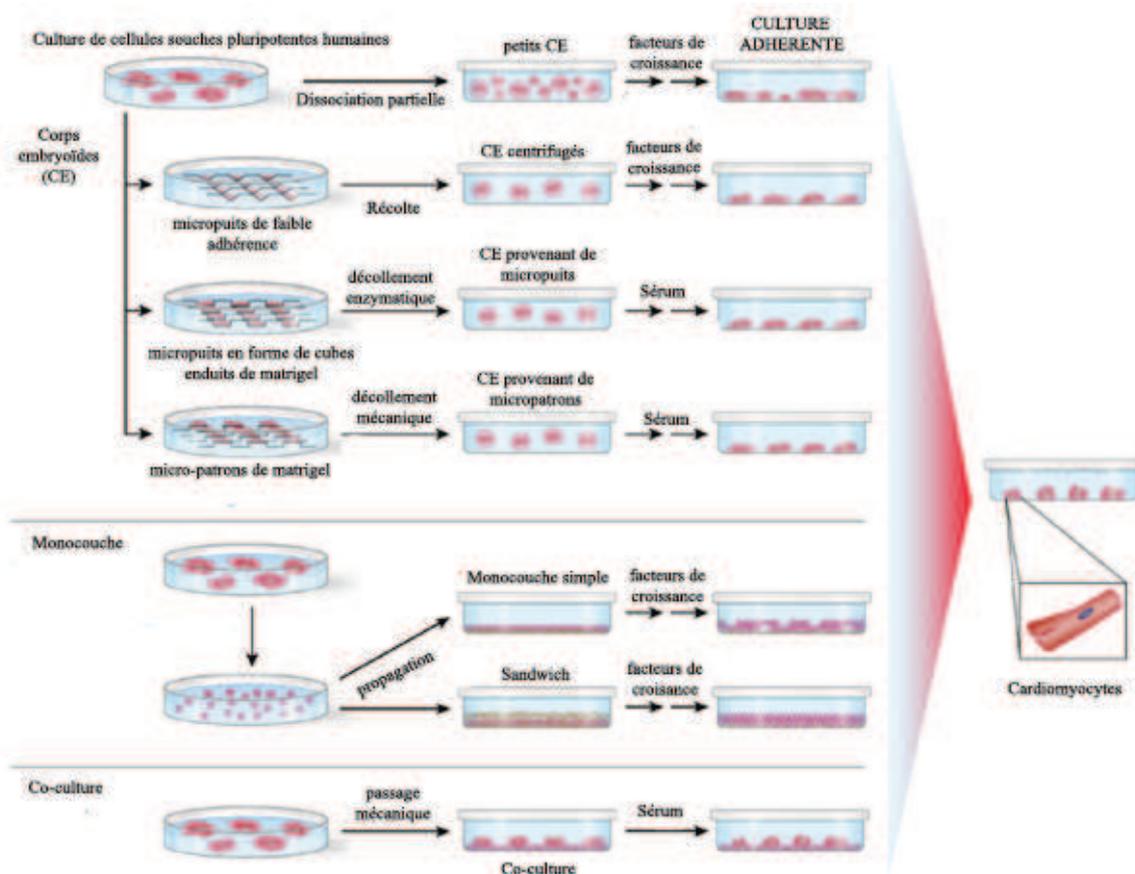


FIGURE 30 : VUE D'ENSEMBLE DES DIFFERENTS PROTOCOLES EXISTANTS POUR LA DIFFERENCIATION CARDIAQUE DES CELLULES PLURIPOTENTES HUMAINES D'APRES MUMMERY ET AL. (MUMMERY ET AL., 2012).

Il existe différents protocoles permettant la différenciation cardiaque des cellules souches embryonnaires humaines, organisés en 3 grands groupes. Le premier est la différenciation sous forme de corps embryoides, comprenant différents protocoles allant de la simple dissociation à la culture de colonies dans des micropuits permettant de « pré-former » les CE. Le deuxième est la culture sous de monocouche de cellules qui peut être une monocouche simple ou un sandwich, et le troisième une co-culture à l'aide de cellules permettant la différenciation cardiaque comme les fibroblastes cardiaques ou encore les cellules END-2.

PROJET DE THESE

PROJET DE THESE

Nous avons démontré dans cette première partie que les cellules souches pluripotentes, qu'elles soient murines ou humaines, étaient capables de mimer le développement embryonnaire précoce *in vitro*. C'est un de ces modèles que notre équipe a choisis afin d'étudier la cardiogenèse *in vitro*. En 2005, notre laboratoire a mis en évidence un rôle de la protéine du rétinoblastome (Rb) dans la cardiogenèse (Papadimou et al., 2005). Dans cette étude, les auteurs ont étudié le rôle de Rb exprimé dans l'embryon précoce dans les premières étapes de la cardiogenèse. Les auteurs ont utilisé les CSEm KO pour la protéine Rb (Rb^{-/-}) et ont montré qu'elles présentent un phénotype cardiaque retardé comparativement aux contrôles. Notre équipe a démontré que des cellules déficientes pour le facteur de transcription LEK1, une protéine retrouvée dans le cœur embryonnaire et interagissant avec Rb (Goodwin et al., 1999) pouvaient récapituler le phénotype de déficience de cardiogenèse observé dans les cellules Rb^{-/-} (Papadimou et al., 2005), mettant révélant ainsi un rôle de Rb/LEK1 dans un processus de différenciation cellulaire .

La protéine Rb étant liée à la lamine, nous avons fait l'hypothèse que le phénotype observé dans les cellules porteuses de la mutation Rb^{-/-} pourrait être dû à l'absence de liaison de cette protéine avec la lamine, impliquant ainsi cette dernière protéine dans un processus de différenciation cellulaire. Une mutation de la lamine pourrait alors avoir un impact sur le développement cardiaque et certaines laminopathies être considérées à certains égards comme des pathologies de défaut de lignage. C'est de cette manière que notre laboratoire a été amené à s'intéresser aux laminopathies à l'aide du modèle des cellules souches pluripotentes, permettant de compléter les données acquises avec le modèle murin en 2005 (Arimura et al., 2005). La souris *lmna*^{H222P/H222P} montre une locomotion réduite, avec des rigidités dans sa posture avec un phénotype cardiaque se traduisant par une dilatation des chambres et une hypokinésie. Ces anomalies apparaissent plus tardivement chez les femelles que chez les mâles.

PROJET DE THESE

J'ai donc différencié les cellules souches pluripotentes porteuses de la mutation $lmna^{+H222P}$ en cellules cardiaques, afin de tester le rôle potentiel de la lamine dans la cardiogenèse et ainsi l'impact d'une mutation à l'origine d'une cardiomyopathie sur le développement précoce cardiaque. L'obtention de résultats préliminaires sur les cellules souches embryonnaires murines sauvages et porteuses de la mutation $lmna^{+H222P}$ ont permis de montrer que la différenciation cardiaque était retardée dans les clones porteurs de la mutation $lmna^{+H222P}$ et de poser la base de ce qui a constitué par la suite mon projet de thèse à savoir l'incidence d'une mutation de la lamine sur le développement cardiaque murin et humain et une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires sous-jacent à cette pathologie.

MATERIELS ET METHODES

MATERIELS ET METHODES

1 Culture cellulaire

1.1 Culture des cellules nourricières : Les fibroblastes embryonnaires murins (MEFs):

Les cellules souches sont cultivées sur des cellules nourricières (MEFs) pendant leur propagation avant leur différenciation. Ce sont des cellules primaires obtenues par digestion enzymatique d'embryons de souris. Elles sont nécessaires au maintien des cellules souches embryonnaires en culture.

1.1.1 Obtention des fibroblastes embryonnaires murins:

Une souris gestante de 13.5 jours est euthanasiée par dislocation des cervicales. Les cornes utérines sont détachées de l'animal et les embryons sont sortis de leurs sacs vitellins dans une boîte de pétri contenant du PBS (Phosphate Buffer Saline). Les organes rouges (foie, rate, cœur) sont alors enlevés puis les embryons sont décapités. Ils subissent ensuite une digestion enzymatique à la trypsine/EDTA 10x après avoir été préalablement découpés à l'aide d'une paire de ciseaux fins. Les fragments sont ensuite repris à la pipette en effectuant plusieurs allers/retours pour permettre une meilleure dissociation du tissu puis incubés à 37°C 5% de CO₂ pendant 15 min. Après digestion, la solution enzymatique contenant les fragments d'embryons est diluée dans du milieu MEF (Milieu de culture DMEM contenant 10% de SVF (Sérum de veau fœtal, Hyclone)) puis centrifugée 5min à 1000rpm. Le surnageant est récupéré, puis regroupé avec les deux autres surnageants des digestions consécutives. Le tout est ensuite centrifugé à 1000rpm pendant 5min. Le culot est resuspendu dans du milieu DMEM contenant 10% de sérum puis les cellules sont comptées etensemencées à 1,5 millions par T225 (soit environ 6500 cellules par cm²).

1.1.2 Congélation des fibroblastes embryonnaires murins :

Les MEFs sont utilisables sur 5 passages. La congélation débute par un passage. Après un lavage au PBS, les cellules sont dissociées avec de la trypsine 0.05% pendant 5min à 37°C.

MATERIELS ET METHODES

Après agitation mécanique, les cellules sont récupérées dans du milieu MEF afin d'arrêter l'action enzymatique. Une centrifugation de 5min à 1000rpm à température ambiante est effectuée, puis le culot est repris dans 1mL de milieu de congélation (10% DMSO (Diméthyl Sulfoxyde, SIGMA), 50% SVF (Sérum de veau fœtal, Hyclone), 40% milieu MEF). Des cryotubes contenant 4.10^6 de cellules sont placés dans des containers de congélation pendant 24h à -80°C avant d'être stockés à -150°C .

1.1.3 Propagation des fibroblastes embryonnaires murins :

Ces cellules sont mises en culture, à 37°C en atmosphère humide sous 5% de CO_2 , en présence de milieu MEF. A confluence (environ tous les 3 à 4 jours) et après élimination du milieu, le tapis cellulaire est lavé avec du PBS. Les cellules sont ensuite décollées de leur support par digestion enzymatique (trypsine 0.05% - EDTA 1mM (Invitrogen)) pendant 5 minutes à 37°C . Un ajout de DMEM contenant 10% de sérum (milieu MEFs) permet d'annuler l'action enzymatique de la trypsine. La suspension cellulaire est ensuite centrifugée à 1000rpm pendant 5min puis le culot est repris dans du milieu MEFs, permettant le comptage des cellules qui sont alorsensemencées à 6500 par cm^2 .

1.1.4 Inactivation des fibroblastes embryonnaires murins :

Au passage 5, lorsque les cellules arrivent à 100% de confluence, les MEFs sont traitées avec $10\mu\text{g}/\text{mL}$ de Mitomycine C (Sigma) ajoutée au milieu de culture des MEFs. Les cellules sont ensuite incubées à 37°C pendant 2h puis sont lavées deux fois en PBS, digérées avec de la trypsine et comptées sur lame Malassez. Les fibroblastes sont ensuiteensemencés à 30000 cellules par cm^2 dans une boîte de pétri préalablement incubées avec de la gélatine. Les MEFs mitomycinées peuvent être utilisées de 1 à 5 jours après le traitement et sont conservées dans un incubateur à 37°C et 5% de CO_2 .

MATERIELS ET METHODES

1.2 Culture des Cellules Souches Embryonnaires Murines (CSEm):

1.2.1 Production du LIF (Leukemia Inhibitory Factor)

Le LIF est produit en récupérant le surnageant de cellules COS en culture exprimant le LIF recombinant. Pour cela, les COS sont cultivées 5 jours avec du milieu alpha-MEM (Invitrogen) sans glutamine) supplémenté de 10% de SVF (sérum de veau fœtal, Hyclone) et de 1% de pénicilline/streptomycine. Le LIF est récolté juste avant la confluence des cellules puis filtré sur filtre PES 0.2µm. Il est ensuite aliquoté et gardé à -80°C. Ce LIF est ensuite testé afin de déterminer son utilisation, sur 5 passages entre 1/1000^{ème} et 1/500^{ème}.

1.2.2 Propagation des Cellules Souches Embryonnaires Murines (CSEm):

La lignée cellulaire CK35 sauvage et mutée nous a été donnée par le Dr Gisèle Bonne (La Pitié Salpêtrière, Paris). Les cellules souches portant la mutation H222P ont été produites par recombinaison homologue dans les CK35 (Kress et al., 1998) après transfection d'un vecteur d'expression stable (Arimura et al., 2005). Les lignées cellulaires CK35 et H222P sont mises en culture, à 37°C en atmosphère humide sous 5% de CO₂, en présence de milieu de culture appelé milieu de propagation (GMEM (Glasgow Minimum Essential Medium) + acides aminés non essentiels (AANE) 1% + sodium pyruvate (Na/Pyr) 1% + β-mercaptoéthanol 10⁻⁴ M (tous Invitrogen)) supplémenté par 7,5 % de SVF (Hyclone), additionné d'antibiotiques (pénicilline/streptomycine (P/S) 100 µg/ml) et de LIF (surnageant de cellules COS exprimant le LIF recombinant). A confluence et après élimination du milieu, le tapis cellulaire est lavé avec du PBS. Les cellules sont ensuite décollées de leur support par digestion enzymatique (Trypsine 0.05% Gibco by Life Technologies) pendant 5 minutes à 37°C. La suspension cellulaire est reprise dans du milieu de culture complet. Les deux lignées sontensemencées dans des boîtes de culture cellulaire recouvertes de gélatine 0,1% (Sigma).

1.2.3 Congélation des CSEm

Après dissociation enzymatique des CSEm la suspension cellulaire est reprise dans du milieu de congélation (50% SVF + 40% de milieu de propagation + 10% DMSO). Des

MATERIELS ET METHODES

cryotubes contenant 1.10^6 cellules par tubes sont placés dans des containers de congélation (Nalgene Cryo Freezing Container) pendant 24h à -80°C avant d'être stockés à -150°C .

1.2.4 Différenciation des CSEm :

Après dissociation enzymatique des CSEm, la suspension cellulaire est reprise dans du milieu de différenciation (GMEM + AANE 1% + Na/Pyr 1% + β -mercaptoéthanol 10^{-4}M (tous Invitrogen) supplémenté par 20 % de SVF, additionné d'antibiotiques (P/S 100 $\mu\text{g/ml}$)). Les cellules sont comptées sur lame de Malassez. Elles sont diluées à la concentration de 25000 cellules par mL.

Des corps embryoïdes sont formés par la méthode de culture en gouttes pendantes (Maltsev et al., 1993). Environ 120 gouttes sont formées sur le couvercle d'une boîte de bactério contenant 5mL de PBS. Le couvercle est retourné avec précaution et les corps embryoïdes (CE) se forment par gravité dans la goutte. Ils sont alors au stade J0. Deux jours plus tard, après la formation des gouttes, celles-ci sont récupérées et environ 200 CE sont mis dans une boîte de bactério contenant 10mL de milieu de différenciation et sont laissés en suspension durant 3 jours. 5 jours après l'initiation de la différenciation, les CE sont ensuite mis en adhésion dans une plaque 48 puits préalablement incubée avec de gélatine 0.1% à raison d'un CE par puits. Le milieu est changé tous les deux jours pendant toute la période de différenciation.

Le nombre de corps embryoïdes battants est ensuite compté quotidiennement entre le jour 7 et le jour 18 afin d'évaluer l'efficacité de la différenciation.

1.2.5 Génération d'un clone de CSEm par recombinaison génétique

1.2.5.1 Electroporation

Le vecteur plasmidique (voir la section clonage pour la création du plasmide pEGFPC1- Promoteur de l'Alpha actine - LMNA- GFP) est introduit dans le noyau de la

MATERIELS ET METHODES

CSEm par nucléofection (électroporation) selon le protocole et le matériel recommandé par le fabricant Amaxa. Après arrêt de la digestion enzymatique, les cellules sont comptées grâce à une cellule de Malassez. Un millions de cellules sont centrifugées pendant 5 minutes à 1000rpm et remises en suspension dans 100 µl de solution « Mouse ES cells nucleofector solution» (Amaxa) contenant 1µg de d'ADN plasmidique. La suspension cellulaire est transférée dans une cuvette et l'électroporation est réalisée avec l'appareil « *Nucleofector* » (Amaxa). Les cellules « nucléofectées » sont reprises dans du milieu de propagation supplémenté par du LIF 1/100^{ème} et cultivées sur MEFs résistantes à la néomycine (Millipore) pendant 96 heures.

1.2.5.2 Sélection des clones recombinés

Les cellules sont ensuite propagées dans du milieu de propagation additionné de LIF au 1/1000^{ème} avec en supplément de la néomycine à la concentration de 200µg/mL, afin de sélectionner les cellules ayant acquise une résistance à l'antibiotique grâce à l'insertion du plasmide. Les cellules sont gardées dans ces conditions pendant 10 jours, le temps de laisser la sélection clonale opérer, puis sont cultivées sur MEFs en conditions normales. Après deux passages, ces cellules peuvent être congelées ou être mises en différenciation, selon les deux protocoles décrits ci-dessus.

1.3 Culture des cellules souches humaines à pluripotence induite (hiPS)

1.3.1 Génération des hiPS

Les fibroblastes porteurs de la mutation *Imna*^{+H222P} nous ont été fournis par la banque de cellules de l'AFM, par le Biais de l'équipe du Dr Gisèle Bonne (La Pitié Salpêtrière, Paris), après une lettre de consentement signée par les parents du patients, nous permettant de générer des iPS à partir de ces cellules. Ces cellules ont été ensuite amplifiées et cultivées jusqu'au passage 8 puis envoyées en Israël, au Technion . Les iPS porteuses de la mutation *Imna*^{+H222P} ont été générées, par Isabelle Petit à l'aide d'un rétrovirus portant des gènes Oct4, Lin24, Nanog et Sox2. Celles-ci nous ont ensuite été renvoyées à passage 9 afin d'être

MATERIELS ET METHODES

amplifiées puis sélectionnées. Nous avons choisi les clones 6 et 9, qui ne semblaient pas présenter de problèmes au niveau de leur pluripotence et répondant bien au BMP2. Les clones sauvages proviennent quand à eux des Etats-Unis, le clone 11 provenant du laboratoire du Dr Chad Cowan à Boston, dans le Massachussets et le JL2 du laboratoire de Joseph C. Wu à l'école de médecine de Standford, en Californie.

1.3.2 Propagation des Cellules Souches humaines à pluripotence induite (hiPS) :

Les hiPS sont cultivées sur des MEF dans du milieu KO-DMEM (Life Technologies) enrichi en 15% SR (Serum Replacement, Life technologies), NEAA 1%, GlutaMax (Life technologies) 1%, β -mercaptoéthanol 10^{-4} M (0.1%) auquel est ajouté extemporanément 10 ng/mL de FGF2 (Peprotech). Le milieu est changé quotidiennement et les cellules sont passées tous les 4 jours à la collagénase de type IV (Gibco) à la concentration de 1 mg/ml. Cette enzyme agit à 37°C pendant 45min puis son action est annulée avec du milieu de propagation hiPS et les cellules sont ensuite centrifugées à 800rpm pendant 4min. Elles sont resuspendues en milieu KO-DMEM et les clones sont cassés mécaniquement à l'aide d'une pipette de 5mL. Les amas d'une vingtaine de cellules sont ensuiteensemencés sur une boîte contenant des MEFs mitomycinées.

1.3.3 Congélation des iPS

Après action de la collagénase IV sur les cellules pendant 45 minutes et un lavage dans du milieu de propagation par centrifugation pendant 4 minutes à 800rpm, le culot cellulaire est cassé 20 fois à la pipette de 5mL puis centrifugé une seconde fois à 800rpm pendant 4 minutes. Les cellules sont ensuite reprises dans 800 μ L de milieu de congélation humain (90% SVF + DMSO 10 %) et transférées à -80°C dans un système de congélation Nalgene Cryo Freezing Container. Le lendemain, les cryotubes sont placés dans à -150°C.

MATERIELS ET METHODES

1.3.4 Différenciation des cellules iPS

1.3.4.1 Différenciation en corps embryoides

Après dissociation enzymatique et mécanique, les hiPS sont centrifugées, puis resuspendues dans le milieu de différenciation (DMEM enrichi en 20% SVF, 1% AANE et 0,1% β -mercaptoéthanol). Ces agrégats sont ensuiteensemencés sur des boîtes à faible adhérence (Nunc, Thermo Scientific) à raison de l'équivalent d'une boîte de 10 cm dans une boîte de 6 cm de diamètre. Ces cellules sont cultivées pendant 7 jours avant une mise en adhésion sur gélatine dans des plaques 24 puits, à raison de 4 corps embryoides par puits.

1.3.4.2 Induction du mésoderme au BMP2

Après une action de décollement enzymatique et une dissociation mécanique, les hiPS sontensemencées sur MEF. Après un jour de culture en Nutristem® (Stemgent), le milieu est changé pour un milieu de différenciation RPMI 1640 (Life Technologies) enrichi en sérum albumine humaine (HSA) et B27 (Life Technologies). Extemporément et après mise à 37°C du milieu, est ajouté du BMP2 (Invitrogen) à la concentration de 10 ng/ml et un inhibiteur spécifique des récepteurs aux FGF2, le SU5402 à la concentration de 1 μ M. Le milieu est ensuite changé quotidiennement pendant 6 jours. Pour potentialiser l'effet du BMP2, du Wnt3a à la concentration de 50ng/mL (Peprotech) est utilisé dans certaines différenciations.

2 Biologie Moléculaire

2.1 Construction plasmidique

La séquence de la prélamine A sauvage provenant du plasmide pGBT9 (Ye and Worman, 1995) a été clonée dans le vecteur pSVK3 (Amersham Pharmacia Biotech, Inc., Piscataway, NJ), contenant un site multiple de clonage sous le promoteur SV-40 (Ostlund et al., 2001). L'ADNc de la prélamine A a ensuite été amplifié par PCR à partir de cette construction en y ajoutant les sites EcoR1 et Kpn1. Cette séquence a ensuite été insérée dans un vecteur pEGFP-C1 digéré au préalable par ces deux mêmes enzymes (Favreau et al.,

MATERIELS ET METHODES

2004). Ce vecteur nous a ensuite été donné par l'équipe de Brigitte Buendia (Institut Jacques Monod) (Figure 31).

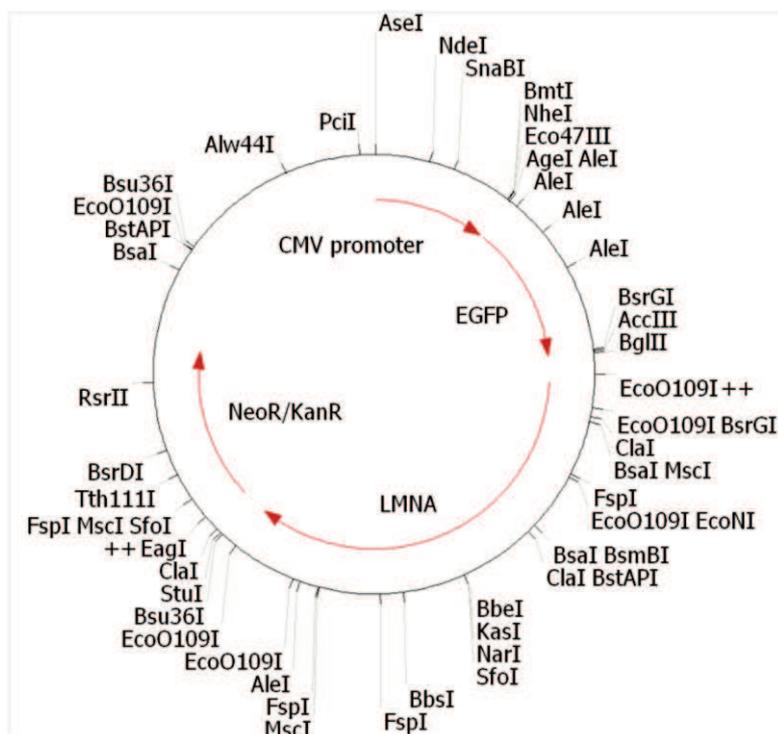


FIGURE 31 : PLASMIDE PEGFPC1/HLMNA (FAVREAU ET AL., 2004)

C'est à partir de ce plasmide, que le pEGFP-C1/PrélamineA/promoteur α -actine cardiaque a été créé (Figure 32). L'ADNc codant pour le promoteur de l' α -actine cardiaque a été amplifié à partir d'ARN de corps embryoïdes battants produits à partir de CSEm sauvages à l'aide d'oligonucléotides contenant chacune à son extrémité l'enzyme de restriction nécessaire à son insertion dans la plasmide pEGFPC1/hLMNA (Tableau 3). Le promoteur CMV a été sorti du plasmide par les enzymes NheI et NdeI. En même temps, l'ADNc de l' α -actine cardiaque murine a été digéré par ces deux mêmes enzymes. Le produit de ces digestions a ensuite été analysé par électrophorèse en gel d'agarose, et le plasmide pEGFP-C1/Prélamine A sans le promoteur CMV ainsi que le promoteur de l'alpha actine cardiaque amplifié par PCR ont été extraits du gel. Ces produits ont ensuite été ligués.

MATERIELS ET METHODES

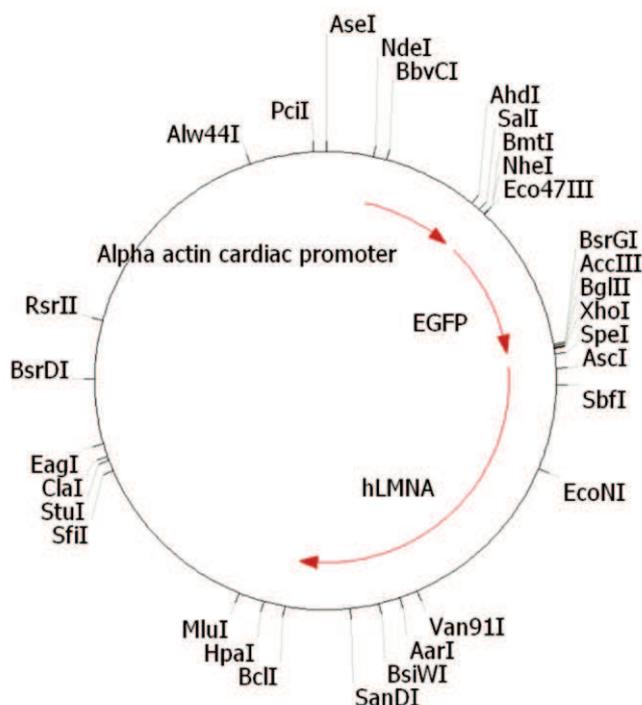


FIGURE 32 : PLASMIDE PEGFP-C1/HLMNA/PROMOTEUR A-ACTINE CARDIAQUE

2.1.1 PCR d'amplification du promoteur de l'alpha actine cardiaque

Nom de l'oligonucléotide	Séquence	Tm
P actine NdeI Forward	5' CGCTACCGGACTCATATGTCGA 3'	68°C
P actine NheI Reverse	5' CCATGGTGGCTAGCGGTG 3'	68°C

TABLEAU 3 : PRIMERS UTILISES POUR LE CLONAGE DU PEGFPC1

La PCR d'amplification du promoteur de l' α -actine cardiaque a été réalisée à l'aide de la Phusion[®] (Finnzyme, Thermo scientific), une polymérase de haute fidélité, capable d'amplifier de longs amplicons. Le mélange réactionnel contient 2 μ l d'ADNc obtenus à partir d'ARN provenant de corps embryoïdes murins battants (voir la partie transcription inverse) dilués 10 fois, le tampon de réaction de l'enzyme « Phusion HF Buffer[®] 5X» dilué 5

MATERIELS ET METHODES

fois, 200 μ M de chaque dNTP, 0,5 μ M d'amorce sens et 0,5 μ M d'amorce anti-sens, et 0.022U/ μ L de l'enzyme Phusion[®].

L'échantillon est placé dans le thermocycleur Genamp PCR system 9700 (Applied Biosystem) pour subir : 1 cycle de dénaturation initiale 30 secondes à 95°C, 30 cycles comportant les étapes de dénaturation 10 secondes à 98°C, d'hybridation 30 secondes à $T_m + 3^\circ\text{C}$ (ici 71°C) et d'élongation 30 secondes à 72°C. Enfin les échantillons subissent un cycle final d'extension 10 minutes à 72°C. La spécificité des produits de PCR est ensuite confirmée par électrophorèse sur gel d'agarose 1 %. L'ADN amplifié est stocké à 4°C.

2.1.2 Electrophorèse sur gel d'agarose

Les échantillons d'acides nucléiques dilués dans du bleu de charge (bleu de bromophénol 0,02 %, glycérol 3 %, dans du tampon Tris-EDTA, acide éthylène diamine tétra acétique (Invitrogen)) et sont déposés sur un gel d'agarose 1 % (Tampon de migration TBE ((Kress et al., 1998)Tris base 90 mM pH 8,3 + Borate 90 mM + EDTA 2 mM) (Invitrogen), contenant 0,3 μ g/ml de BET (bromure d'athyrium, Invitrogen)). L'électrophorèse s'effectue dans le tampon de migration TBE sous un voltage constant de 100 V. Après une exposition aux UV, une photographie du fragment d'ADN ayant incorporé le BET est prise. La taille des fragments estimée à l'aide d'un marqueur et est comparée à la taille théorique attendue.

2.1.3 Purification d'ADN sur gel d'agarose

Après analyse sur gel d'agarose, les bandes d'intérêt sont découpées sous UV. L'ADN est ensuite extrait et purifié à l'aide du kit « *NucleoSpin[®] Extract* » (Macherey-Nagel) selon les recommandations du fabricant. Le principe de purification de ce kit repose sur l'affinité de l'ADN pour un gel de silice.

2.1.4 Digestion

Les produits de PCR codant pour le promoteur de l'alpha actine cardiaque et le plasmide pEGFPC1/hLMNA sont digérés par les enzymes de restriction NdeI et NheI (New

MATERIELS ET METHODES

England Biolabs - NEB) à 37°C pendant 2 heures dans un tampon compatible avec l'activité des deux enzymes (ici le tampon n° 2 ou 4). Une unité d'enzyme est définie comme la quantité capable de cliver 1 µg d'ADN. Vingt unités sont utilisées pour une réaction. Les produits de digestion sont analysés par électrophorèse sur gel d'agarose 1 %.

2.1.5 Ligation

La ligation de l'insert dans le vecteur (50 ng) est effectuée par la « *Quick T4 DNA ligase* » (2000 U, Biolabs) dans du tampon « *2X Quick Ligation Buffer* ». La ligation se fait dans un ratio molaire de 3 : 1 (insert : vecteur). Le vecteur (plasmide pEGFPC1/hLMNA) a été préalablement traité à la CIP (Calf Intestine alkaline Phosphatase) afin de supprimer les phosphates situés aux deux extrémités, et éviter que celui-ci ne se referme sur lui-même. Le mélange réactionnel, complété à 20 µl avec de l'eau, est incubé une nuit à 16°C.

2.1.6 Transformation des bactéries

Deux microlitres de produits de ligation sont incubés en présence de 50 µL de bactéries *One Shot® TOP10 Competent Cells* (Invitrogen) dans la glace, pendant 30min. La transformation (perméabilisation transitoire) se fait par choc thermique et s'effectue en incubant les bactéries à 42°C pendant 20 secondes puis dans la glace pendant 2 minutes. Les bactéries sont ensuite incubées 1 heure à 37°C avec 250 µL de milieu SOC (tryptone 20 g/L, extrait de levure 5 g/L) sous agitation, puis étalées sur des boîtes de pétri contenant du LB-Agar (Lennox L Agar, Invitrogen (Peptone 140 10g/L, extrait de levure 5 g/L, NaCl 5g/L, Agar 12g/L) et de 50 µg/mL de kanamycine. Les bactéries sont cultivées une nuit à 37 °C. Le lendemain, plusieurs colonies bactériennes sont prélevées et mises en culture dans 5 mL de milieu LB (Lennox L Broth base, Invitrogen (Peptone 140 10g/L, extrait de levure 5 g/L, NaCl 5g/L) et de 50 µg/mL de kanamycine. Les bactéries sont cultivées à 37°C, sous agitation, pendant 8 heures.

MATERIELS ET METHODES

2.1.7 Préparation d'ADN plasmidique

Deux millilitres de la culture précédente sont prélevés et centrifugés à 15 000 g pendant 1min. Après lyse des cellules, l'ADN plasmidique est extrait et purifié à l'aide du kit « *NucleoSpin® Plasmid QuickPure* » (Macherey-Nagel) selon les recommandations du fournisseur. L'ADN purifié est mis en suspension dans 50 µL de tampon TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8, EDTA 0,1 mM). La concentration en ADN est évaluée par microspectrophotométrie (Nanodrop). L'ADN est conservé à 4°C. La présence de l'insert dans les plasmides extraits est vérifiée par PCR et par digestion enzymatique. Après vérification de l'efficacité du sous-clonage par séquençage, les clones positifs sont amplifiés puis une maxi préparation d'ADN plasmidique est effectuée.

2.2 Extraction des ARNs totaux

Les ARNs totaux sont extraits à l'aide du kit « *Quick-RNA™ Mini-prep* » (Zymo Research) selon les recommandations du fabricant. Le principe de purification de ce kit repose sur l'affinité des ARNs pour un gel de silice. Les ARNs totaux extraits (25 µL) sont conservés à -80°C. La concentration des ARNs totaux extraits ainsi que leur contamination par des solvants ou des sels sont évaluées par microspectrophotométrie (Nanodrop).

2.3 Transcription inverse

Dans un premier temps, 3,5 mM de dNTPs (Invitrogen) et 300 ng d'amorces Oligo(dT)12-18 (Invitrogen) sont ajoutés à 1 µg d'ARNs totaux. Le volume réactionnel est complété à 13,4µL avec de l'eau « *RNase-free* » avant d'être incubé pendant 5 minutes à 65°C dans un bain-marie. Dans un second temps, 4 µL de tampon de RT (*5X tampon First-Strand*, Invitrogen), 0,01 M de DTT (dithiothréitol, Invitrogen) et 1 unité d'enzyme (*SuperScript™ II RT*, Invitrogen) sont ajoutés au mélange réactionnel.

Placé dans le thermocycleur, l'échantillon subit les étapes suivantes :

- Elongation : 2 heures à 42°C

MATERIELS ET METHODES

- Dénaturation de l'enzyme 15 minutes à 70°C. Les molécules d'ADNc ainsi synthétisées sont stockées à -20°C avant utilisation.

2.4 PCR quantitative (qPCR) ou en temps réel

Le mélange réactionnel contient 2 µL d'ADNc dilués 10 fois, 10 µL de mix de PCR SYBR Green I (Roche Diagnostics, incluant l'ADN polymérase, les dNTPs, 3 mM de MgCl₂ et la sonde fluorescente SYBR Green), 0,2 µM d'amorce sens et 0,2 µM d'amorce anti-sens. Les mix pour les qPCRs réalisées sur le LC480 ou le LC1.5 ne sont pas les mêmes.

Le LC1.5 est un appareil de chez Roche Diagnostic qui fonctionne avec des capillaires transparents et le LC480, toujours produit par Roche, est un appareil permettant d'effectuer des qPCR mais fonctionnant avec des plaques 96 ou 384 puits.

L'échantillon est placé dans le thermocycleur LightCycler 1.5 ou LightCycler 480 pour subir :

-1 cycle de dénaturation initiale (8 (LC1.5) ou 15 (LC480) minutes à 95°C)

-40 cycles comportant les étapes de

- Dénaturation (3 (LC1.5) ou 15 (LC480) secondes à 95°C,
- D'hybridation (8 (LC15) ou 15 (LC480) secondes à 65°C)
- D'élongation (8 (LC15) ou 15 (LC480) secondes à 72°C).

La fluorescence émise par le SYBR Green, proportionnelle à la quantité d'ADN double brin synthétisé, est mesurée à la fin de chaque cycle. Pour caractériser le produit de PCR obtenu, une courbe de fusion est réalisée à la fin du dernier cycle.

Trois étapes permettent d'obtenir la température de fusion ou T_m (*melting curve*) :

- Dénaturation de l'ADN par chauffage rapide à 96°C (20°C/seconde (LC1.5) ou 4,4°C/seconde (LC480)) puis
- Refroidissement rapide à 72°C pendant 30 secondes (20°C/seconde (LC1.5) ou 2,2°C/seconde (LC480)).

MATERIELS ET METHODES

- Augmentation progressive de la température jusqu'à 98°C (0,1°C/seconde (LC1.5) ou 0,06 (LC480)) pour visualiser l'instant « Tm » où les brins d'ADN s'ouvrent. La fluorescence émise par le SYBR Green est mesurée tout au long de la phase de chauffage lent. Elle décroît légèrement puis subitement au moment où le double brin d'ADN s'ouvre larguant le SYBR green (point de fusion). Le point de fusion (Tm) du fragment est alors calculé en prenant la dérivée seconde de la courbe de fusion. La spécificité des produits de PCR est ensuite confirmée par électrophorèse sur gel d'agarose 1 %. L'ADN amplifié est stocké à 4°C.

Gene	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')
ATP50	CTATGCAACCGGCCTGTACT	GATGATACGGTGGGTGTTGC
Brachyury (T)	GACTTCGTGACGGCTGACAA	CGAGTCTGGGTGGATGTAG
MesP	GTGCCTTTATCTGCCTCTTCTG	AGCGGGGGTGTCTTGTCTC
Mef2c	AGATACCCACAACACACCACGCGCC	ATCCTTCAGAGAGTCGCATGCGCTT
Isl1	CATCGAGTGTTTCCGCTGTGTAG	GTGGTCTTCTCCGGCTGCTTGTGG
Nkx2.5	ACATTTTACCCGGGAGCCTACGGTG	GCTTTCCGTCGCCGCCGTGCGCGTG
Tbx5	CCAGCTCGGCGAAGGGATGTTT	CCGACGCCGTGTACCGAGTGAT
Mlx1	CAAGGCGGGGAGTTTTCTC	TCCCAGGAGTCCAACCTTTGAG
Nestinee	GAGAGAGGCGTGGAACAGAGATT	AGACATAGGTGGGATGGGAGTGCT
GSC	CAGATGCTGCCCTACATGAAC	TCTGGGTACTIONCGTCTCCTGG
Sox17	CGAGCCAAAGCGGAGTCTC	TGCCAAGGTCAACGCCTTC
Nanog	TTGCCTCGTCTTGCTTTAGG	AAAATGAATGAACAAATGAAGAAAA
Oct4	TGCCTCCAAGTGTTGTCCC	ATTCATGTTGTCTTAGCTGCTTCC

TABLEAU 4: SEQUENCES D'OLIGONUCLEOTIDES UTILISEES POUR LES QPCRS SUR LES ECHANTILLONS MURINS

Pour chaque échantillon, l'expression du gène d'intérêt est normalisée par rapport à celle du gène de ménage ubiquitaire GAPDH (pour les cellules humaines) ou ATP50 (pour les cellules murines). Le gène de ménage constitue alors une référence, permettant de s'assurer

MATERIELS ET METHODES

que la quantité d'ADNc est identique pour chaque échantillon.. L'efficacité d'amplification est déterminée au préalable pour chaque couple d'amorces en réalisant une gamme standard générée avec un échantillon d'ADNc dilué successivement au 10^{ème}. L'efficacité est donnée par le calcul $E=10^{-1/\text{pente de la courbe d'étalon}}$ (2 pour une amplification de 100%).

L'analyse des résultats est réalisée à l'aide du logiciel *LightCycler1.5/480 Instrument Operator* (Roche Diagnostics) qui permet la détermination pour chaque échantillon du « *Crossing point* » (Cp), c'est-à-dire le cycle correspondant au maximum de la dérivée seconde de la courbe de fluorescence. Les quantités relatives d'ADN présentes dans les différents échantillons sont données par l'équation proposée par Pfaffl (Pfaffl, 2001).

$$E_{\text{gène Cible}}^{(\text{CpContrôle}-\text{CpEchantillon})} / E_{\text{gène Référence}}^{(\text{CpContrôle}/\text{CpEchantillon})}$$

Avec E étant l'efficacité d'amplification de la paire de sondes.

Gene	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')
GAPDH	ATGGGCAAGGTGAAGGTCCGAG	TCGCCCGACTTGATTTTGCAGG
Brachyury (T)	CGGAACAATTCTCCAACCTATT	GTA CTGGCTGTCCACGATGTCT
MesP	CTCTGTTGGAGACCTGGATG	CCTGCTTGCCTCAAAGTG
Mef2c	AGATACCCACAACACACCACGCGCC	ATCCTTCAGAGAGTCGCATGC
Isl1	CGCGTGCGGACTGTGCTGAAC	TTGGGCTGCTGCTGCTGGAGT
Nkx2.5	CATTTACCCGGGAGCCTACG	GCTTTCCGTCGCCGCCGTGCGCGTG
Tbx5	TACCACCACACCCATCAAC	ACACCAAGACAGGGACAGAC
Nestine	GGCAGCGTTGGAACAGAGGT	TGGATGCAGGGATGATGTTC
Sox17	GGCGCAGCAGAATCCAGA	CCACGACTTGCCCAGCAT
Nanog	CAAAGGCAAACAACCCACTT	TCTGCTGGAGGCTGAGGTAT
Oct4iA	CTCCTGGAGGGCCAGGAATC	CCACATCGGCCTGTGTATAT
GSC	GCCTCGGCTAACTACT	CTCGTCAGTGTGGTGC

TABLEAU 5: SEQUENCES D'OLIGONUCLEOTIDES UTILISEES POUR LES QPCRS SUR LES ECHANTILLONS HUMAINS.

MATERIELS ET METHODES

2.5 Immunofluorescence

Trois lavages successifs des cellules en culture sont effectués avec du PBS. Les cellules sont fixées avec du PFA 3 % (paraformaldéhyde, Sigma) pendant 15 minutes (Pour les EBs) ou 7 minutes (pour les cellules) à température ambiante. Le PFA est ensuite éliminé par 2 rinçages au PBS suivi d'un rinçage au chlorure d'ammonium (NH₄Cl). Les sites non spécifiques sont bloqués en incubant les cellules dans du PBS-BSA 3% (sérum albumine bovine, Sigma). Les membranes cellulaires sont perméabilisées en incubant la préparation avec une solution de Triton X100 0,3 % (Sigma) + PBS pendant 5 minutes à température ambiante. La préparation cellulaire est incubée une nuit à 4°C en chambre humide en présence d'un anticorps monoclonal ou polyclonal spécifique de la protéine d'intérêt, dilué dans la solution Tween 0.01 % + BSA 3 % + PBS (voir tableau 6). L'excès d'anticorps non fixé est éliminé par 3 lavages successifs de 5 minutes dans du PBS/Tween0.01%. Le complexe protéine-anticorps ainsi formé est détecté en incubant les cellules 1 heure à température ambiante à l'abri de la lumière avec un anticorps secondaire qui est couplé de manière covalente à un fluorochrome et dilué dans une solution 0.01% + BSA 3 % + PBS. Les anticorps secondaires (monoclonaux de chèvre), anti-IgG de lapin, anti- IgG d'âne ou anti-IgG de souris sont couplés à l'Alexa 350, 488, 546 ou 680 (Invitrogen, 1/1000^{ème}). L'excès d'anticorps non fixé est éliminé par 3 lavages successifs de 5 minutes dans du PBS/Tween0.01% puis la préparation est ensuite incubée 5 minutes dans du DAPI (4'-6 diamidino-2-phénylindole, 1/50 000^{ème}, VWR) + PBS. Après dépôt du liquide de montage (Fluoromount-G™, Southern Biotech), les cellules sont observées grâce à un microscope à épifluorescence (Leica combiné avec le logiciel microvision) ou un microscope confocal (Zeiss LSM 510 meta).

MATERIELS ET METHODES

Anticorps	Référence	Réactivité
Alpha actinine cardiaque	Sigma/A7732	Souris/ humain
Mef2c	Aviva Systems Biology ARP37342_T100	Souris /humain
Lamin A/C	4A7 : produit par Glenn Morris	Souris
Lamin A/C	Human lamin A/C Novacastra NCL--LAM-A/C	humain
Lamine B	Santa Cruz/sc-6216	Souris
Nkx2.5	R&D MAB2444 / H114 Santa Cruz	Souris/ humain
Isl1	DHSB	Souris/ humain
Oct4	Santa Cruz SC9081	Souris/ humain
Nanog	R&D Systems AF1997	Souris/ humain
SSEA4	R&D Systems MAB1435	humain
SSEA1	CD15+ couplé au FITC	Souris /humain
Sox17	R&D Systems MAB1924	Souris /humain
Brachyury (T)	R&D Systems AF2085	Souris /humain
MesP1/2	Aviva Systems Biology ARP36921_T100	Souris /humain
Tbx6	Aviva Systems Biology ARP33405_P050	Souris /humain

TABLEAU 6 : LISTE DES ANTICOPRS PRIMAIRES UTILISES

3. Analyse statistique

Les résultats ont été analysés par le test de test T de Student pour des échantillons non appariés grâce au logiciel en ligne gratuit Graph Pad Software QuickCalc. Ils sont présentés sous forme de moyenne +/- SEM ou +/- SD et sont considérés comme significatifs pour $p < 0,05$. (** $p < 0,0001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$).

RESULTATS

RESULTATS

1 Etude du phénotype $lmna^{+/H222P}$ sur le modèle des cellules souches embryonnaires murines (CSEm) :

Le premier modèle à avoir été utilisé dans ce projet est celui des cellules souches embryonnaires murines soit sauvages de la lignée CK35 soit porteuses de la mutation $lmna^{+/H222P}$. Ces CSEm ont permis de faire les souris $lmna^{+/H222P}$ et $lmna^{H222P/H222P}$.

1.1 Pluripotence des CSEm :

Les cellules souches embryonnaires (CSEm) murines pluripotentes sont maintenues en culture à l'état indifférencié. L'état de pluripotence est absolument nécessaire à la bonne différenciation des CSE vers les 3 feuillets embryonnaires. Il est donc primordial de s'assurer du bon degré de pluripotence des clones sauvages et porteurs de la mutation $lmna^{+/H222P}$, afin d'être sûr que le phénotype observé sera du à la pathologie. Dans cette étude, nous avons choisi de nous intéresser à l'expression de deux facteurs de pluripotence qui sont SSEA1, un marqueur membranaire de pluripotence spécifiquement murin (Solter and Knowles, 1978) et Oct4, un facteur de transcription impliqué dans la boucle de pluripotence (Niwa et al., 2000).

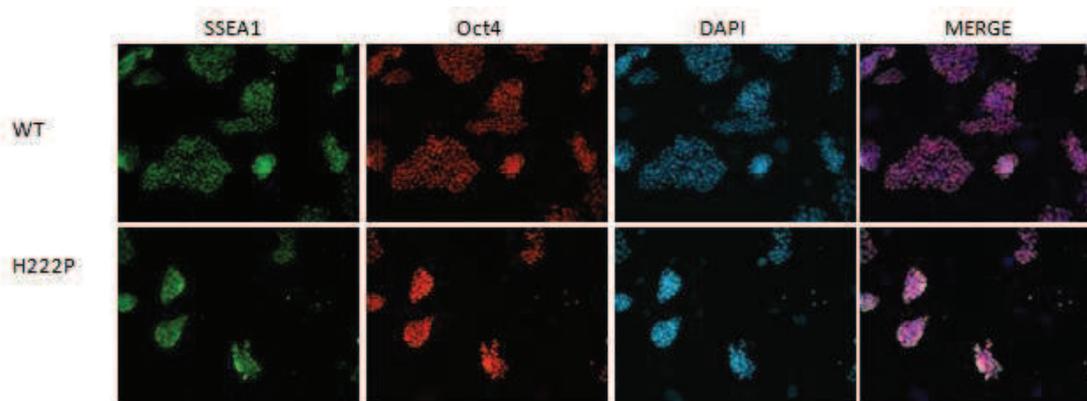


FIGURE 33: PLURIPOTENCE DES CSEM.

La pluripotence des CSEm est évaluée à l'aide des marqueurs de pluripotence SSEA1 (membranaire) et Oct4 (nucléaire) dans les clones sauvages (WT) et porteurs de la mutation $lmna^{+/H222P}$ (H222P) deux jours après passage. Les images ont ensuite été analysées au microscope à épifluorescence et des images individuelles ont été regroupées avec le logiciel Image J.

RESULTATS

Des immunofluorescences ont été réalisées sur des CSEm après deux jours de culture (Figure 33). Les clones porteurs de la mutation *lmna*^{+H222P} et sauvages sont positifs pour les marqueurs de pluripotence SSEA1 et Oct4, assurant leur bon état de pluripotence.

Une autre manière d'attester de la pluripotence des cellules souches embryonnaires est de regarder l'expression des types de lamine. En effet, la lamine de type A n'est exprimée que dans les cellules différenciées contrairement à la lamine B qui est exprimée par tous les types cellulaires au cours du développement. Afin de valider que le modèle est conforme aux exigences de la pluripotence, l'expression des lamines de type A et B a été vérifiée dans ces clones indifférenciés (Figure 34).

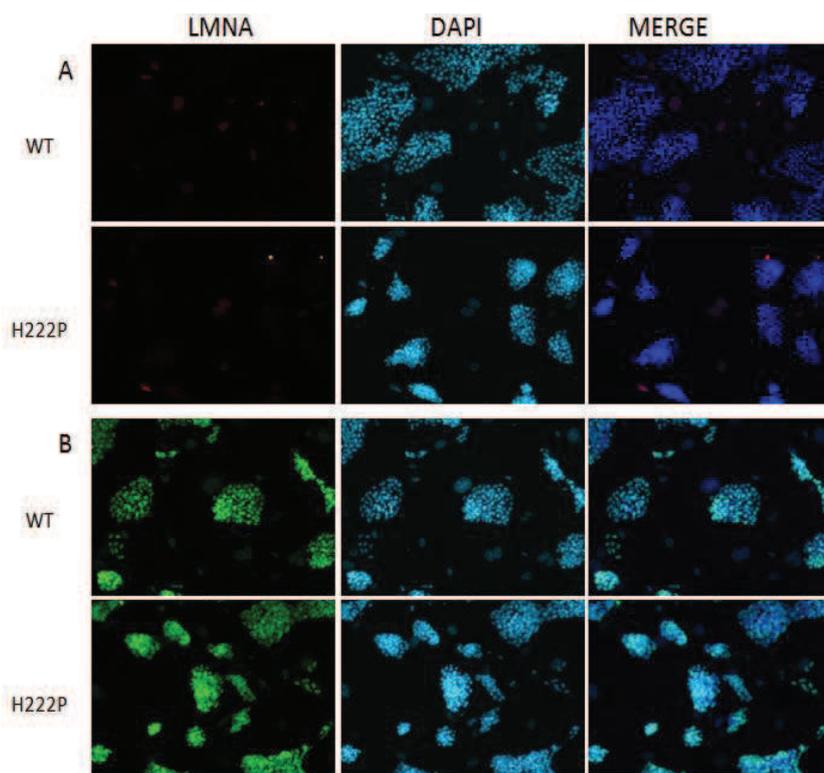


FIGURE 34: EXPRESSION DES LAMINES DANS LES CSEM PLURIPOTENTES

L'expression de la lamine de type A/C et de type B est évaluée à l'aide des anticorps anti-lamine A/C (Gleen Morris, 4A7) et anti-lamine B (Santa Cruz/sc-6216) dans les clones sauvages et porteurs de la mutation *lmna*^{+H222P} deux jours après passage. Les images ont ensuite été analysées au microscope à épifluorescence et des images individuelles ont été superposées à l'aide du logiciel ImageJ.

RESULTATS

On observe ici un marquage lamine A dû aux cellules nourricières présentes sous les CSEm (en rouge), attestant du bon fonctionnement de l'anticorps (Fig. 34A), avec une absence de marquage sur les colonies de CSEm que ce soit dans le clone sauvage ou muté, permettant de confirmer leur état indifférencié. De plus, les deux types de clones expriment la lamine de type B au stade pluripotent à des niveaux similaires (Figure 34B).

Les clones CK35 sauvages et porteurs de la mutation $lmna^{+/H222P}$ présentent donc un bon état de pluripotence et devraient être capables de se différencier dans n'importe quel lignage.

1.2 Expression de la lamine dans les CSEm $lmna^{+/+}$ et $lmna^{+/H222P}$

Nous avons ensuite voulu savoir si la lamine était exprimée au même niveau dans les clones porteurs de la mutation $lmna^{+/H222P}$ et dans les clones sauvages différenciés. Pour cela, une immunofluorescence a été réalisée au jour 12 de différenciation.

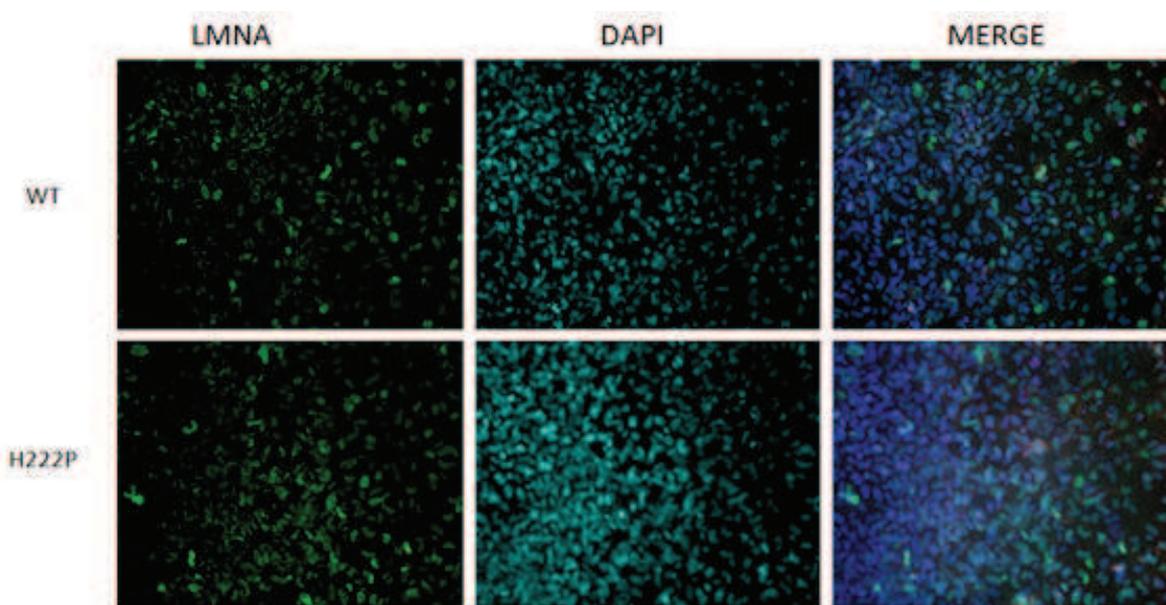


FIGURE 35 : EXPRESSION DES LAMINES DE TYPE A DANS DES CES A 12 JOURS DE DIFFERENCIATION
L'expression de la lamine de type A/C est évaluée à l'aide de l'anticorps anti-lamine A/C (Gleen Morris, 4A7) dans les clones sauvages et porteurs de la mutation $lmna^{+/H222P}$ différenciés en CE à 12 jours de différenciation. Les images ont ensuite été analysées au microscope à épifluorescence et des images individuelles ont été superposées à l'aide du logiciel ImageJ.

RESULTATS

On observe que les lamines de type A sont exprimées au même niveau dans les clones CK35 porteurs de la mutation $Imna^{+/H222P}$ et les clones sauvages à 12 jours de différenciation dans les CEs (Figure 35). Nous avons aussi voulu savoir à partir de quel moment était exprimée la lamine de type A/C dans les cellules murines. Pour cela, nous avons utilisé des CSEm de la lignée CGR8 qui se cultivent sans cellules nourricières (les MEFs exprimant la lamine de type A).



FIGURE 36 : WESTERN BLOT DE L'APPARITION DE LA LAMINE AU COURS DE LA DIFFERENCIATION

L : Ladder (marqueur de poids moléculaire). CGR8 : CSE indifférenciées. CEJ4 : Corps embryoïdes à 4 jours de différenciation. CEJ5 : CE à 5 jours de différenciation. CEJ15 : CE à 15 jours de différenciation. C E8.5 : embryons murins à 8.5 jours de développement. CA : Cœur de souris adulte. 40 μ g de protéines a été chargé dans chaque piste.

On observe ici que la lamine de type A/C n'est pas détectable dans les CSEm indifférenciées et des CE au jour 4 et 5 de différenciation. La lamine est retrouvée de façon très claire dans les CE à J15. On la retrouve aussi dans le contrôle positif, le cœur adulte et on la détecte très légèrement dans le tissu embryonnaire à E8.5 et les CEs à J5 (Figure 36).

Après avoir validé le bon état de pluripotence des clones sauvages et des clones porteurs de la mutation $Imna^{+/H222P}$, ainsi que de la bonne expression de notre gène d'intérêt dans ces deux clones, nous avons voulu voir l'impact de la mutation H222P sur la cardiogenèse *in vitro*. En effet, nous avons voulu voir si le phénotype DMED-AD cardiaque observé chez la souris adulte $Imna^{H222P/H222P}$, apparaissait dans nos cellules souches embryonnaires, constituant alors de ce fait une maladie du développement. La lamine de type A/C étant exprimée au cours du développement, cette protéine peut avoir un effet sur le

RESULTATS

développement embryonnaire ou fœtal. Les cellules souches pluripotentes permettent d'étudier les étapes précoces du développement supposé affectées par la pathologie.

1.3 Différences morphologiques et phénotype cardiaque retardé dans les corps embryoïdes *Imna*^{+H222P} :

Pour étudier la cardiogenèse dans les CSEm, nous avons utilisé la technique de différenciation des CSEm par gouttes pendantes (Maltsev et al., 1993). Cette technique permet de former des structures appelées corps embryoïdes (CE), mimant la structure des 3 feuillets de l'embryon *in vitro*. On peut alors étudier la différenciation cardiaque de différentes manières : tout d'abord, la mesure de l'activité des CEs battants formés grâce à cette technique permet d'avoir une indication sur l'efficacité de la différenciation cardiaque.

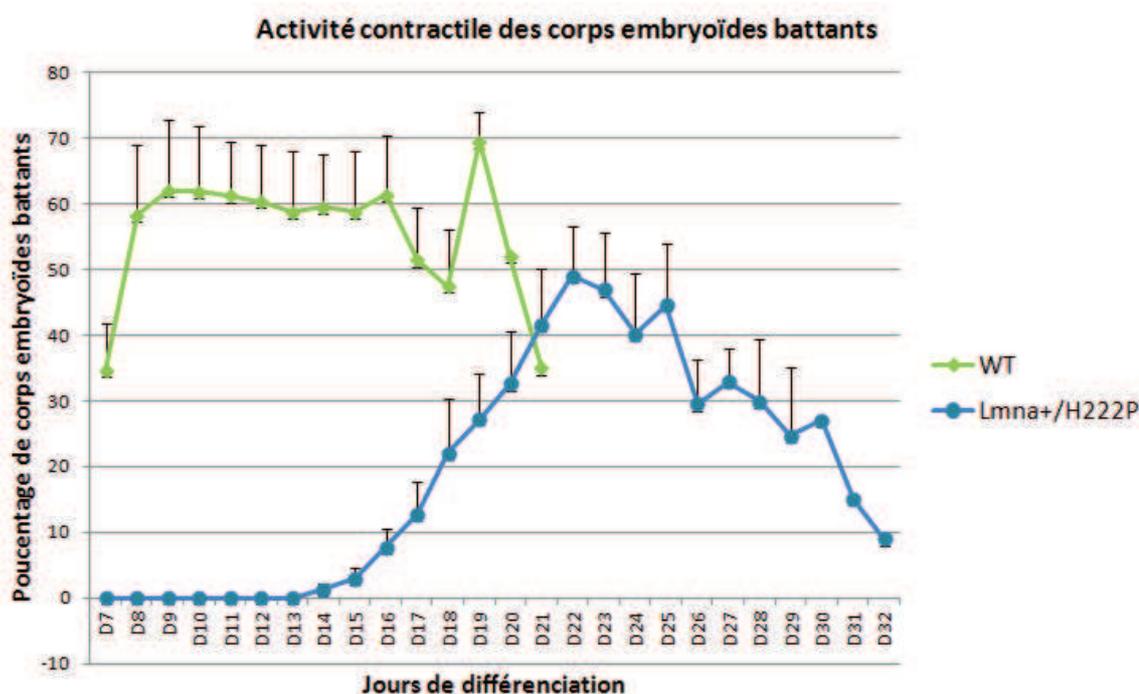


FIGURE 37: ACTIVITE CONTRACTILE DES CORPS EMBRYOÏDES LMNA^{+/+} ET LMNA^{+/H222P}. Les CEs battants sont comptés à partir du jour 7 jusqu'au jour 32 de différenciation. Les valeurs des battements (+/-SEM) ont été déterminées lors de 8 expériences indépendantes.

RESULTATS

En comparant l'activité contractile des CE formés à partir de clones porteurs de la mutation $lmna^{+/H222P}$ et clones sauvages, on observe un phénotype cardiaque retardé dans les clones porteurs de la mutation $lmna^{+/H222P}$ (Figure 37). Alors que les battements des corps embryoïdes sauvages sont détectés à partir du jour 7, de faibles battements dans un ou deux CEs $lmna^{+/H222P}$ apparaissent seulement à partir du jour 12 de différenciation. Ceci est synonyme d'un défaut majeur dans la différenciation cardiaque des CSEm porteurs de la mutation $lmna^{+/H222P}$.

De plus, d'un point de vue morphologique, la taille des CEs mutés au jour 5 de différenciation semble être différente entre les CEs sauvages et mutés, malgré un nombre de cellules équivalent au départ dans la goutte. Une mesure de 164 CEs sauvages et 139 CEs mutés a été réalisée, au jour 5 de la différenciation. Pour cela, des photos de corps embryoïdes sauvages et mutés ont été analysées à l'aide du logiciel ImageJ par une fonction permettant de mesurer l'aire de chaque CE sur la photo (Figure 38A). De manière intéressante, une différence significative entre les clones $lmna^{+/H222P}$ et sauvage a été observée, les CEs $lmna^{+/H222P}$ présentant une taille en moyenne 15% inférieure à celle des CE $lmna^{+/+}$ (Figure 38B). On peut également noter que les CEs formés à partir de cellules mutées sont moins ronds ou homogènes que ceux formés à partir de cellules sauvages (Figure 38A).

Nous avons pu mettre en évidence un phénotype lié à la mutation $lmna^{H222P}$ dans ce modèle de CE battants. Afin de mieux comprendre l'origine de ce phénotype, j'ai voulu tester le réseau transcriptionnel cardiogénique au cours de la différenciation des cellules mutées. Une étude de l'expression de gènes mésodermiques et cardiaques a donc été réalisée aux jours 2, 5, et 7 de la différenciation.

RESULTATS

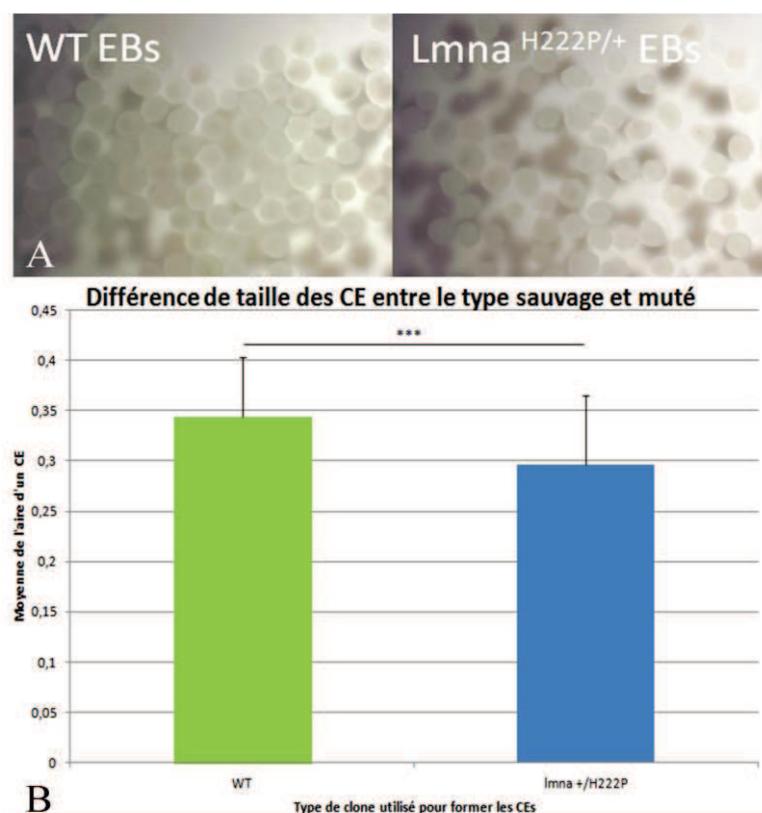


FIGURE 38: DIFFERENCES MORPHOLOGIQUES ENTRE LES CES DE TYPE SAUVAGE LMNA^{+/+} ET LES CES DE TYPE MUTE LMNA^{+H222P} AU JOUR 5 DE DIFFERENCIATION.

(A) Les CEs *lmna*^{+H222P} présentent une taille et une morphologie différente des CEs *lmna*^{+/+}.

(B) Une mesure de 164 CEs *lmna*^{+/+} et 139 CEs *lmna*^{+H222P} (+/-SD) a permis de mettre en évidence une différence de taille de 15% significative ($p < 0.001\%$). Cette analyse a été réalisée à l'aide du logiciel ImageJ.

Tout d'abord, Brachyury (T), un gène de différenciation du mésendoderme/mésoderme très précoce semble être exprimé de la même manière entre les deux types de clones, nous permettant de mettre en évidence le fait que la différenciation mésodermique n'est pas affectée dans les clones porteurs de la mutation *lmna*^{+H222P}. Par la suite, on observe une différence significative d'expression pour le gène MesP1 entre le clones sauvage et *lmna*^{+H222P} au jour 5 de différenciation, temps qui correspond au jour où ce gène est le plus exprimé dans les CSE différenciées (Cohen et al., 2012). En effet, ce gène est 5 fois moins exprimé dans les cellules porteuses de la mutation *lmna*^{+H222P} que dans les cellules sauvages. Il correspond au stade mésoderme cardiovasculaire et en partie myogénique, constituant le

RESULTATS

marqueur le plus précoce, bien qu'il ne soit pas restreint au mésoderme cardiogénique. Un défaut d'expression majeur et significatif du gène *Tbx5*, marqueur du champ cardiaque primaire, est observé au jour 7 de différenciation dans les clones porteurs de la mutation *lmna*^{+H222P}, l'expression de celui-ci étant en moyenne 4 fois moindre que dans les clones sauvages. Le gène *Isl1*, un marqueur du second champ cardiaque mais aussi marqueur précoce de la cardiogenèse, est retrouvé en moyenne 7 fois moins exprimé dans les clones porteurs de la mutation *lmna*^{+H222P} que dans les clones sauvages. Aux jours 5 et 7 de différenciation, cette différence est encore plus marquée. Les gènes cardiaques *Mef2c* et *Nkx2.5*, arrivant plus tardivement au cours du développement cardiaque ont ensuite été étudiés. Le gène *Mef2c* présente pour le clone *lmna*^{+H222P} une expression 7 fois moindre à celle observée dans le clone sauvage au jour 7 de différenciation.

Réunies, ces informations nous permettent d'observer une différenciation cardiaque perturbée dans les cellules porteuses de la mutation *lmna*^{+H222P}. On peut noter dans ces expériences que seuls les gènes du mésoderme très précoce sont exprimés à des niveaux semblables à ceux du clone sauvage dans les clones porteurs de la mutation *lmna*^{+H222P}, le défaut de différenciation arrivant sur des gènes mésodermiques exprimés plus tardivement au cours du développement. Il a été démontré que *Brachyury* (*T*) était un gène de mésendoderme (Tada et al., 2005). De ce fait, on peut penser que l'expression des gènes est bloquée au stade mésendoderme dans les clones porteurs de la mutation *lmna*^{+H222P} (Figure 39).

RESULTATS

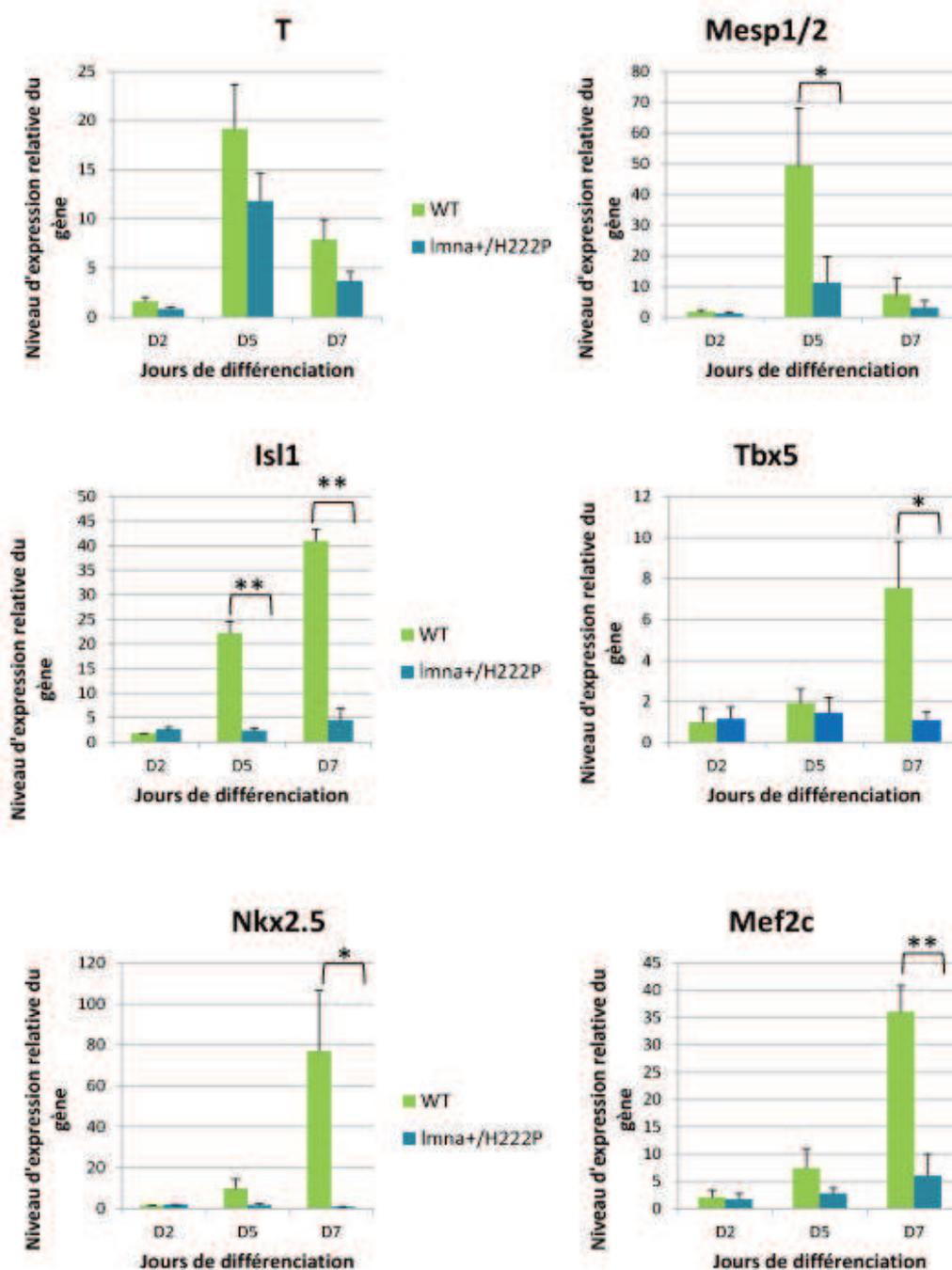


FIGURE 39 : EXPRESSION DES GENES CARDIAQUES DANS LES CE SAUVAGES ET MUTES AU COURS DE LA DIFFERENCIATION.

L'expression de 6 gènes cardiaques est mesurée au cours de la différenciation dans les clones sauvages et mutés aux jours 2, 5 et 7. Les valeurs de l'expression relative des gènes, par qPCR, ont été réalisées sur 3 expériences indépendantes (+/-SEM) et normalisées par rapport à des cellules indifférenciées (Test T de Student * : $p < 0.05$ ** : $p < 0.01$).

RESULTATS

L'expression des protéines codées par les gènes du mésoderme étudiés en RT-qPCR a été mesurée sur des CEs par des expériences d'immunofluorescence. Après marquage, j'ai observé que les corps embryoïdes provenant des clones porteurs de la mutation $lmna^{+/H222P}$ expriment les protéines cardiaques *Isl1*, *Mef2c* et *Nkx2.5* en moins grande quantité que le clone sauvage, ce qui est en adéquation avec les résultats obtenus par RT-qPCR où ces transcrits étaient aussi exprimés en moins grande quantité dans les cellules différenciées issues du clone porteur de la mutation $lmna^{+/H222P}$ (Figure 43 A, B et C)

Pour poursuivre l'étude de ce phénotype et voir si le défaut d'expression génique et protéique des facteurs de transcription se traduisait par un défaut de cardiogenèse *per se* et non par un défaut de couplage excitation-contraction qui expliquerait l'absence de contractilité des CE mutés, j'ai regardé l'expression et l'assemblage dans les sarcomères de l'alpha-actinine (Figure 40). L'alpha-actinine est en effet une protéine qui permet de lier entre eux deux filaments d'actine au sein du sarcomère, jouant un rôle fondamental dans l'organisation de ce dernier dans la cellule cardiaque (Li et al., 1997). Cette protéine marque les bandes Z du sarcomère (Figure 40). Cette bonne organisation est absolument nécessaire à la contractilité de la cellule cardiaque.

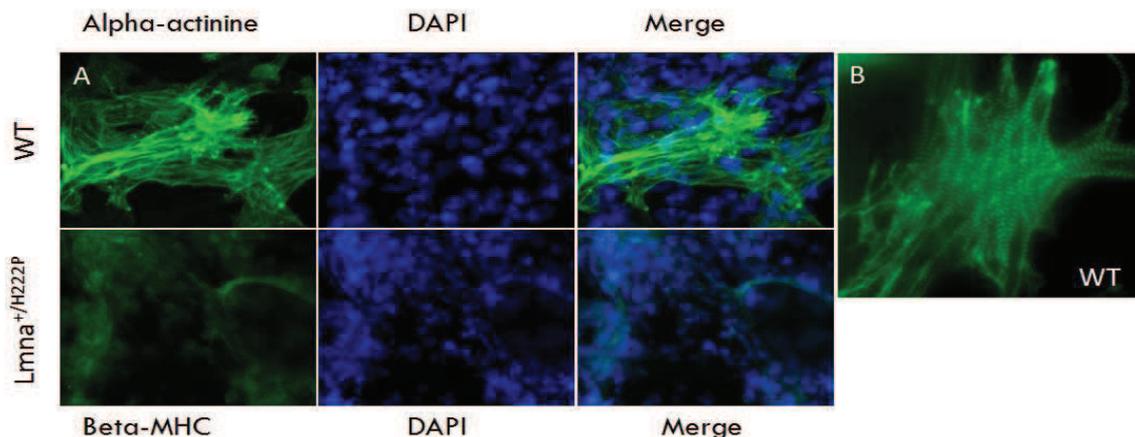


FIGURE 40 : IMMUNOFLUORESCENCE SUR LES CLONES SAUVAGES ET MUTÉS $LMNA^{+/H222P}$ CONTRE L'ALPHA ACTININE.

(A) Expression de l' α -actinine dans les clones sauvages et porteurs de la mutation $lmna^{+/H222P}$ au grossissement 40x dans des CEs à 12 jours de différenciation. (B) Expression de l' α -actinine dans les Ces sauvages à 12 jours de différenciation au grossissement 63x.

RESULTATS

Une mauvaise organisation de cette protéine contractile est observée au sein des cellules cardiaques différenciées des clones pluripotents porteurs de la mutation $Imna^{+/H222P}$ (Figure 40A et B). En effet, dans ces clones, le marquage révèle un faible taux d'expression de l' α -actinine, qui n'est plus organisée au sein du sarcomère (Figure 40A), contrairement aux clones sauvages (Figure 40B) chez qui on peut observer une α -actinine bien exprimée et organisée. Ces résultats permettent d'attester de la différenciation déficiente du clone porteur de la mutation $Imna^{+/H222P}$, présentant un appareil contractile désorganisé.

Nous avons pu démontrer dans cette première partie que le clone porteur de la mutation $Imna^{+/H222P}$ présentait un défaut majeur de différenciation cardiaque, ce processus semblant être bloqué au stade mésendoderme/mésoderme précoce. Afin de pallier à ce défaut, nous avons voulu voir si le blocage au niveau du mésendoderme pouvait être corrigé en ajoutant de la lamine sauvage, permettant de titrer la lamine mutée et de compenser les divers défauts cellulaires. Pour cela, nous avons choisi de cibler uniquement les cellules cardiaques en clonant le gène de la lamine sauvage sous le promoteur de l' α -actine. Cette dernière protéine s'exprimant vers le jour 5 de la différenciation cardiaque, au moment où la lamine de type A commence à s'exprimer, cela nous permet de mimer le développement en introduisant une lamine au cours de la différenciation. En effet, l'introduction de la lamine associée au fait de cloner la prélamine A et non la lamine A/C mature, nous permet de laisser la maturation naturelle de la protéine se faire, avec toutes les modifications post traductionnelles qu'elle doit subir avant d'être adressée à la MNI (Voir chapitre 1.1.3).

1.4 Correction du phénotype $Imna^{+/H222P}$ *in vitro* par l'ajout de prélamine A sauvage

Dans cette étude, la prélamine A sauvage a été introduite dans les clones porteurs de la mutation $Imna^{+/H222P}$ sous le promoteur de l' α -actine cardiaque. Cette construction plasmidique permet à la lamine A/C sauvage de s'exprimer uniquement dans les cellules cardiaques (Figure 41A). Le clone porteur de la mutation $Imna^{+/H222P}$ corrigée par la lamine

RESULTATS

sauvage se nomme H222PR, pour « Rescue ». De la même manière que dans les expériences précédentes, les corps embryoïdes (CE) ont été générés par la méthode en gouttes pendantes. La première observation, remarquée sur les CEs issus de ces cellules, est une différence de morphologie entre les clones mutés et sauvages et le clone ayant incorporé la lamine sauvage au jour 5 de différenciation (Figure 41B). C'est à partir du jour 6, juste après la mise en adhésion des CEs sur gélatine, que la proportion de CEs battants a ensuite été calculée jusqu'au jour 13 de la différenciation, ceci 3 échantillons indépendants (+/- SEM). Cette mesure a permis de mettre en évidence une amélioration de l'activité contractile des clones $lmna^{+/H222P}$ exprimant la prélamine A sauvage sous le promoteur de l' α -actine cardiaque (Figure 41C).

En effet, les premiers battements des clones $lmna^{+/H222PR}$ sont observés dès le 7^{ème} jour de différenciation. Même si le taux de CEs battants reste faible à ce stade, la différenciation commence à se mettre en place plus précocement que dans les clones $lmna^{+/H222P}$. Par la suite, le nombre de corps embryoïdes battants augmente progressivement pour suivre le même type de cinétique que les CEs sauvages.

Par la suite, des expériences de qPCR ont été réalisées sur les mêmes bases que précédemment sur des clones $lmna^{+/H222P}$, $lmna^{+/+}$ et $lmna^{+/H222PR}$ (clone portant la mutation $lmna^{+/H222P}$ ayant incorporé la prélamine A sauvage) afin de pouvoir observer l'effet de l'ajout de lamine A sauvage dans les cardiomyocytes de cellules porteuses de la mutation $lmna^{+/H222P}$ sur l'expression génique de facteurs spécifiques du développement mésodermique mentionnés auparavant (Figure 42).

RESULTATS

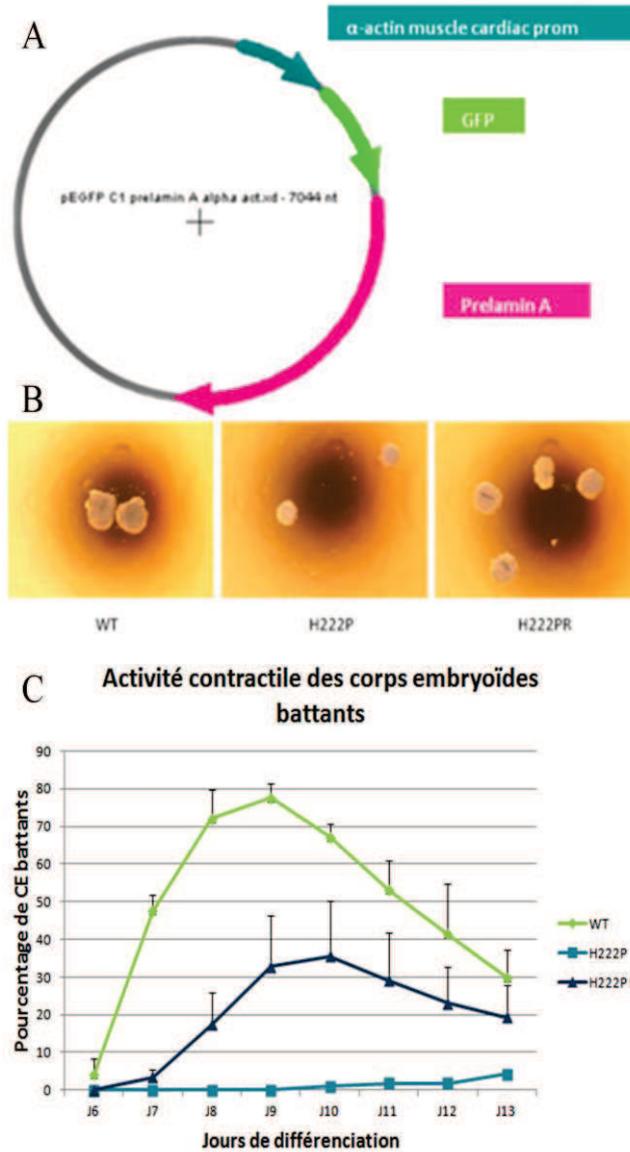


FIGURE 41: INTRODUCTION DU GENE DE LA LAMINE SAUVAGE SOUS LE PROMOTEUR DE L'ALPHA ACTINE CARDIAQUE DANS LES CLONES PORTEURS DE LA MUTATION LMNA +/H222P, EFFETS SUR LA MORPHOLOGIE ET LA CONTRACTILITE DES CLONES.

(A) Schéma du plasmide inséré dans les clones porteurs de la mutation $lmna^{+/H222P}$ (B) Morphologie variable des clones en fonction de l'expression de la lamine sauvage ou mutée (C) Cinétique des battements des CE en fonction de l'expression de la lamine sauvage ou mutée à partir du jour 6 jusqu'au jour 13 de différenciation. Les valeurs des battements (+/-SEM) ont été déterminées lors de 3 expériences indépendantes.

RESULTATS

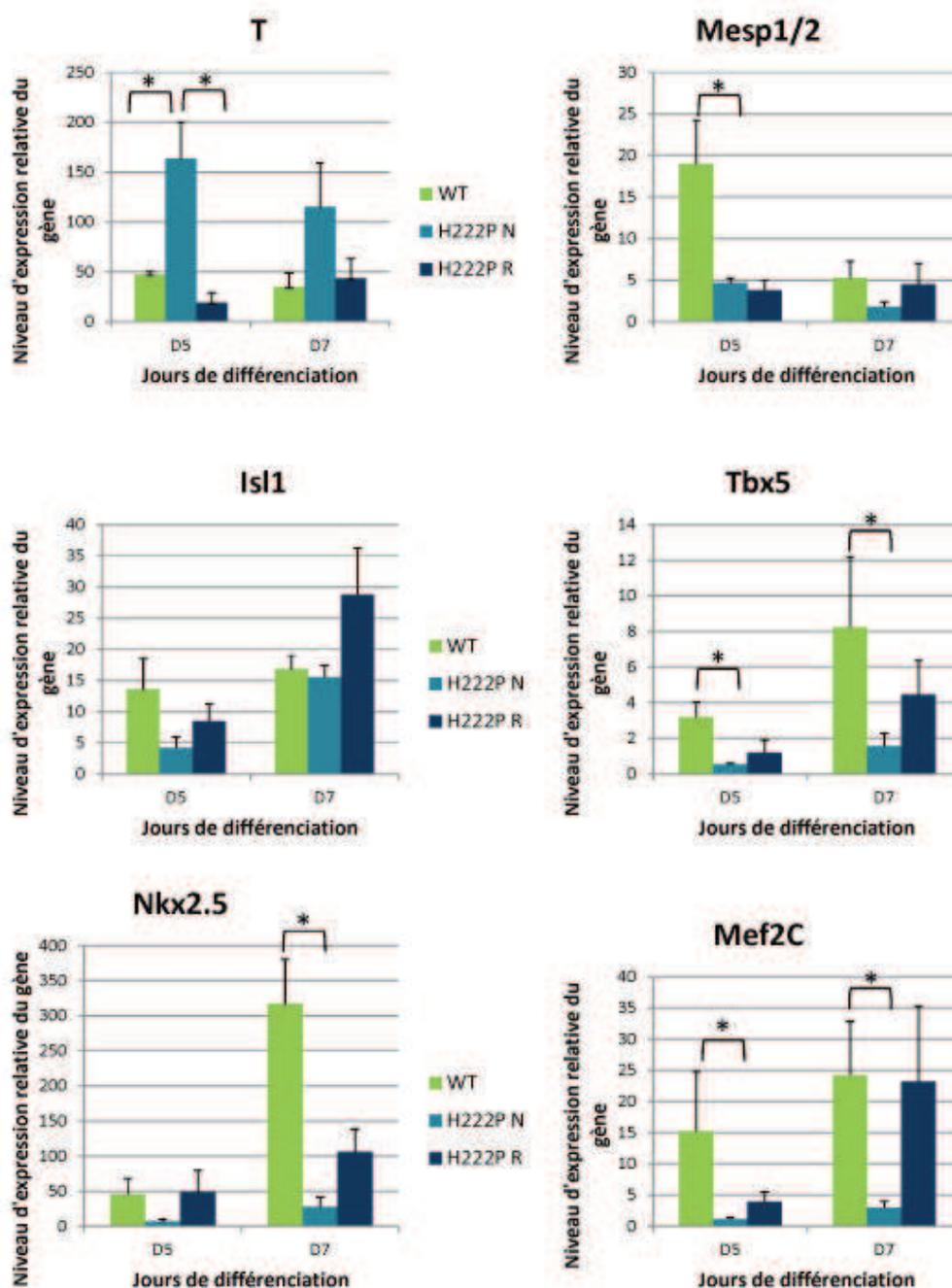


FIGURE 42 : EXPRESSION DES GENES CARDIAQUES DANS LES CES AU COURS DE LA DIFFERENCIATION

L'expression de 6 gènes cardiaques est mesurée au cours de la différenciation dans les clones sauvages et mutés aux jours 5 et 7. Les valeurs de l'expression relative des gènes, par qPCR, ont été réalisées sur 3 expériences indépendantes (+/-SEM) et normalisée par rapport à des cellules indifférenciées (* : $p < 0.05$).

RESULTATS

Sur cette deuxième série d'expériences, le clone mutant $lmna^{+/H222P}$ surexprime le facteur de transcription du mésoderme très précoce Brachyury (T) au jour 5 de différenciation par rapport au clone $lmna^{+/H222PR}$ et au clone sauvage. Comme dans la série d'expériences précédentes, la différence d'expression génique de *MesP1* entre le clone $lmna^{+/H222P}$ et sauvage au jour 5 de différenciation est significative, et démontrent un taux d'expression de ce gène plus faible dans les cellules $lmna^{+/H222P}$. Pour le facteur de transcription *Mef2c*, on remarque une différence significative d'expression entre le clone sauvage et muté non-corrigé. L'expression de *Nkx2.5* et *Tbx5* pour le clone sauvage est aussi significative par rapport au clone $lmna^{+/H222P}$ qui montre une expression pour ces gènes plus faible au jour 7 de la différenciation. Au même stade, les taux d'expression du gène *Mef2c* et *Tbx5* pour le clone $lmna^{+/H222PR}$ différencié semblent être équivalent à ceux du clone sauvage, les résultats ne montrant pas de différences statistiques significatives (Figure 42). Ces résultats confirment que les clones porteurs de la mutation $lmna^{+/H222P}$ semblent être bloqués au stade mésendoderme, juste avant l'expression du gène *MesP1*. Même si les résultats ne sont pas statistiquement significatifs entre le clone porteur de la mutation $lmna^{+/H222P}$ et le clone corrigé $lmna^{+/H222PR}$, on observe une nette tendance du clone corrigé $lmna^{+/H222PR}$ à présenter une expression génique augmentée pour les facteurs *MesP1/2*, *Isl1*, *Tbx5*, *Nkx2.5* et *Mef2c*. Ceci démontre une mise en place de la cardiogenèse au sein de ces clones, même si celle-ci ne s'avère pas aussi efficace que celle mise en place dans les clones sauvages $lmna^{+/+}$.

Pour vérifier l'expression obtenue au niveau des ARNm, des immunofluorescences ont été réalisées afin de regarder l'expression des protéines *Mef2c*, *Isl1* et *Nkx2.5* ainsi que l' α -actinine au jour 12 de différenciation dans des colonies différenciées sur des fibroblastes cardiaques (Figure 43). On observe que les clones $lmna^{+/H222PR}$ expriment les protéines cardiaques *Mef2c*, *Isl1* et *Nkx2.5* et l' α -actinine à des niveaux similaires que ceux observés chez le clone $lmna^{+/+}$ sauvage. De plus, le clone ayant incorporé la prélamine A sauvage arbore une organisation structurale de l' α -actinine comparable à celle du clone sauvage (Figure 43D), nous permettant de confirmer que la cardiogenèse s'est correctement mis en place dans ces clones.

RESULTATS

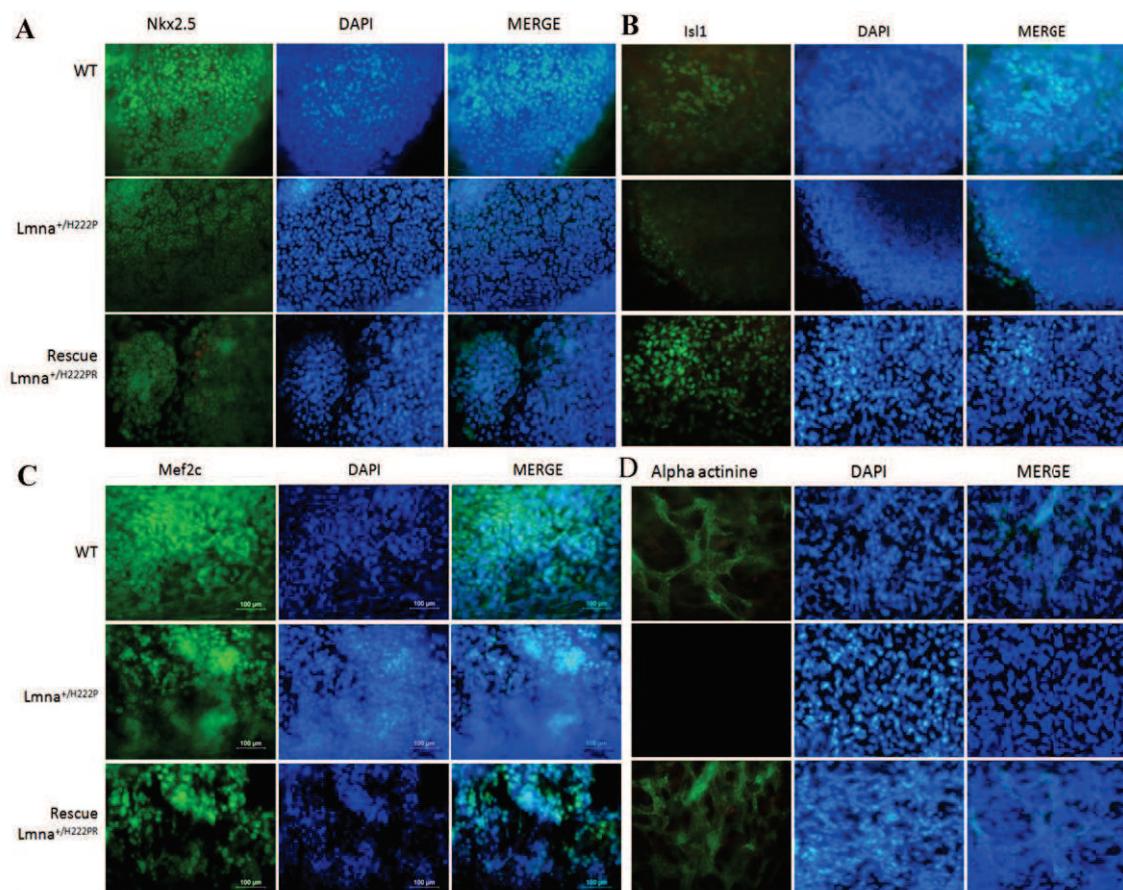


FIGURE 43 : IMMUNOFLUORESCENCES CONTRE LES PROTEINES NKX2.5 (A), ISL1 (B), MEF2C (C) ET ALPHA ACTININE (D).

Les images ont été prises au microscope à épifluorescence 40x, l'immunofluorescence a été réalisée contre les protéines Mef2c, Isl1, Nkx2.5 au jour 7 de différenciation et 20x pour l' α -actinine au jour 12 de différenciation pour les 3 clones étudiés *Lmna*^{+H222P}, *Lmna*^{+H222PR} et le clone sauvage *Lmna*^{+/+}.

Dans cette deuxième partie, nous avons pu montrer que l'ajout de lamine sauvage dans des conditions respectant le développement et ce, de manière ciblée, permettait d'améliorer la cardiogenèse. En effet, on retrouve une expression des gènes de la cardiogenèse augmentée dans les clones corrigés *Lmna*^{+H222PR}, de plus on observe un marquage positif à une localisation normale de l' α -actinine pour ce clone, permettant de mettre en évidence la bonne organisation de la structure contractile, comme pour le clone sauvage *Lmna*^{+/+}.

RESULTATS

Par la suite, nous avons voulu savoir si le défaut d'expression des gènes retrouvés dans le clone muté $lmna^{+/H222P}$ était spécifique du mésoderme, ou si la différenciation globale de ces clones était elle aussi affectée, les CE présentant une structure en 3 feuillets.

1.5 Expression des gènes des 3 feuillets embryonnaires dans les CSEm sauvages, corrigées et porteuses de la mutation $lmna^{+/H222P}$ et corrigées.

Le clone CSEm $lmna^{+/H222P}$ montre une expression des gènes du mésoderme altérée. Nous nous sommes alors demandé si ce défaut d'expression était spécifique du mésoderme ou les autres feuillets étaient eux aussi affectés, afin de valider la spécificité cardiaque du phénotype mutant. En effet, les CSEm permettant de récapituler la différenciation précoce, au cours de laquelle la structure en 3 feuillets de l'embryon peut être observée dans ces CE.

Nous avons regardé tout d'abord l'expression des gènes GSC (Goosecoïd) et Mix11 des gènes spécifiques du mésendoderme, afin de voir si nous pouvions retrouver les résultats obtenus avec le facteur brachyury dans les deux premières séries d'expériences. Une surexpression de ces gènes du mésendoderme est observée, confirmant que les CE obtenus à partir de cellules mutées $lmna^{+/H222P}$ sont bloqués à ce stade. Pour valider le phénotype lié au mésoderme dans ces cellules, l'expression des marqueurs d'autres feuillets a été observée. Pour l'ectoderme, le marqueur Nestine a été choisi (Roche et al., 2005). Les facteurs Nestine et Sox17, spécifique de l'endoderme et de l'ectoderme respectivement, ne montrent pas de différences significatives dans les cellules mutantes (Figure 44).

L'ensemble de ces données confirment qu'il pourrait y avoir un phénomène de blocage des clones porteurs de la mutation $lmna^{+/H222P}$ au niveau du stade mésendoderme, les rendant incapable de former correctement un mésoderme.

RESULTATS

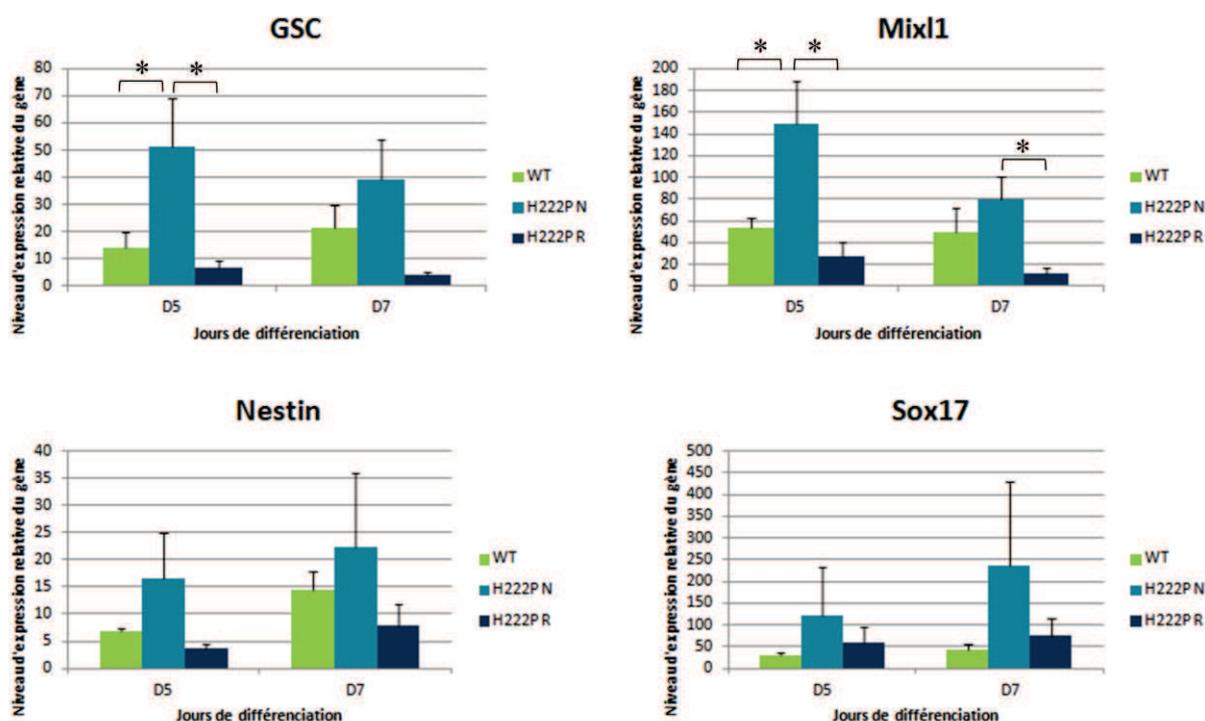


FIGURE 44: EXPRESSION DES GENES DU MESENDODERME, ENDODERME ET ECTODERME DANS LES CLONES SAUVAGES, PORTEURS DE LA MUTATION H222P ET CORRIGES.

L'expression des 4 gènes est mesurée dans les clones sauvages, mutés et corrigés aux jours 5 et 7 de la différenciation. Les valeurs de l'expression relative des gènes, réalisée par qPCR, a été réalisée sur 3 expériences indépendantes (+/-SEM) et normalisé par rapport à des cellules indifférenciées (Test t de Student *: $p < 0.05$).

Ce travail sur le modèle des cellules souches embryonnaires murines nous a donc permis de mettre en évidence différents phénotypes. Tout d'abord, le clone porteur de la mutation $lmna^{+/H222P}$, présentait un défaut au niveau du nombre de corps embryoides battants. Sur ces observations, nous avons mis en évidence qu'il existait un défaut de la mise en place des gènes de la cardiogenèse après le stade mésendoderme. Les clones porteurs de la mutation $lmna^{+/H222P}$ ayant tendance à surexprimer ces marqueurs, il est tentant de penser qu'ils restent bloqués à ce stade. En effet, ces gènes ne sont pas forcément surexprimés au sein de chaque cellule, mais cette surexpression pourrait être due à un plus grand nombre de cellules à ce stade de différenciation. De plus, les CE provenant du clones $lmna^{+/H222P}$ sont plus petits, ce qui pourrait valider qu'ils restent bloqués à un stade de différenciation déterminé, ces CE étant capables de alors former de l'endoderme et de l'ectoderme, mais pas du mésoderme.

RESULTATS

Par la suite, mes travaux de correction de la mutation par ajout de lamine sauvage ont permis de mettre en évidence que le gène muté de la lamine de type A était responsable du phénotype observé dans les CEs *lmna*^{+H222P}. Enfin, nous avons pu démontrer que la formation des autres feuilletts embryonnaires n'était pas affectée dans les cellules porteuses de la mutation *lmna*^{+H222P}, permettant de mettre en évidence que seule la formation du mésoderme était altérée. Ce blocage au niveau du mésoderme permet d'expliquer le phénotype observé dans les CEs, mais correspond aussi avec le phénotype cardiaque de l'adulte.

Afin de s'assurer que le phénotype retrouvé dans les cellules murines était aussi retrouvé dans les cellules humaines, nous avons utilisés des fibroblastes de patients qui ont ensuite été reprogrammés pour générer différents clones d'iPS.

Dans la littérature, il a été rapporté que la lamine de type A murine (Constantinescu et al., 2006; Zuo et al., 2012) arrivait plus tardivement au cours du développement que la lamine humaine, qui, elle, était exprimée dès les premiers stades de différenciation neuronaux et cardiomyocytaires (Constantinescu et al., 2006). De ce fait, il est possible que le phénotype observé ne soit pas similaire entre les deux espèces. Les iPS possèdent aussi un autre avantage : celui de provenir du patient, évitant les biais dus à l'insertion de mutations par manipulations géniques.

L'utilisation de cellules iPS porteuses de la mutation causale de maladie permet de mieux comprendre le développement des mécanismes pathologiques. De plus, elles permettent de tester des médicaments afin de trouver des thérapies pour les patients atteints de laminopathies (Yoshida and Yamanaka, 2010).

RESULTATS

2 Etude du phénotype sur les cellules à pluripotence induite (iPS)

2.1 Pluripotence des cellules iPS :

Comme pour les cellules souches embryonnaires murines, il est nécessaire de vérifier la pluripotence des iPS afin de s'assurer qu'elles pourront par la suite se différencier correctement dans les différents lignages.

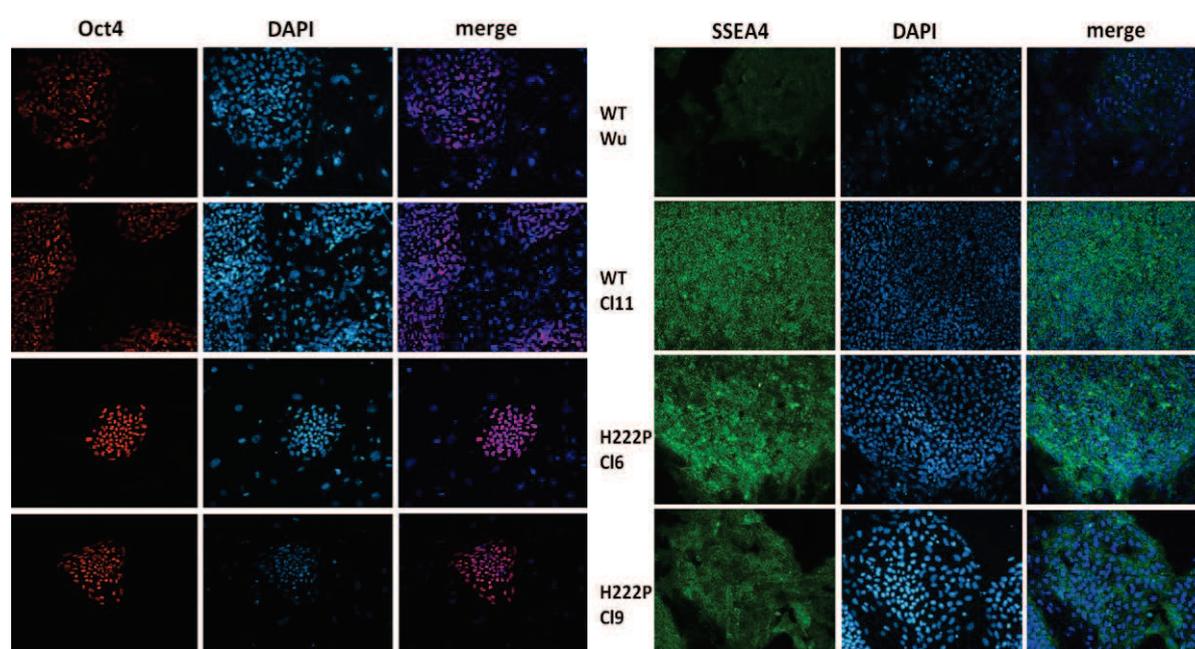


FIGURE 45: IMMUNOFLUORESCENCE SUR LES DIFFERENTS CLONES IPS CONTRE LES GENES SSEA4 ET OCT4.

La pluripotence des iPS humaines est évaluée à l'aide des marqueurs de pluripotence SSEA4 et Oct4 dans les clones sauvages et porteurs de la mutation $Imna^{+/H222P}$ deux jours après passage. Les images (grossissement 20x) ont ensuite été analysées au microscope à épifluorescence et des images individuelles ont été regroupées avec le logiciel Image J.

Afin de valider la pluripotence dans les cellules iPS, des immunofluorescences des marqueurs SSEA4 (un marqueur membranaire de la pluripotence) (Chan et al., 2009) et Oct4 sont réalisées sur les 4 clones utilisés (Figure 45). Tous les clones d'iPS qu'ils soient sauvages ou porteurs de la mutation $Imna^{+/H222P}$ expriment correctement ces marqueurs, attestant de leur pluripotence. Cela nous permet de valider ces clones et de nous assurer que les potentiels

RESULTATS

défauts de différenciation ne seront pas dus à un mauvais état de pluripotence. Au cours de la formation des iPS, un des tests réalisés en routine a été de vérifier la perte de l'expression de la lamine de type A dans les clones (Krueger et al., 2012). Pour cela, nous avons donc regardée l'expression de la lamine de type A/C dans nos différents clones d'iPS (Figure 46).

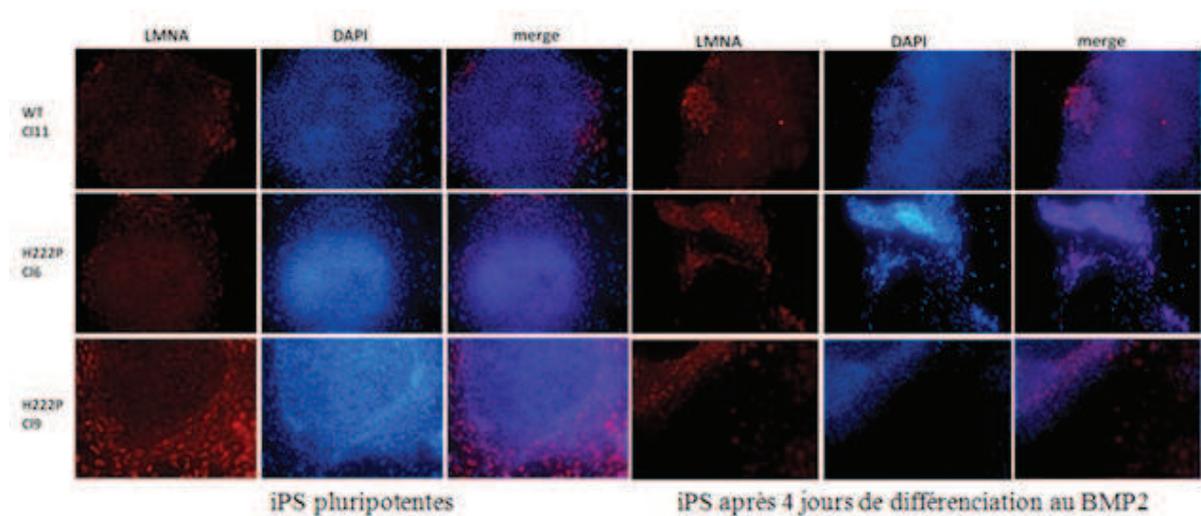


FIGURE 46: EXPRESSION DES LAMINES DE TYPE A DANS LES IPS PLURIPOTENTES ET APRES 4 JOURS DE DIFFERENCIATION AU BMP2

A gauche : La pluripotence des iPS humaines est évaluée à l'aide de l'anti corps anti lamine A/C (novacastra) dans un clone sauvage et deux clones mutants 3 jours après passage. Le marquage observé autour des colonies est dû aux MEFs situées en-dessous des iPS. Les images (grossissement 20x) ont ensuite été analysées au microscope à épifluorescence et des images individuelles ont été regroupées avec le logiciel Image J.

A droite : Marquage des iPS humaines à l'aide de l'anti corps anti lamine A/C (novacastra) dans un clone sauvage et deux clones après 4 jours de traitement au BMP2, permettant leur différenciation. Les images (grossissement 20x) ont ensuite été analysées au microscope à épifluorescence et des images individuelles ont été regroupées avec le logiciel Image J.

La lamine A/C n'est pas exprimée dans les 3 types de clones au stade pluripotent. Après 4 jours de différenciation au BMP2, on observe un marquage lamine dans les trois types de clones de façon éparse dans la colonie. Toutes les cellules ne sont pas positives pour la lamine de type A/C, mais ce marquage atteste d'un début de différenciation.

Par la suite, un test a été réalisé sur les clones JL2 WT et H222P n°6 afin de savoir si ces cellules étaient capables de former des corps embryoides (CE) *in vitro*. Cette manipulation

RESULTATS

permet également de confirmer l'état de pluripotence d'un clone des cellules souches pluripotentes (Figure 47). On observe que même si les deux types de clones sont capables de former des CE *in vitro*, les CE formées par le clone porteur de la mutation $Imna^{+H222P}$ forment des CE de taille plus petite et sont plus irréguliers que ceux formés par le clone sauvage.

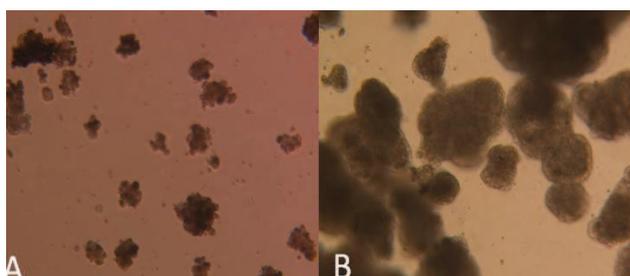


FIGURE 47: FORMATION DE CE A PARTIR D'IPS PLURIPOTENTES

- (A) CE formés à partir d'iPS du clone 6 porteur de la mutation H222P (grossissement 100x)
(B) CE à partir d'iPS du clone sauvage JL2 (grossissement 100x)

Ces expériences nous permettent de valider les clones utilisés pour la suite du projet, ceux-ci étant capables de différenciation et présentant un caractère pluripotent. Nous avons ensuite voulu voir si le phénotype observé au niveau des CSEm était retrouvé dans les iPS porteuses de la mutation $Imna^{+H222P}$. Pour cela, nous avons utilisé une technique mise au point au laboratoire, permettant d'induire les iPS au BMP2 afin de les engager dans une voie de différenciation mésendodermique, se dirigeant par la suite vers le mésoderme cardiaque (Stefanovic et al., 2009). En effet, la molécule de BMP2 est produite par l'endoderme et permet la différenciation cardiaque *in vivo* (Alsan and Schultheiss, 2002).

2.2 Différenciation des cellules iPS :

Lors de la différenciation des clones iPS par le BMP2, les cellules perdent leur pluripotence et s'étalent d'avantage, signe d'une transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) attendue lors de la formation du mésendoderme (Acloque et al., 2009). Les cellules perdent alors leur structure en colonies compactes et plurinucléées et présentent un noyau très compact et noir. Elles perdent aussi l'expression des facteurs de pluripotence comme Nanog

RESULTATS

(Figure 48) mais aussi Sox2, et SSEA3/4. On peut noter cependant que le facteur de transcription Oct4 augmente transitoirement au cours de la formation du mésendoderme (Stefanovic and Puceat, 2007)) (Figure 48)

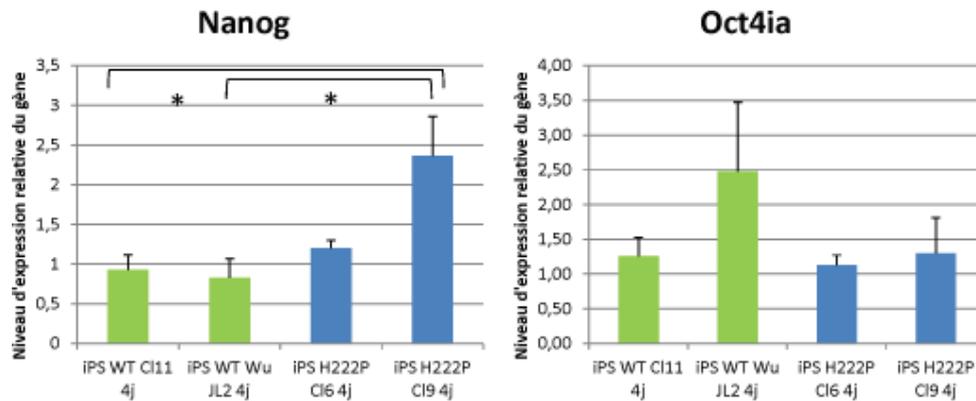


FIGURE 48 : EXPRESSION DES FACTEURS DE PLURIPOTENCE NANOG ET OCT4 AU COURS DE LA DIFFERENCIATION

L'expression des gènes Nanog et Oct4iA est mesurée au cours de la différenciation dans les clones sauvages et porteurs de la mutation $Imna^{+/H222P}$ à 4 jours de différenciation induite par le BMP2. Les valeurs de l'expression relative des gènes, réalisée par qPCR, a été réalisée sur 3 expériences indépendants (+/-SEM) et normalisée par rapport à des cellules indifférenciées (* : $p < 0.05$)

Une persistance du facteur de transcription Nanog dans le clone 9 porteur de la mutation $Imna^{+/H222P}$ est observée après 4 jours de différenciation par le BMP2 de manière significative comparativement aux deux clones sauvage. Le clone 9 porteur de la mutation $Imna^{+/H222P}$ présente donc un défaut de différenciation très précoce. On peut aussi observer une persistance du facteur de transcription Oct4iA (Le facteur de transcription Oct4 possède deux isoformes, iA et iB, la première permettant de maintenir la pluripotence et la seconde n'ayant pas de fonction connue (Lee et al., 2006)), observée normalement au cours de la différenciation cardiaque.

Par la suite, l'expression des gènes cardiaques a été mesurée dans les clones sauvages et porteurs de la mutation $Imna^{+/H222P}$.

RESULTATS

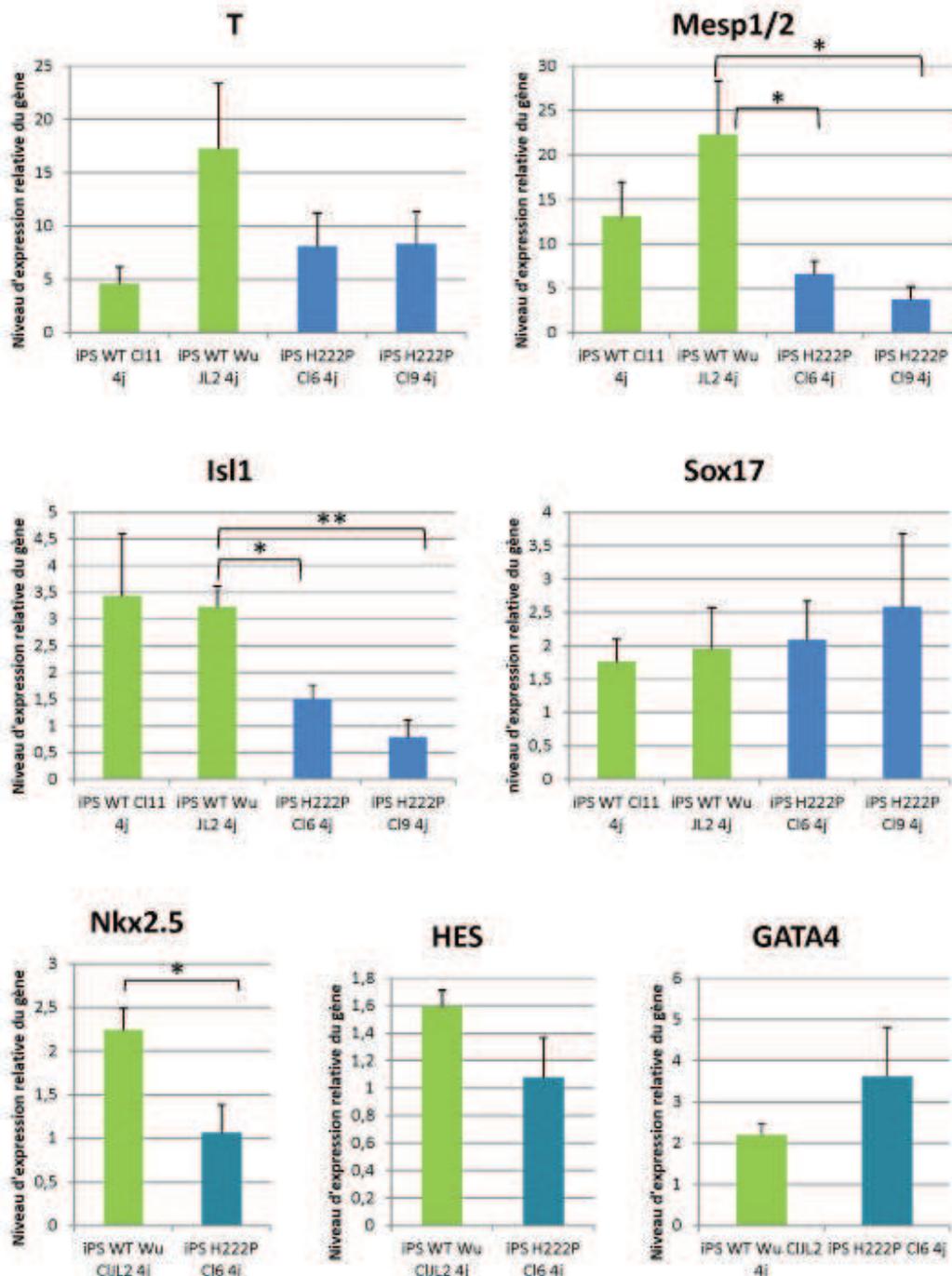


FIGURE 49: EXPRESSION GENIQUE DES DIFFERENTS CLONES IPS APRES 4 JOURS DE DIFFERENCIATION AU BMP2

L'expression des gènes T, Mesp1/2, Isl1 Sox17 et Nkx2.5 est mesurée au cours de la différenciation dans les clones sauvages et porteurs de la mutation *lmna*^{+H222P} à 4 jours de différenciation induite par le BMP2. Les valeurs de l'expression relative des gènes, réalisée par qPCR, a été réalisée sur 3 expériences indépendants (+/- SEM) et normalisée par rapport à des cellules indifférenciées (* : p<0.05 ; ** : p<0.01).

RESULTATS

Le facteur de transcription Brachyury (T), un marqueur très précoce du mésoderme, semble être exprimée de manière plus élevée dans le clone JL2 sauvage à 4 jours de différenciation (Figure 49) comparativement aux clones porteurs de la mutation *lmna*^{+H222P}. Lorsque l'on observe l'expression protéique de ce facteur de transcription au jour 7 de différenciation, on retrouve cette même tendance avec une plus grande expression de Brachyury par le clone JL2 sauvage (Figure 50).

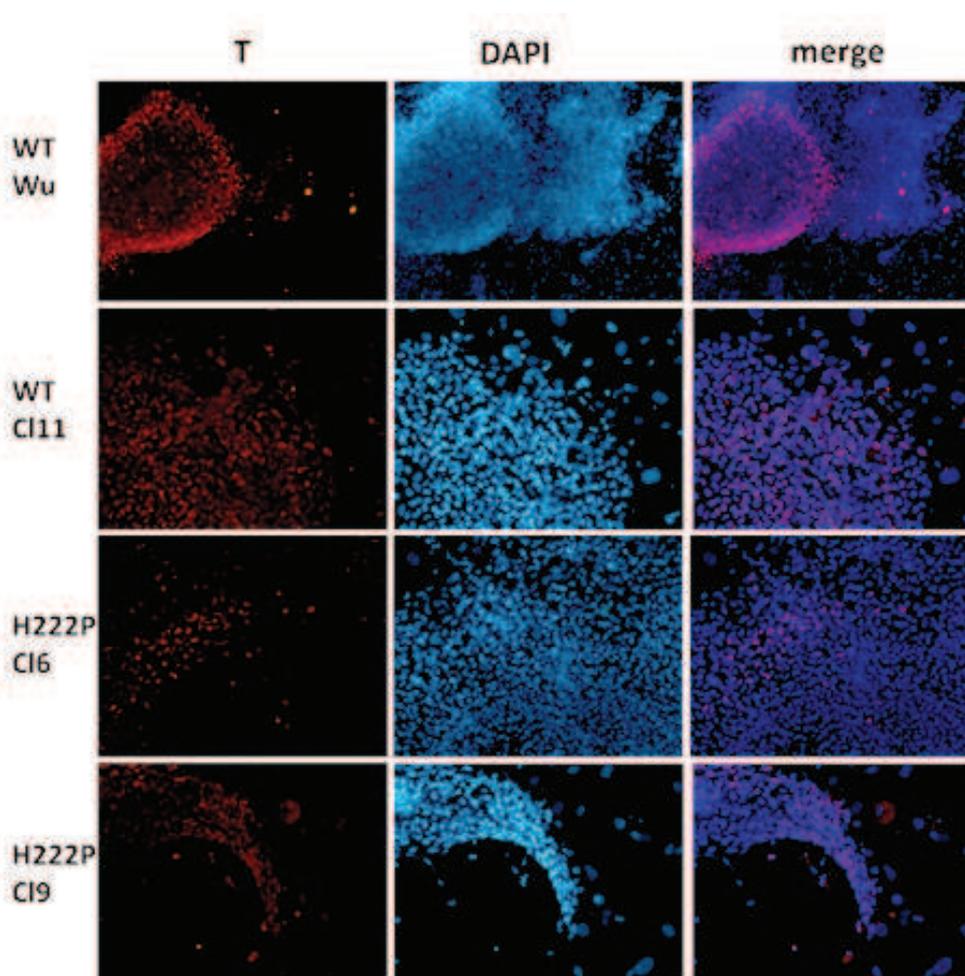


FIGURE 50 : EXPRESSION DU FACTEUR DE TRANSCRIPTION BRACHYURY (T) DANS LES CLONES IPS APRES 7 JOURS DE TRAITEMENT AU BMP2.

Les images ont été prises au microscope à épifluorescence 20x, l'immunofluorescence a été réalisée contre la protéine Brachyury (T) au jour 7 de différenciation pour les clones sauvages et mutés *lmna*^{+H222P}. Les images ont ensuite été analysées au microscope à épifluorescence et des images individuelles ont été regroupées avec le logiciel Image J.

RESULTATS

Le marqueur endodermique Sox17, quant à lui, semble être constant dans les différents types de clones, bien qu'au niveau protéique il semblerait être plus exprimé par les clones mutés que les clones sauvages (Figure 51). De plus, GATA4, un marqueur endodermique très précoce, est exprimé à des niveaux comparables dans les clones sauvages et mutés. On peut alors supposer que les clones porteurs de la mutation $lmna^{+H222P}$ présentent une différenciation de l'endoderme normale. Le marqueur Hes, ayant un rôle avec les facteurs Hey dans la voie Notch, est exprimé à des niveaux similaires entre les clones $lmna^{+H222P}$ et $lmna^{+/+}$.

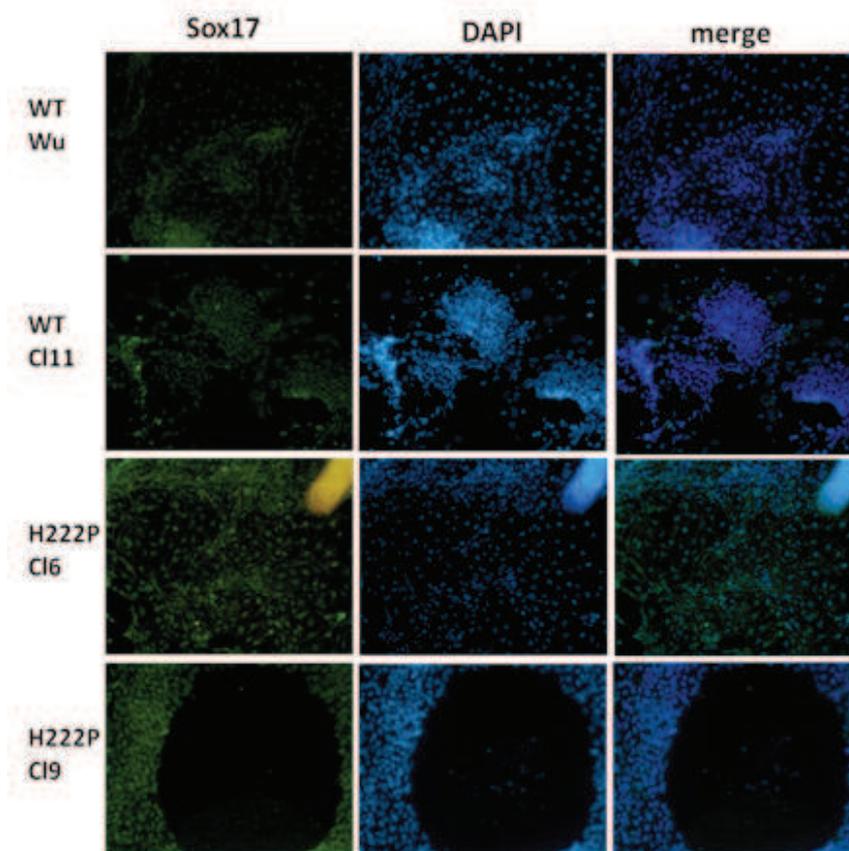


FIGURE 51: EXPRESSION DU FACTEUR DE TRANSCRIPTION SOX17 DANS LES CLONES IPS APRES 7 JOURS DE TRAITEMENT AU BMP2.

Les images ont été prises au microscope à épifluorescence 20x, l'immunofluorescence a été réalisée contre la protéine Isl11 au jour 7 de différenciation pour les clones sauvages et mutés $lmna^{+H222P}$. Les images ont ensuite été analysées au microscope à épifluorescence et des images individuelles ont été regroupées avec le logiciel Image J.

RESULTATS

L'expression de l'ARNm codant pour MesP1, correspondant au facteur de transcription le plus précoce au niveau du mésoderme cardiogénique a été évaluée dans les clones sauvages et les clones porteurs de la mutation $lmna^{+/H222P}$. Une différence significative est observée entre les clones porteurs de la mutation $lmna^{+/H222P}$ et le clone sauvage JL2 (Figure 49). De plus, les clones porteurs de la mutation $lmna^{+/H222P}$ semblent exprimer le facteur de transcription Isl1 à un taux plus faible que dans le clone JL2 sauvage et ce de manière significative (Figure 49). Au niveau protéique, on retrouve l'expression d'Isl1 dans les deux types de clones, même si il semble y avoir moins de colonies positives pour ce clone muté (Figure 52).

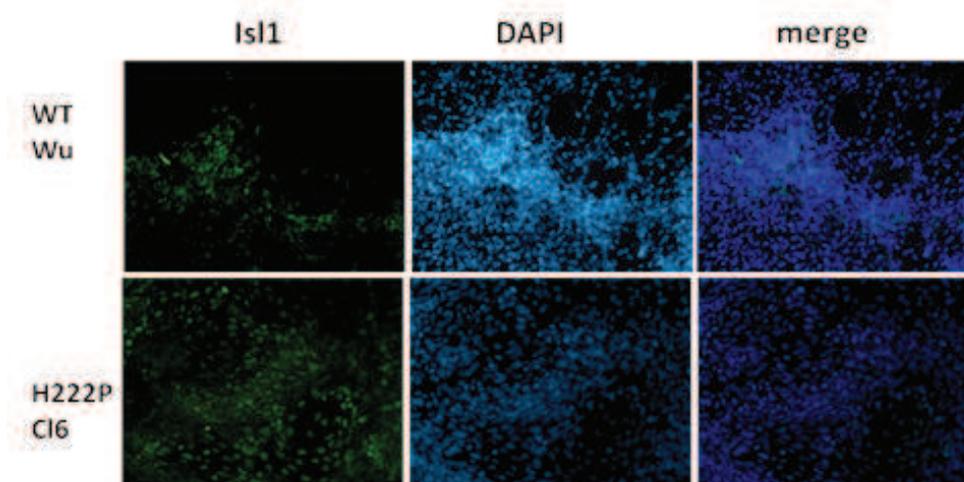


FIGURE 52: EXPRESSION DU FACTEUR DE TRANSCRIPTION ISL1 DANS LES CLONES IPS APRES 7 JOURS DE TRAITEMENT AU BMP2.

Les images ont été prises au microscope à épifluorescence 20x, l'immunofluorescence a été réalisée contre la protéine Isl11 au jour 7 de différenciation pour les clones sauvages et mutés $lmna^{+/H222P}$. Les images ont ensuite été analysées au microscope à épifluorescence et des images individuelles ont été regroupées avec le logiciel Image J.

Enfin, l'expression du facteur de transcription Nkx2.5 a été évaluée dans les clones sauvages et porteurs de la mutation $lmna^{+/H222P}$. Une différence significative est observée entre le clone sauvage JL2 et le clone 6 porteur de la mutation $lmna^{+/H222P}$ attestant d'une mauvaise mise en place de la différenciation cardiaque, altérée dans les clones mutés.

RESULTATS

Le modèle iPS nous a donc permis de montrer que le phénotype cardiaque retrouvé chez les modèles murin était aussi retrouvé chez dans les cellules souches pluripotentes humaines différenciées. En effet, on observe tout d'abord une mauvaise différenciation d'un des clones porteurs de la mutation $lmna^{+/H222P}$ avec la persistance de l'expression du facteur de transcription Nanog. Ensuite, contrairement au modèle murin, l'expression du facteur de transcription Brachyury semble être plus faible au niveau protéique et génique dans les clones porteurs de la mutation $lmna^{+/H222P}$, ce qui est peut être du au fait que la lamine s'exprime plus précocement au cours de la différenciation dans les cellules humaines comparativement aux cellules murines au cours de la différenciation, entraînant alors un défaut de différenciation plus précoce. Le mésoderme cardiaque présente, comme pour le modèle murin, un défaut de différenciation majeur, attesté par des niveaux de marqueurs MesP1, Isl1 et Nkx2.5 altérées. Dans les clones iPS, les autres feuilletts ne semblent pas être affectés, car le facteur de transcription Sox17 est exprimé à des niveaux comparables dans les cellules sauvages et porteuses de la mutation $lmna^{+/H222P}$. Néanmoins, pour ce qui est des cellules humaines des expériences d'immunofluorescence et de PCRs à des stades plus tardifs seront nécessaires afin de confirmer le phénotype retrouvé chez la souris.

Une PCR a été réalisée à des stades plus tardifs avec l'ajout de Wnt3a en plus du BMP2 dans la culture, afin de potentialiser l'effet de celui-ci. Il s'agit ici d'un résultat préliminaire, mais les clones porteurs de la mutation $lmna^{+/H222P}$ présentent un défaut de différenciation cardiaque, après les 4 jours de différenciation au BMP2, attestant que la maturation du mésendoderme en mésoderme est bloquée dans ces clones (Figure 53). De ce fait, on peut alors penser que la différenciation cardiaque terminale ne s'effectuera pas de manière correcte chez les clones porteurs de la mutation $lmna^{+/H222P}$.

A travers ces deux modèles, nous avons pu mettre en évidence un défaut de différenciation au niveau du mésoderme cardiaque précoce dans les cellules porteuses de la mutation H222P, responsable de la Dystrophie Musculaire d'Emery-Dreifuss Autosomale Dominante (DMEM-AD). En effet, ces clones se retrouvent alors incapables de passer du

RESULTATS

stade mésendoderme au stade mésoderme cardiaque, restant bloqués au stade mésendoderme. Dans ces clones les autres feuillettes se forment de manière correcte, et les CEs issus des clones porteurs de la mutation *Imna*^{+H222P} présentent une forme irrégulière et une taille plus petite, sans doute du au fait que la différenciation mésodermique présente un défaut majeur.

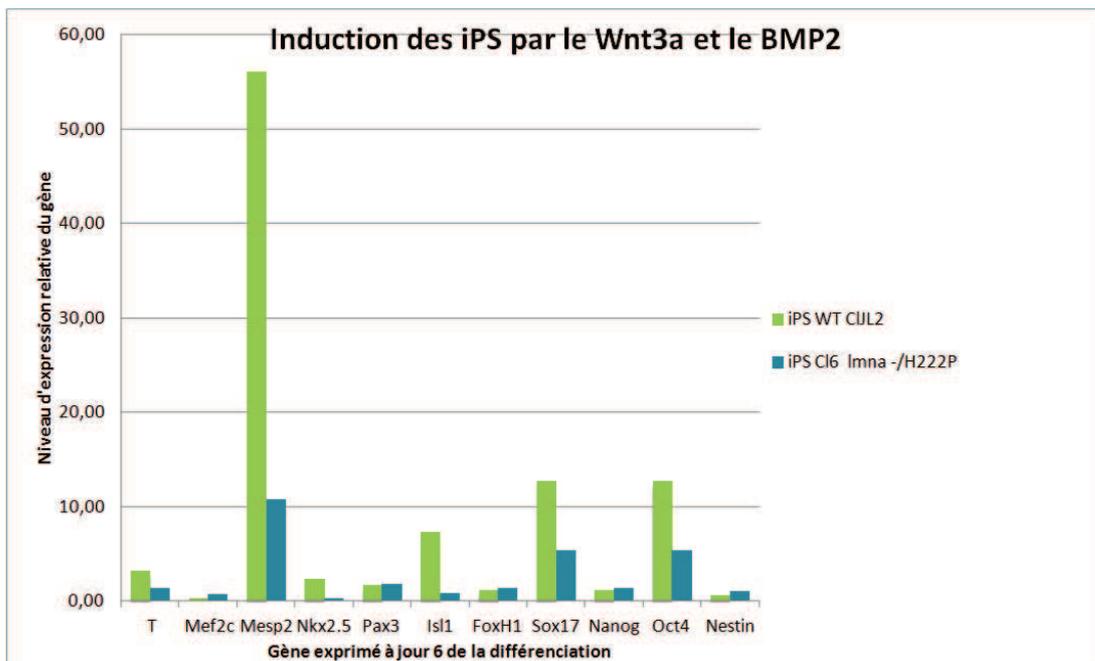


FIGURE 53 : INDUCTION DU MESENDODERME PAR LES FACTEURS WNT3A ET BMP2.

Le mésendoderme est induit pendant 3 jours dans les iPS sauvages et porteuses de la mutation pendant 3 jours puis 3 jours avec le BMP2 seul, afin de laisser la maturation mésodermique se faire (n=1=

En conclusion, mes travaux de thèse ont démontré que les cellules souches pluripotentes porteuses de la mutation *Imna*^{+H222P} pouvaient récapituler le phénotype observé chez la souris *Imna*^{H222P/H222P}, présentant des défauts cardiaques et musculaires majeurs. De plus, alors que les cellules murines ont été manipulées génétiquement, les cellules iPS ont été produites à partir de cellules de patients, permettant d'éviter d'éventuels biais dus à l'insertion du gène de la lamine mutée dans le génome. Nous avons alors développé un modèle robuste, qui pourra être utilisé afin d'étudier plus précisément les mécanismes mis en jeu dans la DMED-AD, mais aussi servir de modèle pour tester des médicaments.

DISCUSSION & CONCLUSION

DISCUSSION & CONCLUSION

1. Mise en place d'un modèle murin et humain pour les laminopathies

Les lamines de type A/C sont des protéines essentielles dans la différenciation cellulaire, et jouent donc un rôle majeur dans tout l'organisme (Dechat et al., 2008), en particulier au cours du développement. Un défaut dans l'organisation structurale de ces protéines entraîne de nombreux désordres au sein de la cellule (Worman et al., 2010). En effet, en plus de leur rôle dans la différenciation cellulaire, les lamines ont un rôle dans la transcription génique, dans l'organisation de la chromatine et dans le maintien de la structure du noyau. Les cellules souches pluripotentes n'expriment pas cette protéine (Constantinescu et al., 2006), mais l'expriment au cours de leur différenciation. Il est donc intéressant, à travers la différenciation cardiaque de ces cellules, de voir les défauts apparaître au cours du développement, et ainsi d'identifier les mécanismes génétiques et épigénétiques impliquées dans cette pathologie.

Dans cette étude, j'ai utilisé deux modèles : un modèle murin de cellules souches embryonnaires, permettant de faire le lien avec le modèle murin déjà existant (Arimura et al., 2005) et un modèle humain, obtenu à partir de fibroblastes de patients, permettant de modéliser la pathologie avec des cellules humaines dans les stades les plus précoces du développement cardiaque. L'avantage de ce modèle, contrairement aux cellules adultes provenant de patients, est qu'il est en théorie amplifiable à l'infini. Les cellules de patients porteuses de la mutation d'intérêt permettent de recueillir de précieuses informations nécessaires à l'étude de la pathologie mais ne sont pas amplifiables à l'infini *in vitro*. De plus, ces cellules sont difficiles à obtenir du fait qu'il soit souvent nécessaire de pratiquer une intervention invasive et la plupart du temps douloureuse sur le patient. Un autre avantage de ce modèle est qu'il permet d'obtenir des cellules spécifiques de la pathologie, qui ne peuvent pas être obtenues facilement chez les patients vivants comme les neurones ou les cardiomyocytes. Dans le cadre des laminopathies, qui constituent des maladies de type

DISCUSSION & CONCLUSION

multisystémique, les iPS possèdent l'avantage certain de pouvoir être différenciées en presque tous les types cellulaires.

L'étude de la DMED-AD a commencé par le modèle murin. La différenciation cardiaque des cellules souches embryonnaires murines s'est faite par la technique en gouttes pendantes (Maltsev et al., 1993), permettant de former des structures appelées corps embryoïdes (CE). Ces structures tridimensionnelles permettent de reconstituer la structure des 3 feuillets de l'embryon *in vitro*. L'activité des CEs battants formés grâce à cette technique permet d'avoir une indication sur l'efficacité de la différenciation cardiaque. Ici, la comparaison des clones porteurs de la mutation $lmna^{+/H222P}$ et des clones sauvages nous a permis de mettre en évidence un défaut de différenciation. Tout d'abord, la taille de ces corps embryoïdes est différente pour les deux types de clones. De ce fait, on peut alors se poser la question suivante: L'expression des gènes cardiaques présents au cours du développement est-elle plus faible dans les clones porteurs de la mutation $lmna^{+/H222P}$ car il y a moins de progéniteurs cardiaques dans ces CEs ou parce que les différents feuillets ne sont pas produits dans la même proportion? Après une analyse génique des gènes des trois feuillets, il semblerait que les clones porteurs de la mutation $lmna^{+/H222P}$ expriment les gènes de l'ectoderme (Nestine) et de l'endoderme (Sox17) de manière normale, comparable aux cellules sauvages, ainsi que les gènes correspondant au mésoderme précoce. Notre première conclusion sur les CSEm porteuses de la mutation $lmna^{+/H222P}$ est que la différenciation serait bloquée à un stade précoce du mésoderme. En effet, les CEs issus des clones $lmna^{+/H222P}$ peuvent exprimer les gènes du mésendoderme ou mésoderme précoce comme Brachyury, Goosecoïd, Mx11, mais commencent à présenter des défauts d'expression génique à partir du gène MesP1, le premier marqueur du mésoderme cardiaque. Concernant les protéines de structure des cellules cardiaques comme l' α -actinine, on voit ici que les CEs provenant des CSEm porteuses de la mutation $lmna^{+/H222P}$ ne sont pas structurellement organisés. Cela peut être dû au fait que la lamine mutée ne se lie pas bien avec les autres protéines de la MNI, entraînant une désorganisation du noyau. De plus, on sait que la lamine a pour fonction de maintenir l'intégrité des cellules subissant un stress mécanique comme le subissent les

DISCUSSION & CONCLUSION

cellules cardiaques contractiles (Lammerding et al., 2004). De ce fait, la cellule cardiaque $lmna^{+/H222P}$, en plus de sa structure désorganisée, sera peu apte à subir des forces mécaniques nécessaires au bon fonctionnement de la cellule cardiaque.

Par la suite, l'ajout de lamine sauvage dans les clones porteurs de la mutation $lmna^{+/H222P}$, réalisé sous le contrôle du promoteur de l' α -actine cardiaque, a permis à cette lamine de ne s'exprimer que dans les cellules de type spécifiquement cardiaque. Afin de valider les résultats obtenus par qPCR, des immunofluorescences ont été réalisées contre les protéines Mef2c, Isl1 et Nkx2.5 mais aussi l' α -actinine au jour 12 de différenciation dans des colonies différenciées sur fibroblastes cardiaques. On observe alors que les clones $lmna^{+/H222PR}$ expriment les protéines cardiaques Mef2c, Isl1 et Nkx2.5 et l' α -actinine à des niveaux similaires de ceux observés chez le clone $lmna^{+/+}$ sauvage. De plus, le clone ayant incorporé la lamine sauvage arbore une organisation structurale de l' α -actinine comparable à celle du clone sauvage. Cette correction de la mutation par la lamine de type sauvage nous permet donc de dire que le phénotype observé dans les cellules porteuses de la mutation $lmna^{+/H222P}$ est bien dû à cette dernière.

En plus du modèle murin nous avons décidé de mettre en place un modèle humain de laminopathies. Le modèle iPS est une technologie récente, apparue dans les années 2006, qui s'est ensuite démocratisée dans les années 2009, permettant à de nombreux laboratoires de générer ce type de cellules, constituant alors une source de modèles pour différentes maladies (Onder and Daley, 2012). Après induction du mésoderme avec le BMP2, les clones porteurs de la mutation $lmna^{+/H222P}$ semblent, comme les clones $lmna^{+/H222P}$ différenciés en CEs à partir de CSEm, présenter un défaut de différenciation. Alors que l'expression des facteurs de transcription de l'endoderme semblent être au même niveau chez les clones porteurs de la mutation $lmna^{+/H222P}$ que chez les clones sauvages, on observe un défaut de différenciation au niveau de facteurs du mésoderme. En effet, les facteurs de transcription MesP1 et Isl1, sont exprimés plus faiblement dans les clones porteurs de la mutation $lmna^{+/H222P}$. On peut observer aussi que, cette fois-ci, contrairement aux clones murins, le facteur de transcription Brachyury (T) semble être exprimé plus fortement dans les clones sauvages que dans les

DISCUSSION & CONCLUSION

clones porteurs de la mutation $lmna^{+/H222P}$. Cela pourrait être dû au fait que la lamine humaine, contrairement à la lamine murine, est exprimée dès les premiers stades de différenciation dans les cellules cardiaques et neurales (Constantinescu et al., 2006). La littérature reste vague quand aux premiers stades d'apparition de la lamine dans les cellules murines. Mon expérience (Figure 36) semble confirmer une expression tardive du moins en quantité protéique de la lamine A/C murine. Il est probable que le fait que l'on ne puisse voir la lamine au cours de la différenciation des CSEm que tardivement soit du au fait que le niveau d'expression de celle-ci soit très faible aux stades précoces de la différenciation.

A travers ces deux modèles, nous avons pu récapituler les stades précoces de la DMED-AD, permettant de mettre en évidence un défaut de différenciation mésodermique précoce (Figure 54). Ces modèles constituent un outil puissant pour l'identification de voies de signalisation génétique et/ou épigénétique permettant de mieux comprendre la pathologie.

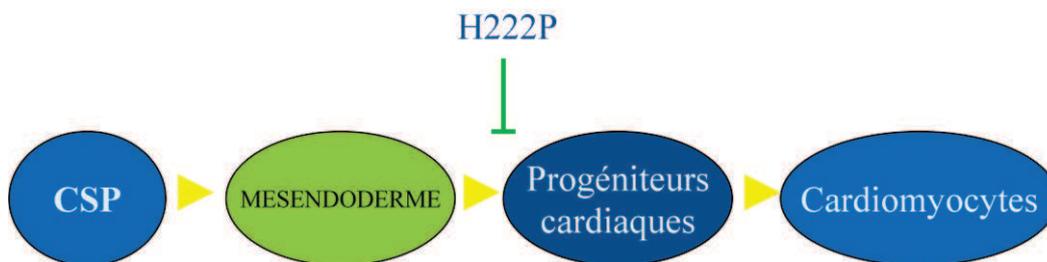


FIGURE 54 : EFFET DE LA MUTATION SUR LA DIFFERENCIATION CARDIAQUE DES CELLULES SOUCHES PLURIPOTENTES (CSP).

2. Les mécanismes et voies de signalisation qui pourraient être impliqués dans la pathologie :

La lamina permet de donner un support structurel au noyau, mais a aussi un rôle dans la régulation de la chromatine, de la transcription et de l'expression génique (Dechat et al., 2008) (Figure 56). Son rôle exact dans le noyau de la cellule reste cependant très peu connu.

La lamine ayant un rôle dans de nombreuses fonctions cellulaires, de différentes voies de signalisation pourraient être mises en cause dans la pathologie. Une des candidates serait la voie activine/nodal appartenant à la superfamille du TGF β qui est impliquée dans l'induction du mésendoderme.

En 2007, une activation anormale de la voie du TGF β a été retrouvée dans le cœur des souris porteuses de la mutation *Lmna*^{H222P/H222P} (Muchir et al., 2007; Muchir et al., 2012a). Ces voies de signalisation défectueuse pourraient être responsables du blocage de la différenciation cardiaque au stade mésendoderme/mésoderme précoce (Figure 55). Les inhibiteurs de la voie ERK améliorant la fonction cardiaque des souris porteuses des mutations *Lmna*^{H222P/H222P} (Muchir et al., 2012b; Ramos et al., 2011; Wu et al., 2010). Néanmoins, on ne sait pas si c'est la mutation qui est responsable d'une altération de la voie du TGF β ou si cette altération est secondaire à la fibrose cardiaque. Les inhibiteurs de la voie ERK auraient donc un effet sur les conséquences secondaires de la pathologie et non sur les effets directs de celle-ci. La lamine agissant sur de nombreuses molécules, les mécanismes potentiellement impliqués dans la pathologie restent à élucider.

DISCUSSION & CONCLUSION

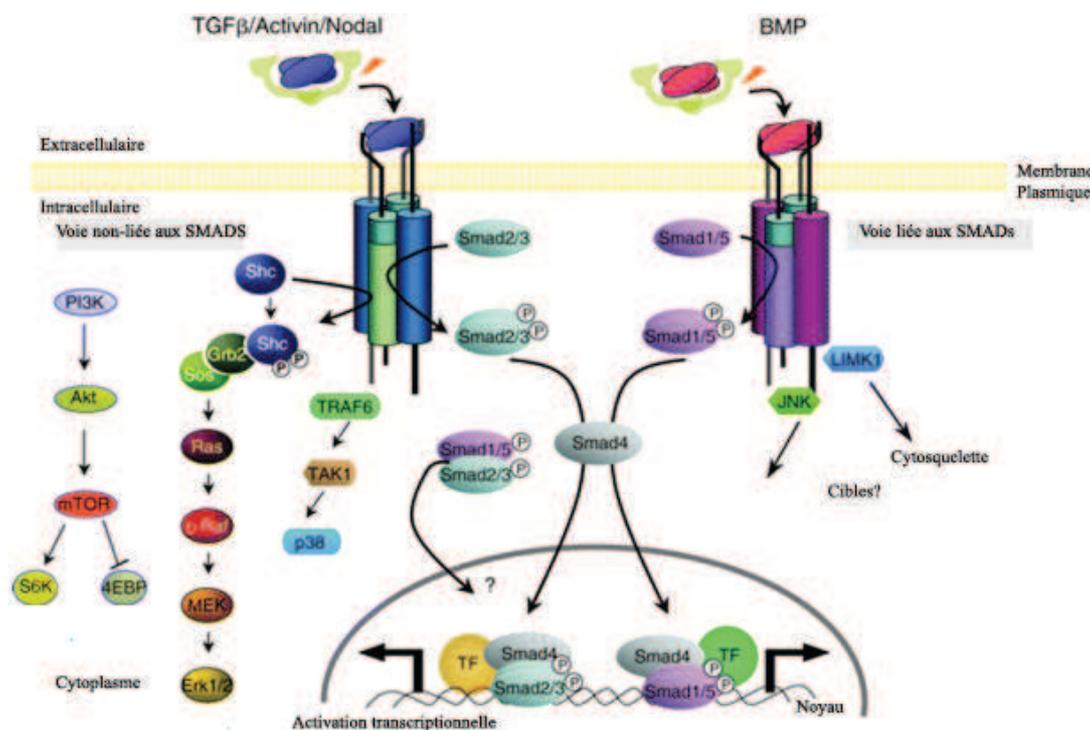


FIGURE 55 : LA VOIE DE SIGNALISATION DU TGFβ D'APRES WHARTON ET DERYNCK (WHARTON AND DERYNCK, 2009)

La lamine possède aussi un rôle dans l'organisation de la chromatine. Le fait que les lamines soient en contact direct avec la chromatine pourrait être un mécanisme de modulation de l'expression génique (Dechat et al., 2010). Des gènes inactifs sont fréquemment retrouvés en association avec les lamines, suggérant que les lamines pourraient avoir un rôle d'extinction de certains microdomaines de la chromatine (Boyle et al., 2001).

L'interaction entre la lamine et la chromatine est capitale dans la différenciation des cellules souches pluripotentes. Ces dernières présentent un état chromatinien hyperdynamique (Meshorer et al., 2006), du à une hyperacétylation des histones qui diminue au cours de la différenciation. Cette hyperacétylation, affectant l'euchromatine et l'hétérochromatine (Melcer et al., 2012), est médiée par les facteurs de transcription Oct4 et Klf4. Une diminution de l'acétylation des histones corrélée avec une augmentation de la méthylation de

DISCUSSION & CONCLUSION

la marque épigénétique H3K9, et de l'expression du gène *LMNA*, permet de réduire la plasticité de la chromatine lors de la différenciation.

L'hétérochromatine est définie par des marques épigénétiques précises. L'hétérochromatine constitutive est caractérisée par la triméthylation de l'histone H3 au niveau de la lysine 9, (H3K9me3), et de l'histone H4 au niveau de la lysine 20 (H4K20me3) tandis que la triméthylation de l'histone H3 au niveau de la lysine 27 (H3K27me3), caractérise l'hétérochromatine facultative (Maro et al., 1984).

Une dissociation de l'hétérochromatine est observée à la périphérie des noyaux dans les fibroblastes et les cardiomyocytes dérivés de la souris KO pour les lamines de type A (exprimant en fait la lamine A sous une forme tronquée) ainsi qu'une perte de l'hétérochromatine dans les cellules de patients porteurs de mutations causant la DMED-AD (Sabatelli et al., 2001). Ce type de chromatine étant défini entre autre par la marque épigénétique H3K9Me3 qui a été mise en évidence dans la différenciation, il se pourrait alors qu'un défaut de méthylation soit responsable de la mauvaise différenciation des cellules porteuses de la mutation *Lmna*^{+H222P} vers le mésoderme.

Un médiateur potentiel des changements observés dans la méthylation des histones dans de nombreuses laminopathies est le facteur rétinoblastome (Rb) (Figure 56) (sous sa forme phosphorylée pRb). Une liaison de ce facteur avec la lamine a été mise en évidence, et son expression est altérée dans les cellules exprimant des mutants pour la lamine A/C. En effet, il a été montré que pRb régule les sous unités Suv39H1 et Suv4-20h des HMT, responsables respectivement de la méthylation des histones H3K9 et H4K20me3 (Melcon et al., 2006; Nielsen et al., 2001) (Figure 56).

De plus, des déficiences dans l'expression de la lamine ou l'expression d'une lamine mutée dans la cellule donnent lieu à une myriade de défauts provoquant l'accélération du cycle cellulaire, son arrêt ou une sénescence prématurée (Verstraeten et al., 2007). En effet, la lamine A est impliquée dans le cycle cellulaire via la voie pRb/E2F responsable du passage de

DISCUSSION & CONCLUSION

la phase G1 à la phase S du cycle cellulaire, par sa liaison avec pRb et LAP2 α . Une perte de l'expression de lamines A/C entraîne alors une dégradation de pRb (Ozaki et al., 1994). De même, l'expression d'une lamine mutante responsable de la DMED-AD ou de la Progéria, résulte en une inhibition de la phosphorylation de pRb (Markiewicz et al., 2002).

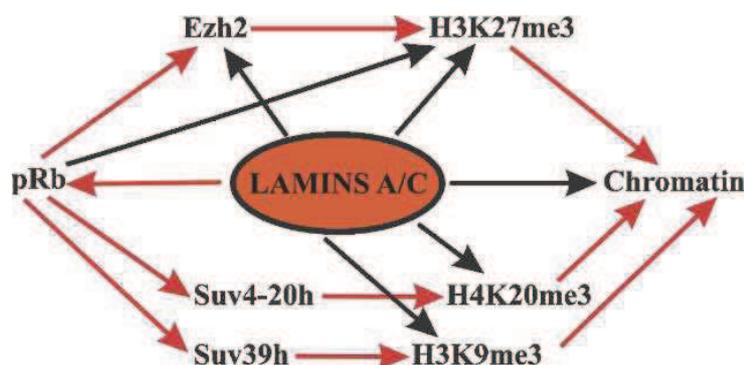


FIGURE 56: LA LAMINE ET SES INTERACTIONS AVEC LA CHROMATINE D'APRES DECHAT ET AL. 2008 (DECHAT ET AL., 2008)

Les interactions de la lamine de type A dans la cellule sont nombreuses et une ligne étroite existe entre la lamine et la chromatine, notamment au niveau des triméthylations des histones H3.

Pour compléter une précédente étude sur LEK et Rb menée dans notre laboratoire (Papadimou et al., 2005), des données non publiées ont permis de mettre en évidence un défaut des marques épigénétiques H3K4 et H3K27 dans les CEs obtenus à partir des CSEm KO pour le facteur de transcription Lek1 (Figure 57).

Le phénotype observé dans les cellules KO pour la protéine Lek1 ou Rb présentant un phénotype similaire à celui observé pour les cellules porteuses de la mutation $lmna^{+/H222P}$, il est fort possible que ces marques épigénétiques présentent les mêmes défauts dans les clones $lmna^{+/H222P}$. Des expériences sont actuellement en cours afin d'étudier les domaines H3K4me3 et H3K27me3, deux domaines bivalents de la chromatine retrouvés impliqués dans la DMED-AD, mais aussi les marques H3K36me et H3K9me. Ces expériences pourraient nous apporter des réponses quand aux mécanismes mis en cause dans les défauts de différenciation des cellules porteuses de la mutation $lmna^{+/H222P}$.

DISCUSSION & CONCLUSION

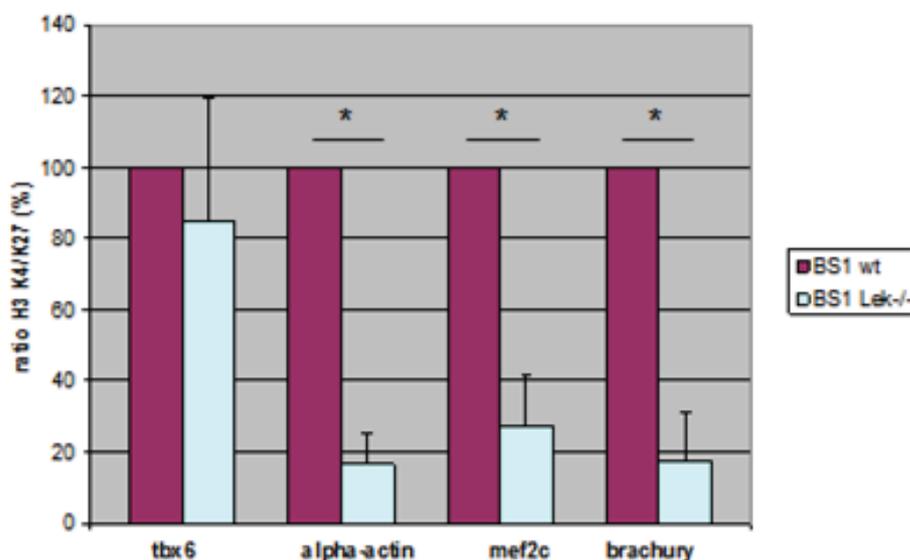


FIGURE 57 : MARQUES EPIGENTIQUES DEFECTUEUSES DANS LES CELLULES KO LEK1 D'APRES JULIA LESCHIK.

Ces données permettent de mettre en évidence un défaut majeur des domaines bivalentes K4 et K27 dans les cellules KO pour la protéine LEK.

Les lamines jouent aussi un rôle au niveau des télomères. Les cellules dépourvues de lamines de type A présentent des télomères plus courts avec une structure altérée comparativement aux cellules normales (Gonzalez-Suarez et al., 2009). De plus, les lamines interagissent avec D4Z4, une séquence subtélomérique, agissant aussi avec CTCF (CCCTC-Binding factor). Ainsi, les lamines de type A pourraient être responsables de l'organisation de certaines régions spécifiques de la chromatine et donc influencer l'expression des gènes (Ottaviani et al., 2009a; Ottaviani et al., 2009b).

D'autres marques épigénétiques ou facteurs responsables du remodelage de la chromatine sont liés à la lamine de type A, comme BAF. BAF lie directement les histones de type H3, les lamines et l'ADN. Lorsque cette protéine est surexprimée, on observe une réduction de la marque épigénétique H3K27Me3 et une augmentation de la marque H3K9Me3 (Montes de Oca et al., 2011). Enfin, il a été montré que les gènes associés à la lamine étaient majoritairement silencieux, et que des sites de liaison de la chromatine à la

DISCUSSION & CONCLUSION

lamine ont été retrouvés tout le long du génome, attestant du rôle crucial de cette protéine dans la cellule et dans la régulation de la chromatine (Kubben et al., 2012).

On peut aussi noter qu'au cours de la gastrulation, la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) permet la formation du mésoderme. La TEM est dépendante de la voie du TGF β et régulée par une enzyme remodelant la chromatine, Lsd1 (Lysine specific demethylase 1) (Wang et al., 2009) qui est une déméthylase. Cette déméthylase pourrait avoir un rôle dans la différenciation mésendodermique vers le mésoderme. De plus, il a été observé que les marques H3K4Me3 et H3K36Me3 étaient augmentées pendant la TEM (McDonald et al., 2012; Thiery et al., 2009).

Les composants principaux responsables de la forme et de la rigidité du noyau sont les filaments cytoplasmiques (Olins and Olins, 2004) qui lient les protéines de la MNI, via leur domaines SUN et KASH en formant le complexe LINC (Linker of Nucleoskeleton and Cytoskeleton) (Crisp et al., 2006; Ostlund et al., 2009). Dans ce complexe, on retrouve des protéines de la MNI, comme SUN 1 et 2, mais aussi les nesprines, qui interagissent avec les filaments intermédiaires cytoplasmiques et les microfilaments du cytosquelette, comme l'actine ou encore la plectine (Tzur et al., 2006). L'émerine se lie aussi avec les nesprines, permettant de faire un second lien entre la lamine et le cytosquelette (Wheeler et al., 2007).

Une déformation du noyau est observée dans les MEFs porteuses d'une mutation du gène LMNA (Vigouroux et al., 2001). De plus, il a été observé une déformation plus grande du noyau dans les cellules souches embryonnaires humaines (CSEh). En effet, ces cellules ne possèdent pas de lamines de type A, contrairement aux cellules différenciées (Pajerowski et al., 2007). Ces interactions entre les lamines de type A et le cytosquelette sont importantes, car la perte de lamines A/C provoque des défauts de polarisation, de migration cellulaire mais aussi une désorganisation des microfilaments, du réseau de vimentine et les microtubules (Houben et al., 2009).

DISCUSSION & CONCLUSION

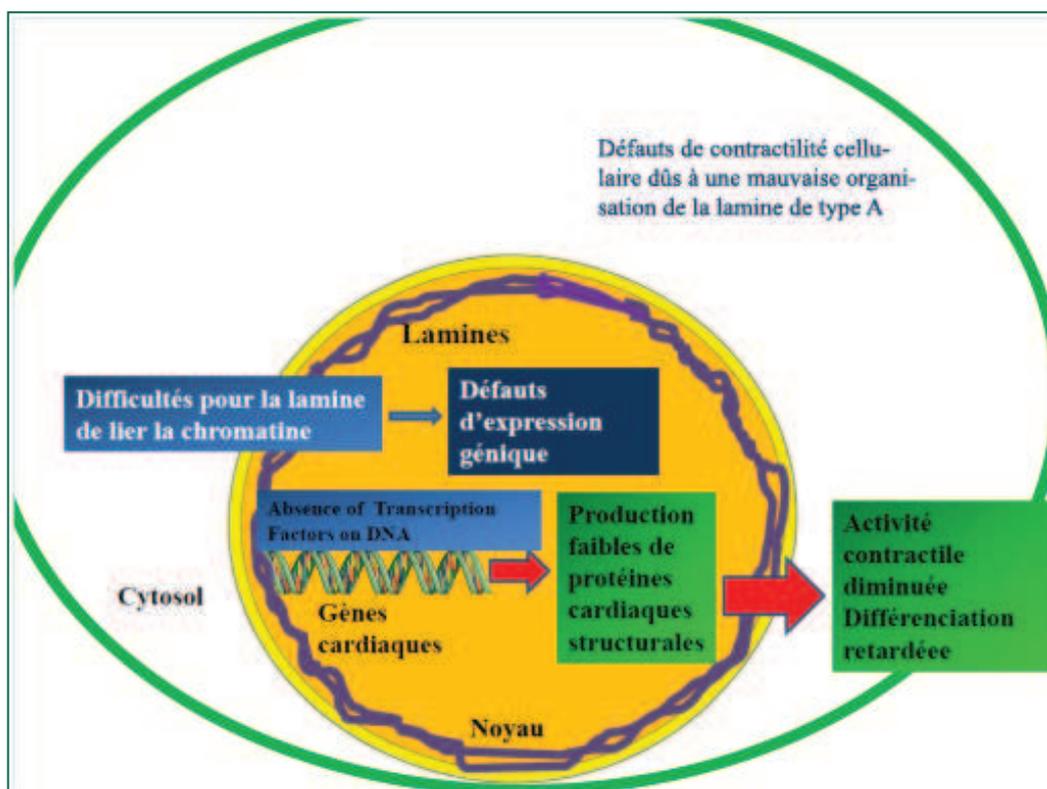


FIGURE 58: LA DYSTROPHIE MUSCULAIRE D'EMERY DREIFUSS : CONSEQUENCES SUR LA FONCTION CELLULAIRE CARDIAQUE

Mon travail de thèse a permis de mettre en place un modèle murin et humain du développement précoce impliqué dans les laminopathies. Grâce à ce modèle, de nombreuses molécules pourront être testées sur des progéniteurs cardiaques issus de ces cellules afin de trouver un traitement à cette maladie rare, qui permettrait au moins d'améliorer la fonction cardiaque et ainsi la survie des patients atteints de la DMED. Ce travail a aussi permis de mettre en évidence un défaut de différenciation au niveau du mésoderme précoce dans les cellules souches pluripotentes humaines et murines porteuses de la mutation $lmna^{+/H222P}$, entraînant un défaut d'expression des gènes impliqués dans la formation du mésoderme (Figure 58). Même si de grandes avancées ont été réalisées concernant la pathologie en termes de traitements (Muchir et al., 2012b), de nombreuses investigations restent à mener afin de comprendre le mécanisme exact de Dystrophie Musculaire d'Emery Dreifuss Autosomale

DISCUSSION & CONCLUSION

Dominante (AD-EDMD). Ce blocage au niveau du mésoderme donne lieu à de nombreuses hypothèses, corrélées entre elles. Tout d'abord, un défaut de transition épithélio-mésenchymateuse pourrait être responsable de la transition du mésendoderme vers le mésoderme cardiaque. La voie du TGF β pourrait être également mise en cause, responsable de cette transition, et retrouvée altérée dans les souris porteuses de la mutation *lmna*^{+H222P}. Enfin, des réponses complémentaires pourraient être apportées par des études focalisées d'épigénétique.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

- Aasen, T., A. Raya, M.J. Barrero, E. Garreta, A. Consiglio, F. Gonzalez, R. Vassena, J. Bilic, V. Pekarik, G. Tiscornia, M. Edel, S. Boue, and J.C. Izpisua Belmonte. 2008. Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes. *Nat Biotechnol* 26:1276-84.
- Acloque, H., M.S. Adams, K. Fishwick, M. Bronner-Fraser, and M.A. Nieto. 2009. Epithelial-mesenchymal transitions: the importance of changing cell state in development and disease. *J Clin Invest* 119:1438-49.
- Adam, S.A., and R.D. Goldman. 2011. Insights into the differences between the A- and B-type nuclear lamins. *Adv Enzyme Regul.*
- Adjaye, J., J. Huntriss, R. Herwig, A. BenKahla, T.C. Brink, C. Wierling, C. Hultschig, D. Groth, M.L. Yaspo, H.M. Picton, R.G. Gosden, and H. Lehrach. 2005. Primary differentiation in the human blastocyst: comparative molecular portraits of inner cell mass and trophectoderm cells. *Stem Cells* 23:1514-25.
- Aebi, U., J. Cohn, L. Buhle, and L. Gerace. 1986. The nuclear lamina is a meshwork of intermediate-type filaments. *Nature* 323:560-4.
- Akazawa, H., and I. Komuro. 2005. Cardiac transcription factor Csx/Nkx2-5: Its role in cardiac development and diseases. *Pharmacol Ther* 107:252-68.
- Alsan, B.H., and T.M. Schultheiss. 2002. Regulation of avian cardiogenesis by Fgf8 signaling. *Development* 129:1935-43.
- Andres, V., and J.M. Gonzalez. 2009. Role of A-type lamins in signaling, transcription, and chromatin organization. *J Cell Biol* 187:945-57.
- Arimura, T., A. Helbling-Leclerc, C. Massart, S. Varnous, F. Niel, E. Lacene, Y. Fromes, M. Toussaint, A.M. Mura, D.I. Keller, H. Amthor, R. Isnard, M. Malissen, K. Schwartz, and G. Bonne. 2005. Mouse model carrying H222P-Lmna mutation develops muscular dystrophy and dilated cardiomyopathy similar to human striated muscle laminopathies. *Hum Mol Genet* 14:155-69.
- Arman, E., R. Haffner-Krausz, Y. Chen, J.K. Heath, and P. Lonai. 1998. Targeted disruption of fibroblast growth factor (FGF) receptor 2 suggests a role for FGF signaling in pregastrulation mammalian development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:5082-7.
- Arnold, S.J., and E.J. Robertson. 2009. Making a commitment: cell lineage allocation and axis patterning in the early mouse embryo. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10:91-103.
- Arsenian, S., B. Weinhold, M. Oelgeschlager, U. Ruther, and A. Nordheim. 1998. Serum response factor is essential for mesoderm formation during mouse embryogenesis. *Embo J* 17:6289-99.
- Bachvarova, R., and K. Moy. 1985. Autoradiographic studies on the distribution of labeled maternal RNA in early mouse embryos. *J Exp Zool* 233:397-403.
- Bagutti, C., A.M. Wobus, R. Fassler, and F.M. Watt. 1996. Differentiation of embryonal stem cells into keratinocytes: comparison of wild-type and beta 1 integrin-deficient cells. *Dev Biol* 179:184-96.
- Bain, G., D. Kitchens, M. Yao, J.E. Huettner, and D.I. Gottlieb. 1995. Embryonic stem cells express neuronal properties in vitro. *Dev Biol* 168:342-57.
- Baines, C.P., and J.D. Molkentin. 2005. STRESS signaling pathways that modulate cardiac myocyte apoptosis. *J Mol Cell Cardiol* 38:47-62.

BIBLIOGRAPHIE

- Barclay, M., J.P. Julien, A.F. Ryan, and G.D. Housley. 2010. Type III intermediate filament peripherin inhibits neurogenesis in type II spiral ganglion neurons in vitro. *Neurosci Lett* 478:51-5.
- Barker, N., M. Huch, P. Kujala, M. van de Wetering, H.J. Snippert, J.H. van Es, T. Sato, D.E. Stange, H. Begthel, M. van den Born, E. Danenberg, S. van den Brink, J. Korving, A. Abo, P.J. Peters, N. Wright, R. Poulsom, and H. Clevers. 2010. Lgr5(+ve) stem cells drive self-renewal in the stomach and build long-lived gastric units in vitro. *Cell Stem Cell* 6:25-36.
- Barrowman, J., C. Hamblet, C.M. George, and S. Michaelis. 2008. Analysis of prelamin A biogenesis reveals the nucleus to be a CaaX processing compartment. *Mol Biol Cell* 19:5398-408.
- Barry, D.M., S. Millecamps, J.P. Julien, and M.L. Garcia. 2007. New movements in neurofilament transport, turnover and disease. *Exp Cell Res* 313:2110-20.
- Becane, H.M., G. Bonne, S. Varnous, A. Muchir, V. Ortega, E.H. Hammouda, J.A. Urtizberea, T. Lavergne, M. Fardeau, B. Eymard, S. Weber, K. Schwartz, and D. Duboc. 2000. High incidence of sudden death with conduction system and myocardial disease due to lamins A and C gene mutation. *Pacing Clin Electrophysiol* 23:1661-6.
- Becker, A.J., C.E. Mc, and J.E. Till. 1963. Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. *Nature* 197:452-4.
- Belmont, A.S., Y. Zhai, and A. Thilenius. 1993. Lamin B distribution and association with peripheral chromatin revealed by optical sectioning and electron microscopy tomography. *J Cell Biol* 123:1671-85.
- Ben-Harush, K., N. Wiesel, D. Frenkiel-Krispin, D. Moeller, E. Soreq, U. Aebi, H. Herrmann, Y. Gruenbaum, and O. Medalia. 2009. The supramolecular organization of the *C. elegans* nuclear lamin filament. *J Mol Biol* 386:1392-402.
- Benavente, R., and G. Krohne. 1986. Involvement of nuclear lamins in postmitotic reorganization of chromatin as demonstrated by microinjection of lamin antibodies. *J Cell Biol* 103:1847-54.
- Beppu, H., M. Kawabata, T. Hamamoto, A. Chytil, O. Minowa, T. Noda, and K. Miyazono. 2000. BMP type II receptor is required for gastrulation and early development of mouse embryos. *Dev Biol* 221:249-58.
- Berger, R., L. Theodor, J. Shoham, E. Gokkel, F. Brok-Simoni, K.B. Avraham, N.G. Copeland, N.A. Jenkins, G. Rechavi, and A.J. Simon. 1996. The characterization and localization of the mouse thymopoietin/lamina-associated polypeptide 2 gene and its alternatively spliced products. *Genome Res* 6:361-70.
- Bertrand, A.T., K. Chikhaoui, R. Ben Yaou, and G. Bonne. 2011. [Laminopathies: one gene, several diseases]. *Biol Aujourd'hui* 205:147-62.
- Bialer, M.G., N.L. McDaniel, and T.E. Kelly. 1991. Progression of cardiac disease in Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Clin Cardiol* 14:411-6.
- Biamonti, G., M. Giacca, G. Perini, G. Contreas, L. Zentilin, F. Weighardt, M. Guerra, G. Della Valle, S. Saccone, S. Riva, and et al. 1992. The gene for a novel human lamin maps at a highly transcribed locus of chromosome 19 which replicates at the onset of S-phase. *Mol Cell Biol* 12:3499-506.
- Biben, C., and R.P. Harvey. 1997. Homeodomain factor Nkx2-5 controls left/right asymmetric expression of bHLH gene eHand during murine heart development. *Genes Dev* 11:1357-69.

BIBLIOGRAPHIE

- Bione, S., E. Maestrini, S. Rivella, M. Mancini, S. Regis, G. Romeo, and D. Toniolo. 1994. Identification of a novel X-linked gene responsible for Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Nat Genet* 8:323-7.
- Blin, G., A.-C. Guénantin, S. Stéfanovic, and M. Pucéat. 2009. Thérapie cellulaire de la défaillance cardiaque— Entre croyances et espoirs —. *La lettre des thérapies innovantes* 4.
- Blin, G., T. Neri, S. Stefanovic, and M. Puceat. 2010. Human embryonic and induced pluripotent stem cells in basic and clinical research in cardiology. *Curr Stem Cell Res Ther* 5:215-26.
- Boguslavsky, R.L., C.L. Stewart, and H.J. Worman. 2006. Nuclear lamin A inhibits adipocyte differentiation: implications for Dunnigan-type familial partial lipodystrophy. *Hum Mol Genet* 15:653-63.
- Boheler, K.R., J. Czyz, D. Tweedie, H.T. Yang, S.V. Anisimov, and A.M. Wobus. 2002. Differentiation of pluripotent embryonic stem cells into cardiomyocytes. *Circ Res* 91:189-201.
- Bondué, A., G. Lapouge, C. Paulissen, C. Semeraro, M. Iacovino, M. Kyba, and C. Blanpain. 2008. *Mesp1* acts as a master regulator of multipotent cardiovascular progenitor specification. *Cell Stem Cell* 3:69-84.
- Bonne, G., M.R. Di Barletta, S. Varnous, H.M. Becane, E.H. Hammouda, L. Merlini, F. Muntoni, C.R. Greenberg, F. Gary, J.A. Urtizberea, D. Duboc, M. Fardeau, D. Toniolo, and K. Schwartz. 1999. Mutations in the gene encoding lamin A/C cause autosomal dominant Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Nat Genet* 21:285-8.
- Bonne, G., R.B. Yaou, C. Beroud, G. Boriani, S. Brown, M. de Visser, D. Duboc, J. Ellis, I. Hausmanowa-Petrusewicz, G. Lattanzi, L. Merlini, G. Morris, F. Muntoni, G. Opolski, Y.M. Pinto, F. Sangiuolo, D. Toniolo, R. Trembath, J.H. van Berlo, A.J. van der Kooi, and M. Wehnert. 2003. 108th ENMC International Workshop, 3rd Workshop of the MYO-CLUSTER project: EUROMEN, 7th International Emery-Dreifuss Muscular Dystrophy (EDMD) Workshop, 13-15 September 2002, Naarden, The Netherlands. *Neuromuscul Disord* 13:508-15.
- Bouvier, D., J. Hubert, A.P. Seve, and M. Bouteille. 1985. Characterization of lamina-bound chromatin in the nuclear shell isolated from HeLa cells. *Exp Cell Res* 156:500-12.
- Boyer, L.A., T.I. Lee, M.F. Cole, S.E. Johnstone, S.S. Levine, J.P. Zucker, M.G. Guenther, R.M. Kumar, H.L. Murray, R.G. Jenner, D.K. Gifford, D.A. Melton, R. Jaenisch, and R.A. Young. 2005. Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell* 122:947-56.
- Boyle, S., S. Gilchrist, J.M. Bridger, N.L. Mahy, J.A. Ellis, and W.A. Bickmore. 2001. The spatial organization of human chromosomes within the nuclei of normal and emerin-mutant cells. *Hum Mol Genet* 10:211-9.
- Bradley, A., M. Evans, M.H. Kaufman, and E. Robertson. 1984. Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines. *Nature* 309:255-6.
- Brand, T. 2003. Heart development: molecular insights into cardiac specification and early morphogenesis. *Dev Biol* 258:1-19.
- Brantjes, H., N. Barker, J. van Es, and H. Clevers. 2002. TCF: Lady Justice casting the final verdict on the outcome of Wnt signalling. *Biol Chem* 383:255-61.
- Bray, S.J. 2006. Notch signalling: a simple pathway becomes complex. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7:678-89.

BIBLIOGRAPHIE

- Brehm, A., E.A. Miska, D.J. McCance, J.L. Reid, A.J. Bannister, and T. Kouzarides. 1998. Retinoblastoma protein recruits histone deacetylase to repress transcription. *Nature* 391:597-601.
- Brennan, J., C.C. Lu, D.P. Norris, T.A. Rodriguez, R.S. Beddington, and E.J. Robertson. 2001. Nodal signalling in the epiblast patterns the early mouse embryo. *Nature* 411:965-9.
- Bridger, J.M., I.R. Kill, M. O'Farrell, and C.J. Hutchison. 1993. Internal lamin structures within G1 nuclei of human dermal fibroblasts. *J Cell Sci* 104 (Pt 2):297-306.
- Broers, J.L., F.C. Ramaekers, G. Bonne, R.B. Yaou, and C.J. Hutchison. 2006. Nuclear lamins: laminopathies and their role in premature ageing. *Physiol Rev* 86:967-1008.
- Broers, J.L., B.M. Machiels, G.J. van Eys, H.J. Kuijpers, E.M. Manders, R. van Driel, and F.C. Ramaekers. 1999. Dynamics of the nuclear lamina as monitored by GFP-tagged A-type lamins. *J Cell Sci* 112 (Pt 20):3463-75.
- Brons, I.G., L.E. Smithers, M.W. Trotter, P. Rugg-Gunn, B. Sun, S.M. Chuva de Sousa Lopes, S.K. Howlett, A. Clarkson, L. Ahrlund-Richter, R.A. Pedersen, and L. Vallier. 2007. Derivation of pluripotent epiblast stem cells from mammalian embryos. *Nature* 448:191-5.
- Brott, B.K., and S.Y. Sokol. 2005. A vertebrate homolog of the cell cycle regulator Dbf4 is an inhibitor of Wnt signaling required for heart development. *Dev Cell* 8:703-15.
- Buckingham, M., S. Meilhac, and S. Zaffran. 2005. Building the mammalian heart from two sources of myocardial cells. *Nat Rev Genet* 6:826-35.
- Burdsal, C.A., C.H. Damsky, and R.A. Pedersen. 1993. The role of E-cadherin and integrins in mesoderm differentiation and migration at the mammalian primitive streak. *Development* 118:829-44.
- Burridge, P.W., D. Anderson, H. Priddle, M.D. Barbadillo Munoz, S. Chamberlain, C. Allegrucci, L.E. Young, and C. Denning. 2007. Improved human embryonic stem cell embryoid body homogeneity and cardiomyocyte differentiation from a novel V-96 plate aggregation system highlights interline variability. *Stem Cells* 25:929-38.
- Cai, C.L., X. Liang, Y. Shi, P.H. Chu, S.L. Pfaff, J. Chen, and S. Evans. 2003. Isl1 identifies a cardiac progenitor population that proliferates prior to differentiation and contributes a majority of cells to the heart. *Dev Cell* 5:877-89.
- Cai, M., Y. Huang, R. Ghirlando, K.L. Wilson, R. Craigie, and G.M. Clore. 2001. Solution structure of the constant region of nuclear envelope protein LAP2 reveals two LEM-domain structures: one binds BAF and the other binds DNA. *Embo J* 20:4399-407.
- Capanni, C., V. Cenni, T. Haraguchi, S. Squarzone, S. Schuchner, E. Ogris, G. Novelli, N. Maraldi, and G. Lattanzi. 2010. Lamin A precursor induces barrier-to-autointegration factor nuclear localization. *Cell Cycle* 9:2600-10.
- Capecchi, M.R. 1989. The new mouse genetics: altering the genome by gene targeting. *Trends Genet* 5:70-6.
- Capetanaki, Y. 2000. Desmin cytoskeleton in healthy and failing heart. *Heart Fail Rev* 5:203-20.
- Cauffman, G., M. De Rycke, K. Sermon, I. Liebaers, and H. Van de Velde. 2009. Markers that define stemness in ESC are unable to identify the totipotent cells in human preimplantation embryos. *Hum Reprod* 24:63-70.
- Cestan, and Lejonne. 1902. Une myopathie avec retractions familiales. *Nouv Iconogr Salpetr*:38-52.

BIBLIOGRAPHIE

- Chambers, I., D. Colby, M. Robertson, J. Nichols, S. Lee, S. Tweedie, and A. Smith. 2003. Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell* 113:643-55.
- Chan, E.M., S. Ratanasirintrao, I.H. Park, P.D. Manos, Y.H. Loh, H. Huo, J.D. Miller, O. Hartung, J. Rho, T.A. Ince, G.Q. Daley, and T.M. Schlaeger. 2009. Live cell imaging distinguishes bona fide human iPS cells from partially reprogrammed cells. *Nat Biotechnol* 27:1033-7.
- Chase, L.G., and M.T. Firpo. 2007. Development of serum-free culture systems for human embryonic stem cells. *Curr Opin Chem Biol* 11:367-72.
- Chaudhary, N., and J.C. Courvalin. 1993. Stepwise reassembly of the nuclear envelope at the end of mitosis. *J Cell Biol* 122:295-306.
- Chen, A.E., D. Egli, K. Niakan, J. Deng, H. Akutsu, M. Yamaki, C. Cowan, C. Fitz-Gerald, K. Zhang, D.A. Melton, and K. Eggan. 2009. Optimal timing of inner cell mass isolation increases the efficiency of human embryonic stem cell derivation and allows generation of sibling cell lines. *Cell Stem Cell* 4:103-6.
- Chen, X., H. Xu, P. Yuan, F. Fang, M. Huss, V.B. Vega, E. Wong, Y.L. Orlov, W. Zhang, J. Jiang, Y.H. Loh, H.C. Yeo, Z.X. Yeo, V. Narang, K.R. Govindarajan, B. Leong, A. Shahab, Y. Ruan, G. Bourque, W.K. Sung, N.D. Clarke, C.L. Wei, and H.H. Ng. 2008. Integration of external signaling pathways with the core transcriptional network in embryonic stem cells. *Cell* 133:1106-17.
- Ciruna, B., and J. Rossant. 2001. FGF signaling regulates mesoderm cell fate specification and morphogenetic movement at the primitive streak. *Dev Cell* 1:37-49.
- Clarke, S. 1992. Protein isoprenylation and methylation at carboxyl-terminal cysteine residues. *Annu Rev Biochem* 61:355-86.
- Clayton, L., A. Hall, and M.H. Johnson. 1999. A role for Rho-like GTPases in the polarisation of mouse eight-cell blastomeres. *Dev Biol* 205:322-31.
- Clements, L., S. Manilal, D.R. Love, and G.E. Morris. 2000. Direct interaction between emerin and lamin A. *Biochem Biophys Res Commun* 267:709-14.
- Clevers, H. 2006. Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell* 127:469-80.
- Cockburn, K., and J. Rossant. 2010. Making the blastocyst: lessons from the mouse. *J Clin Invest* 120:995-1003.
- Cohen, A.H., and J.R. Sundeen. 1976. The nuclear fibrous lamina in human cells: studies on its appearance and distribution. *Anat Rec* 186:471-6.
- Cohen, E.D., M.F. Miller, Z. Wang, R.T. Moon, and E.E. Morrisey. 2012. Wnt5a and Wnt11 are essential for second heart field progenitor development. *Development* 139:1931-40.
- Conrad, S., M. Renninger, J. Hennenlotter, T. Wiesner, L. Just, M. Bonin, W. Aicher, H.J. Buhning, U. Mattheus, A. Mack, H.J. Wagner, S. Minger, M. Matzkies, M. Reppel, J. Hescheler, K.D. Sievert, A. Stenzl, and T. Skutella. 2008. Generation of pluripotent stem cells from adult human testis. *Nature* 456:344-9.
- Constantinescu, D., H.L. Gray, P.J. Sammak, G.P. Schatten, and A.B. Csoka. 2006. Lamin A/C expression is a marker of mouse and human embryonic stem cell differentiation. *Stem Cells* 24:177-85.
- Cordes, K.R., D. Srivastava, and K.N. Ivey. 2009. MicroRNAs in cardiac development. *Pediatr Cardiol* 31:349-56.
- Crisp, M., Q. Liu, K. Roux, J.B. Rattner, C. Shanahan, B. Burke, P.D. Stahl, and D. Hodzic. 2006. Coupling of the nucleus and

BIBLIOGRAPHIE

- cytoplasm: role of the LINC complex. *J Cell Biol* 172:41-53.
- Dai, Q., E. Choy, V. Chiu, J. Romano, S.R. Slivka, S.A. Steitz, S. Michaelis, and M.R. Philips. 1998. Mammalian prenylcysteine carboxyl methyltransferase is in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 273:15030-4.
- Dauer, W.T., and H.J. Worman. 2009. The nuclear envelope as a signaling node in development and disease. *Dev Cell* 17:626-38.
- Davies, B.S., L.G. Fong, S.H. Yang, C. Coffinier, and S.G. Young. 2009. The posttranslational processing of prelamin A and disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 10:153-74.
- De Sandre-Giovannoli, A., R. Bernard, P. Cau, C. Navarro, J. Amiel, I. Boccaccio, S. Lyonnet, C.L. Stewart, A. Munnich, M. Le Merrer, and N. Levy. 2003. Lamin A truncation in Hutchinson-Gilford progeria. *Science* 300:2055.
- De Sandre-Giovannoli, A., M. Chaouch, S. Kozlov, J.M. Vallat, M. Tazir, N. Kassouri, P. Szepietowski, T. Hammadouche, A. Vandenberghe, C.L. Stewart, D. Grid, and N. Levy. 2002. Homozygous defects in LMNA, encoding lamin A/C nuclear-envelope proteins, cause autosomal recessive axonal neuropathy in human (Charcot-Marie-Tooth disorder type 2) and mouse. *Am J Hum Genet* 70:726-36.
- DeBusk, F.L. 1972. The Hutchinson-Gilford progeria syndrome. Report of 4 cases and review of the literature. *J Pediatr* 80:697-724.
- Dechat, T., K. Gesson, and R. Foisner. 2011. Lamina-independent lamins in the nuclear interior serve important functions. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 75:533-43.
- Dechat, T., S.A. Adam, P. Taimen, T. Shimi, and R.D. Goldman. 2010. Nuclear lamins. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2:a000547.
- Dechat, T., B. Korbei, O.A. Vaughan, S. Vlcek, C.J. Hutchison, and R. Foisner. 2000. Lamina-associated polypeptide 2alpha binds intranuclear A-type lamins. *J Cell Sci* 113 Pt 19:3473-84.
- Dechat, T., K. Pflieger, K. Sengupta, T. Shimi, D.K. Shumaker, L. Solimando, and R.D. Goldman. 2008. Nuclear lamins: major factors in the structural organization and function of the nucleus and chromatin. *Genes Dev* 22:832-53.
- Dechat, T., A. Gajewski, B. Korbei, D. Gerlich, N. Daigle, T. Haraguchi, K. Furukawa, J. Ellenberg, and R. Foisner. 2004. LAP2alpha and BAF transiently localize to telomeres and specific regions on chromatin during nuclear assembly. *J Cell Sci* 117:6117-28.
- Derynck, R., and Y.E. Zhang. 2003. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature* 425:577-84.
- Dhe-Paganon, S., E.D. Werner, Y.I. Chi, and S.E. Shoelson. 2002. Structure of the globular tail of nuclear lamin. *J Biol Chem* 277:17381-4.
- Dittmer, T.A., and T. Misteli. 2011. The lamin protein family. *Genome Biol* 12:222.
- Dorner, D., J. Gotzmann, and R. Foisner. 2007. Nucleoplasmic lamins and their interaction partners, LAP2alpha, Rb, and BAF, in transcriptional regulation. *Febs J* 274:1362-73.
- Dreger, M., L. Bengtsson, T. Schoneberg, H. Otto, and F. Hucho. 2001. Nuclear envelope proteomics: novel integral membrane proteins of the inner nuclear membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:11943-8.
- Dreuillet, C., J. Tillit, M. Kress, and M. Ernoult-Lange. 2002. In vivo and in vitro

BIBLIOGRAPHIE

- interaction between human transcription factor MOK2 and nuclear lamin A/C. *Nucleic Acids Res* 30:4634-42.
- Ducibella, T., T. Ukena, M. Karnovsky, and E. Anderson. 1977. Changes in cell surface and cortical cytoplasmic organization during early embryogenesis in the preimplantation mouse embryo. *J Cell Biol* 74:153-67.
- Dunnigan, M.G., M.A. Cochrane, A. Kelly, and J.W. Scott. 1974. Familial lipotrophic diabetes with dominant transmission. A new syndrome. *Q J Med* 43:33-48.
- Dwyer, N., and G. Blobel. 1976. A modified procedure for the isolation of a pore complex-lamina fraction from rat liver nuclei. *J Cell Biol* 70:581-91.
- Dyck, P.J., J.F. Mellinger, T.J. Reagan, S.J. Horowitz, J.W. McDonald, W.J. Litchy, J.R. Daube, R.D. Fealey, V.L. Go, P.C. Kao, W.S. Brimijoin, and E.H. Lambert. 1983. Not 'indifference to pain' but varieties of hereditary sensory and autonomic neuropathy. *Brain* 106 (Pt 2):373-90.
- Dyer, J.A., B.E. Lane, and C.J. Hutchison. 1999. Investigations of the pathway of incorporation and function of lamin A in the nuclear lamina. *Microsc Res Tech* 45:1-12.
- Eakin, G.S., and R.R. Behringer. 2004. Diversity of germ layer and axis formation among mammals. *Semin Cell Dev Biol* 15:619-29.
- Edwards, R.G., J.M. Purdy, P.C. Steptoe, and D.E. Walters. 1981. The growth of human preimplantation embryos in vitro. *Am J Obstet Gynecol* 141:408-16.
- Eferl, R., and E.F. Wagner. 2003. AP-1: a double-edged sword in tumorigenesis. *Nat Rev Cancer* 3:859-68.
- Eisenberg, C.A., and L.M. Eisenberg. 1999. WNT11 promotes cardiac tissue formation of early mesoderm. *Dev Dyn* 216:45-58.
- Ellenberg, J., E.D. Siggia, J.E. Moreira, C.L. Smith, J.F. Presley, H.J. Worman, and J. Lippincott-Schwartz. 1997. Nuclear membrane dynamics and reassembly in living cells: targeting of an inner nuclear membrane protein in interphase and mitosis. *J Cell Biol* 138:1193-206.
- Emery, A.E. 1987. X-linked muscular dystrophy with early contractures and cardiomyopathy (Emery-Dreifuss type). *Clin Genet* 32:360-7.
- Emery, A.E., and F.E. Dreifuss. 1966. Unusual type of benign x-linked muscular dystrophy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 29:338-42.
- Eriksson, M., W.T. Brown, L.B. Gordon, M.W. Glynn, J. Singer, L. Scott, M.R. Erdos, C.M. Robbins, T.Y. Moses, P. Berglund, A. Dutra, E. Pak, S. Durkin, A.B. Csoka, M. Boehnke, T.W. Glover, and F.S. Collins. 2003. Recurrent de novo point mutations in lamin A cause Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Nature* 423:293-8.
- Evans, M.J., and M.H. Kaufman. 1981. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292:154-6.
- Ewald, A.J., S.M. Peyrot, J.M. Tyszka, S.E. Fraser, and J.B. Wallingford. 2004. Regional requirements for Dishevelled signaling during *Xenopus* gastrulation: separable effects on blastopore closure, mesendoderm internalization and archenteron formation. *Development* 131:6195-209.
- Fassler, R., J. Rohwedel, V. Maltsev, W. Bloch, S. Lentini, K. Guan, D. Gullberg, J. Hescheler, K. Addicks, and A.M. Wobus. 1996. Differentiation and integrity of cardiac muscle cells are impaired in the

BIBLIOGRAPHIE

- absence of beta 1 integrin. *J Cell Sci* 109 (Pt 13):2989-99.
- Fatkin, D., C. MacRae, T. Sasaki, M.R. Wolff, M. Porcu, M. Frenneaux, J. Atherton, H.J. Vidaillet, Jr., S. Spudich, U. De Girolami, J.G. Seidman, C. Seidman, F. Muntoni, G. Muehle, W. Johnson, and B. McDonough. 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* 341:1715-24.
- Favreau, C., D. Higuette, J.C. Courvalin, and B. Buendia. 2004. Expression of a mutant lamin A that causes Emery-Dreifuss muscular dystrophy inhibits in vitro differentiation of C2C12 myoblasts. *Mol Cell Biol* 24:1481-92.
- Fawcett, D.W. 1966. On the occurrence of a fibrous lamina on the inner aspect of the nuclear envelope in certain cells of vertebrates. *Am J Anat* 119:129-45.
- Fields, A.P., and L.J. Thompson. 1995. The regulation of mitotic nuclear envelope breakdown: a role for multiple lamin kinases. *Prog Cell Cycle Res* 1:271-86.
- Fisher, D.Z., N. Chaudhary, and G. Blobel. 1986. cDNA sequencing of nuclear lamins A and C reveals primary and secondary structural homology to intermediate filament proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83:6450-4.
- Fisher, S.J., T.Y. Cui, L. Zhang, L. Hartman, K. Grahl, G.Y. Zhang, J. Tarpey, and C.H. Damsky. 1989. Adhesive and degradative properties of human placental cytotrophoblast cells in vitro. *J Cell Biol* 109:891-902.
- Fiuza, U.M., and A.M. Arias. 2007. Cell and molecular biology of Notch. *J Endocrinol* 194:459-74.
- Foisner, R., and L. Gerace. 1993. Integral membrane proteins of the nuclear envelope interact with lamins and chromosomes, and binding is modulated by mitotic phosphorylation. *Cell* 73:1267-79.
- Foley, A.C., and M. Mercola. 2005. Heart induction by Wnt antagonists depends on the homeodomain transcription factor Hex. *Genes Dev* 19:387-96.
- Frock, R.L., B.A. Kudlow, A.M. Evans, S.A. Jameson, S.D. Hauschka, and B.K. Kennedy. 2006. Lamin A/C and emerin are critical for skeletal muscle satellite cell differentiation. *Genes Dev* 20:486-500.
- Fujikura, J., E. Yamato, S. Yonemura, K. Hosoda, S. Masui, K. Nakao, J. Miyazaki Ji, and H. Niwa. 2002. Differentiation of embryonic stem cells is induced by GATA factors. *Genes Dev* 16:784-9.
- Fujimori, T. 2010. Preimplantation development of mouse: a view from cellular behavior. *Dev Growth Differ* 52:253-62.
- Furukawa, K. 1999. LAP2 binding protein 1 (L2BP1/BAF) is a candidate mediator of LAP2-chromatin interaction. *J Cell Sci* 112 (Pt 15):2485-92.
- Furukawa, K., and Y. Hotta. 1993. cDNA cloning of a germ cell specific lamin B3 from mouse spermatocytes and analysis of its function by ectopic expression in somatic cells. *Embo J* 12:97-106.
- Fusaki, N., H. Ban, A. Nishiyama, K. Saeki, and M. Hasegawa. 2009. Efficient induction of transgene-free human pluripotent stem cells using a vector based on Sendai virus, an RNA virus that does not integrate into the host genome. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 85:348-62.
- Galiova, G., E. Bartova, I. Raska, J. Krejci, and S. Kozubek. 2008. Chromatin changes induced by lamin A/C deficiency and the histone deacetylase inhibitor trichostatin A. *Eur J Cell Biol* 87:291-303.

BIBLIOGRAPHIE

- Garavelli, L., M.R. D'Apice, F. Rivieri, M. Bertoli, A. Wischmeijer, C. Gelmini, V. De Nigris, E. Albertini, S. Rosato, R. Viridis, E. Bacchini, R. Dal Zotto, G. Banchini, L. Iughetti, S. Bernasconi, A. Superti-Furga, and G. Novelli. 2009. Mandibuloacral dysplasia type A in childhood. *Am J Med Genet A* 149A:2258-64.
- Garcia-Martinez, V., and G.C. Schoenwolf. 1993. Primitive-streak origin of the cardiovascular system in avian embryos. *Dev Biol* 159:706-19.
- Gerace, L., and G. Blobel. 1980. The nuclear envelope lamina is reversibly depolymerized during mitosis. *Cell* 19:277-87.
- Gerace, L., A. Blum, and G. Blobel. 1978. Immunocytochemical localization of the major polypeptides of the nuclear pore complex-lamina fraction. Interphase and mitotic distribution. *J Cell Biol* 79:546-66.
- Gessert, S., and M. Kuhl. 2010. The multiple phases and faces of wnt signaling during cardiac differentiation and development. *Circ Res* 107:186-99.
- Gilbert, S.F. 2003. *Biologie du developpement*, 2ème édition. Editions De Boeck Universités.
- Gilford. 1904. Ateleiosis and progeria : continious youth and premature old age. *Brit Med J* 2:914-916.
- Gilfrord. 1904. Ateleiosis and progeria : continious youth and premature old age. *Brit Med J* 2:914-916.
- Goldberg, M., A. Harel, M. Brandeis, T. Rechsteiner, T.J. Richmond, A.M. Weiss, and Y. Gruenbaum. 1999. The tail domain of lamin Dm0 binds histones H2A and H2B. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:2852-7.
- Goldman, A.E., G. Maul, P.M. Steinert, H.Y. Yang, and R.D. Goldman. 1986. Keratin-like proteins that coisolate with intermediate filaments of BHK-21 cells are nuclear lamins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83:3839-43.
- Gonzalez-Suarez, I., A.B. Redwood, and S. Gonzalo. 2009. Loss of A-type lamins and genomic instability. *Cell Cycle* 8:3860-5.
- Goodwin, R.L., L.M. Pabon-Pena, G.C. Foster, and D. Bader. 1999. The cloning and analysis of LEK1 identifies variations in the LEK/centromere protein F/mitosin gene family. *J Biol Chem* 274:18597-604.
- Gough, L.L., J. Fan, S. Chu, S. Winnick, and K.A. Beck. 2003. Golgi localization of Syne-1. *Mol Biol Cell* 14:2410-24.
- Gruenbaum, Y., A. Margalit, R.D. Goldman, D.K. Shumaker, and K.L. Wilson. 2005. The nuclear lamina comes of age. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6:21-31.
- Gurdon, J.B. 1962. Adult frogs derived from the nuclei of single somatic cells. *Dev Biol* 4:256-73.
- Hamatani, T., M.G. Carter, A.A. Sharov, and M.S. Ko. 2004. Dynamics of global gene expression changes during mouse preimplantation development. *Dev Cell* 6:117-31.
- Hanna, J., A.W. Cheng, K. Saha, J. Kim, C.J. Lengner, F. Soldner, J.P. Cassady, J. Muffat, B.W. Carey, and R. Jaenisch. 2010a. Human embryonic stem cells with biological and epigenetic characteristics similar to those of mouse ESCs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:9222-7.
- Hanna, J.H., K. Saha, and R. Jaenisch. 2010b. Pluripotency and cellular reprogramming: facts, hypotheses, unresolved issues. *Cell* 143:508-25.
- Haraguchi, T., T. Koujin, M. Segura-Totten, K.K. Lee, Y. Matsuoka, Y. Yoneda, K.L. Wilson, and Y. Hiraoka. 2001. BAF is required for emerin assembly into the

BIBLIOGRAPHIE

- reforming nuclear envelope. *J Cell Sci* 114:4575-85.
- Harvey, R.P. 2002. Patterning the vertebrate heart. *Nat Rev Genet* 3:544-56.
- Hashimoto-Partyka, M.K., M. Yuge, and K.W. Cho. 2003. Nodal signaling in *Xenopus* gastrulae is cell-autonomous and patterned by beta-catenin. *Dev Biol* 253:125-38.
- Hegele, R.A., H. Cao, D.M. Liu, G.A. Costain, V. Charlton-Menys, N.W. Rodger, and P.N. Durrington. 2006. Sequencing of the reannotated LMNB2 gene reveals novel mutations in patients with acquired partial lipodystrophy. *Am J Hum Genet* 79:383-9.
- Hirai, H., P. Karian, and N. Kikyo. 2011. Regulation of embryonic stem cell self-renewal and pluripotency by leukaemia inhibitory factor. *Biochem J* 438:11-23.
- Hodzic, D.M., D.B. Yeater, L. Bengtsson, H. Otto, and P.D. Stahl. 2004. Sun2 is a novel mammalian inner nuclear membrane protein. *J Biol Chem* 279:25805-12.
- Hoffmeyer, K., A. Raggioli, S. Rudloff, R. Anton, A. Hierholzer, I. Del Valle, K. Hein, R. Vogt, and R. Kemler. 2012. Wnt/beta-catenin signaling regulates telomerase in stem cells and cancer cells. *Science* 336:1549-54.
- Holtz, D., R.A. Tanaka, J. Hartwig, and F. McKeon. 1989. The CaaX motif of lamin A functions in conjunction with the nuclear localization signal to target assembly to the nuclear envelope. *Cell* 59:969-77.
- Houben, F., C.H. Willems, I.L. Declercq, K. Hochstenbach, M.A. Kamps, L.H. Snoeckx, F.C. Ramaekers, and J.L. Broers. 2009. Disturbed nuclear orientation and cellular migration in A-type lamin deficient cells. *Biochim Biophys Acta* 1793:312-24.
- Huelsken, J., R. Vogel, V. Brinkmann, B. Erdmann, C. Birchmeier, and W. Birchmeier. 2000. Requirement for beta-catenin in anterior-posterior axis formation in mice. *J Cell Biol* 148:567-78.
- Hutchinson. 1886. Case of congenital absence of hair, with atrophic condition of the skin and its appendages, in a boy whose a mother had been almost wholly bald from *alopecia areata* from the edge of six. *Lancet* I.
- Hutchison, C.J. 2002. Lamins: building blocks or regulators of gene expression? *Nat Rev Mol Cell Biol* 3:848-58.
- Hutchison, C.J., and H.J. Worman. 2004. A-type lamins: guardians of the soma? *Nat Cell Biol* 6:1062-7.
- Hyder, C.L., H.M. Pallari, V. Kochin, and J.E. Eriksson. 2008. Providing cellular signposts--post-translational modifications of intermediate filaments. *FEBS Lett* 582:2140-8.
- Ichida, J.K., J. Blanchard, K. Lam, E.Y. Son, J.E. Chung, D. Egli, K.M. Loh, A.C. Carter, F.P. Di Giorgio, K. Koszka, D. Huangfu, H. Akutsu, D.R. Liu, L.L. Rubin, and K. Eggan. 2009. A small-molecule inhibitor of *tgf-Beta* signaling replaces *sox2* in reprogramming by inducing *nanog*. *Cell Stem Cell* 5:491-503.
- Ilagan, R., R. Abu-Issa, D. Brown, Y.P. Yang, K. Jiao, R.J. Schwartz, J. Klingensmith, and E.N. Meyers. 2006. *Fgf8* is required for anterior heart field development. *Development* 133:2435-45.
- Ishimura, A., S. Chida, and S. Osada. 2008. *Man1*, an inner nuclear membrane protein, regulates left-right axis formation by controlling nodal signaling in a node-independent manner. *Dev Dyn* 237:3565-76.
- Ivorra, C., M. Kubicek, J.M. Gonzalez, S.M. Sanz-Gonzalez, A. Alvarez-Barrientos, J.E.

BIBLIOGRAPHIE

- O'Connor, B. Burke, and V. Andres. 2006. A mechanism of AP-1 suppression through interaction of c-Fos with lamin A/C. *Genes Dev* 20:307-20.
- Jackson, S.N., J. Pinkney, A. Bargiotta, C.D. Veal, T.A. Howlett, P.G. McNally, R. Corral, A. Johnson, and R.C. Trembath. 1998. A defect in the regional deposition of adipose tissue (partial lipodystrophy) is encoded by a gene at chromosome 1q. *Am J Hum Genet* 63:534-40.
- Jahn, D., S. Schramm, M. Schnolzer, C.J. Heilmann, C.G. de Koster, W. Schutz, R. Benavente, and M. Alsheimer. 2012. A truncated lamin A in the *Lmna* (-/-) mouse line: Implications for the understanding of laminopathies. *Nucleus* 3.
- Jedrussik, A., D.E. Parfitt, G. Guo, M. Skamagki, J.B. Grabarek, M.H. Johnson, P. Robson, and M. Zernicka-Goetz. 2008. Role of Cdx2 and cell polarity in cell allocation and specification of trophectoderm and inner cell mass in the mouse embryo. *Genes Dev* 22:2692-706.
- Johnson, B.R., R.T. Nitta, R.L. Frock, L. Mounkes, D.A. Barbie, C.L. Stewart, E. Harlow, and B.K. Kennedy. 2004. A-type lamins regulate retinoblastoma protein function by promoting subnuclear localization and preventing proteasomal degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:9677-82.
- Johnson, M.H., and C.A. Ziomek. 1981. The foundation of two distinct cell lineages within the mouse morula. *Cell* 24:71-80.
- Kanatsu-Shinohara, M., K. Inoue, J. Lee, M. Yoshimoto, N. Ogonuki, H. Miki, S. Baba, T. Kato, Y. Kazuki, S. Toyokuni, M. Toyoshima, O. Niwa, M. Oshimura, T. Heike, T. Nakahata, F. Ishino, A. Ogura, and T. Shinohara. 2004. Generation of pluripotent stem cells from neonatal mouse testis. *Cell* 119:1001-12.
- Karabinos, A., J. Schunemann, M. Meyer, U. Aebi, and K. Weber. 2003. The single nuclear lamin of *Caenorhabditis elegans* forms in vitro stable intermediate filaments and paracrystals with a reduced axial periodicity. *J Mol Biol* 325:241-7.
- Kazuki, Y., M. Hiratsuka, M. Takiguchi, M. Osaki, N. Kajitani, H. Hoshiya, K. Hiramatsu, T. Yoshino, K. Kazuki, C. Ishihara, S. Takehara, K. Higaki, M. Nakagawa, K. Takahashi, S. Yamanaka, and M. Oshimura. 2010. Complete genetic correction of ips cells from Duchenne muscular dystrophy. *Mol Ther* 18:386-93.
- Kee, K., V.T. Angeles, M. Flores, H.N. Nguyen, and R.A. Reijo Pera. 2009. Human DAZL, DAZ and BOULE genes modulate primordial germ-cell and haploid gamete formation. *Nature* 462:222-5.
- Kehat, I., D. Kenyagin-Karsenti, M. Snir, H. Segev, M. Amit, A. Gepstein, E. Livne, O. Binah, J. Itskovitz-Eldor, and L. Gepstein. 2001. Human embryonic stem cells can differentiate into myocytes with structural and functional properties of cardiomyocytes. *J Clin Invest* 108:407-14.
- Kelley, J.B., S. Datta, C.J. Snow, M. Chatterjee, L. Ni, A. Spencer, C.S. Yang, C. Cubenas-Potts, M.J. Matunis, and B.M. Paschal. 2011. The defective nuclear lamina in Hutchinson-gilford progeria syndrome disrupts the nucleocytoplasmic Ran gradient and inhibits nuclear localization of Ubc9. *Mol Cell Biol* 31:3378-95.
- Kennedy, B.K., D.A. Barbie, M. Classon, N. Dyson, and E. Harlow. 2000. Nuclear organization of DNA replication in primary mammalian cells. *Genes Dev* 14:2855-68.
- Kimber, S.J., S.F. Sneddon, D.J. Bloor, A.M. El-Bareg, J.A. Hawkhead, A.D. Metcalfe, F.D. Houghton, H.J. Leese, A. Rutherford, B.A. Lieberman, and D.R. Brison. 2008. Expression of genes involved in early cell fate decisions in human embryos and their regulation by growth factors. *Reproduction* 135:635-47.

BIBLIOGRAPHIE

- Kitajima, S., A. Takagi, T. Inoue, and Y. Saga. 2000. MesP1 and MesP2 are essential for the development of cardiac mesoderm. *Development* 127:3215-26.
- Kress, C., S. Vandormael-Pournin, P. Baldacci, M. Cohen-Tannoudji, and C. Babinet. 1998. Nonpermissiveness for mouse embryonic stem (ES) cell derivation circumvented by a single backcross to 129/Sv strain: establishment of ES cell lines bearing the Omd conditional lethal mutation. *Mamm Genome* 9:998-1001.
- Krizhanovsky, V., and S.W. Lowe. 2009. Stem cells: The promises and perils of p53. *Nature* 460:1085-6.
- Krueger, W.H., L.C. Swanson, B. Tanasijevic, and T.P. Rasmussen. 2012. Natural and artificial routes to pluripotency. *Int J Dev Biol* 54:1545-64.
- Ku, N.O., P. Strnad, B.H. Zhong, G.Z. Tao, and M.B. Omary. 2007. Keratins let liver live: Mutations predispose to liver disease and crosslinking generates Mallory-Denk bodies. *Hepatology* 46:1639-49.
- Kubben, N., M. Adriaens, W. Meuleman, J.W. Voncken, B. van Steensel, and T. Misteli. 2012. Mapping of lamin A- and progerin-interacting genome regions. *Chromosoma* 121:447-64.
- Kurotaki, Y., K. Hatta, K. Nakao, Y. Nabeshima, and T. Fujimori. 2007. Blastocyst axis is specified independently of early cell lineage but aligns with the ZP shape. *Science* 316:719-23.
- Kwon, C., L. Qian, P. Cheng, V. Nigam, J. Arnold, and D. Srivastava. 2009. A regulatory pathway involving Notch1/beta-catenin/Isl1 determines cardiac progenitor cell fate. *Nat Cell Biol* 11:951-7.
- Laflamme, M.A., and C.E. Murry. 2012. Heart regeneration. *Nature* 473:326-35.
- Laforest, B., and M. Nemer. 2011. GATA5 interacts with GATA4 and GATA6 in outflow tract development. *Dev Biol* 358:368-78.
- Lahti, A.L., V.J. Kujala, H. Chapman, A.P. Koivisto, M. Pekkanen-Mattila, E. Kerkela, J. Hyttinen, K. Kontula, H. Swan, B.R. Conklin, S. Yamanaka, O. Silvennoinen, and K. Aalto-Setälä. 2012. Model for long QT syndrome type 2 using human iPS cells demonstrates arrhythmogenic characteristics in cell culture. *Dis Model Mech* 5:220-30.
- Lammerding, J., P.C. Schulze, T. Takahashi, S. Kozlov, T. Sullivan, R.D. Kamm, C.L. Stewart, and R.T. Lee. 2004. Lamin A/C deficiency causes defective nuclear mechanics and mechanotransduction. *J Clin Invest* 113:370-8.
- Larue, L., M. Ohsugi, J. Hirchenhain, and R. Kemler. 1994. E-cadherin null mutant embryos fail to form a trophectoderm epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:8263-7.
- Lavine, K.J., K. Yu, A.C. White, X. Zhang, C. Smith, J. Partanen, and D.M. Ornitz. 2005. Endocardial and epicardial derived FGF signals regulate myocardial proliferation and differentiation in vivo. *Dev Cell* 8:85-95.
- Lazarides, E. 1980. Intermediate filaments as mechanical integrators of cellular space. *Nature* 283:249-256.
- Lee, G., E.P. Papapetrou, H. Kim, S.M. Chambers, M.J. Tomishima, C.A. Fasano, Y.M. Ganat, J. Menon, F. Shimizu, A. Viale, V. Tabar, M. Sadelain, and L. Studer. 2009. Modelling pathogenesis and treatment of familial dysautonomia using patient-specific iPSCs. *Nature* 461:402-6.
- Lee, J., H.K. Kim, J.Y. Rho, Y.M. Han, and J. Kim. 2006. The human OCT-4 isoforms differ in their ability to confer self-renewal. *J Biol Chem* 281:33554-65.

BIBLIOGRAPHIE

- Lee, M.S., and R. Craigie. 1998. A previously unidentified host protein protects retroviral DNA from autointegration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:1528-33.
- Lehner, C.F., G. Furstenberger, H.M. Eppenberger, and E.A. Nigg. 1986. Biogenesis of the nuclear lamina: in vivo synthesis and processing of nuclear protein precursors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83:2096-9.
- Li, F., X. Wang, P.C. Bunger, and A.M. Gerdes. 1997. Formation of binucleated cardiac myocytes in rat heart: I. Role of actin-myosin contractile ring. *J Mol Cell Cardiol* 29:1541-51.
- Li, L., and T. Xie. 2005. Stem cell niche: structure and function. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21:605-31.
- Lin, B., J. Kim, Y. Li, H. Pan, X. Carvajal-Vergara, G. Salama, T. Cheng, Y. Li, C.W. Lo, and L. Yang. 2012. High-purity enrichment of functional cardiovascular cells from human iPSCs. *Cardiovasc Res* 95:327-35.
- Lin, F., and H.J. Worman. 1993. Structural organization of the human gene encoding nuclear lamin A and nuclear lamin C. *J Biol Chem* 268:16321-6.
- Lin, F., J.M. Morrison, W. Wu, and H.J. Worman. 2005. MAN1, an integral protein of the inner nuclear membrane, binds Smad2 and Smad3 and antagonizes transforming growth factor-beta signaling. *Hum Mol Genet* 14:437-45.
- Lin, Q., J. Schwarz, C. Bucana, and E.N. Olson. 1997. Control of mouse cardiac morphogenesis and myogenesis by transcription factor MEF2C. *Science* 276:1404-7.
- Lindsley, R.C., J.G. Gill, T.L. Murphy, E.M. Langer, M. Cai, M. Mashayekhi, W. Wang, N. Niwa, J.M. Nerbonne, M. Kyba, and K.M. Murphy. 2008. *Mesp1* coordinately regulates cardiovascular fate restriction and epithelial-mesenchymal transition in differentiating ESCs. *Cell Stem Cell* 3:55-68.
- Lister, R., M. Pelizzola, Y.S. Kida, R.D. Hawkins, J.R. Nery, G. Hon, J. Antosiewicz-Bourget, R. O'Malley, R. Castanon, S. Klugman, M. Downes, R. Yu, R. Stewart, B. Ren, J.A. Thomson, R.M. Evans, and J.R. Ecker. 2011. Hotspots of aberrant epigenomic reprogramming in human induced pluripotent stem cells. *Nature* 471:68-73.
- Liu, G.H., B.Z. Barkho, S. Ruiz, D. Diep, J. Qu, S.L. Yang, A.D. Panopoulos, K. Suzuki, L. Kurian, C. Walsh, J. Thompson, S. Boue, H.L. Fung, I. Sancho-Martinez, K. Zhang, J. Yates, 3rd, and J.C. Izpisua Belmonte. 2011. Recapitulation of premature ageing with iPSCs from Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Nature* 472:221-5.
- Liu, W., and A.C. Foley. 2010. Signaling pathways in early cardiac development. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* 3:191-205.
- Loh, Y.H., S. Agarwal, I.H. Park, A. Urbach, H. Huo, G.C. Heffner, K. Kim, J.D. Miller, K. Ng, and G.Q. Daley. 2009. Generation of induced pluripotent stem cells from human blood. *Blood* 113:5476-9.
- Lopez-Sanchez, C., V. Climent, G.C. Schoenwolf, I.S. Alvarez, and V. Garcia-Martinez. 2002. Induction of cardiogenesis by Hensen's node and fibroblast growth factors. *Cell Tissue Res* 309:237-49.
- Lough, J., and Y. Sugi. 2000. Endoderm and heart development. *Dev Dyn* 217:327-42.
- Lu, C.C., J. Brennan, and E.J. Robertson. 2001. From fertilization to gastrulation: axis formation in the mouse embryo. *Curr Opin Genet Dev* 11:384-92.
- Ludtke, A., J. Genschel, G. Brabant, J. Bauditz, M. Taupitz, M. Koch, W. Wermke, H.J. Worman, and H.H. Schmidt. 2005.

BIBLIOGRAPHIE

- Hepatic steatosis in Dunnigan-type familial partial lipodystrophy. *Am J Gastroenterol* 100:2218-24.
- Lyons, I., L.M. Parsons, L. Hartley, R. Li, J.E. Andrews, L. Robb, and R.P. Harvey. 1995. Myogenic and morphogenetic defects in the heart tubes of murine embryos lacking the homeo box gene *Nkx2-5*. *Genes Dev* 9:1654-66.
- Maatman, R., M. Gertsenstein, E. de Meijer, A. Nagy, and K. Vintersten. 2003. Aggregation of embryos and embryonic stem cells. *Methods Mol Biol* 209:201-30.
- Machiels, B.M., A.H. Zorenc, J.M. Endert, H.J. Kuijpers, G.J. van Eys, F.C. Ramaekers, and J.L. Broers. 1996. An alternative splicing product of the lamin A/C gene lacks exon 10. *J Biol Chem* 271:9249-53.
- Maherali, N., and K. Hochedlinger. 2009. Tgfbeta signal inhibition cooperates in the induction of iPSCs and replaces Sox2 and cMyc. *Curr Biol* 19:1718-23.
- Maltsev, V.A., J. Rohwedel, J. Hescheler, and A.M. Wobus. 1993. Embryonic stem cells differentiate in vitro into cardiomyocytes representing sinusnodal, atrial and ventricular cell types. *Mech Dev* 44:41-50.
- Mancini, M.A., B. Shan, J.A. Nickerson, S. Penman, and W.H. Lee. 1994. The retinoblastoma gene product is a cell cycle-dependent, nuclear matrix-associated protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:418-22.
- Margalit, A., A. Brachner, J. Gotzmann, R. Foisner, and Y. Gruenbaum. 2007. Barrier-to-autointegration factor--a BAFfling little protein. *Trends Cell Biol* 17:202-8.
- Markiewicz, E., T. Dechat, R. Foisner, R.A. Quinlan, and C.J. Hutchison. 2002. Lamin A/C binding protein LAP2alpha is required for nuclear anchorage of retinoblastoma protein. *Mol Biol Cell* 13:4401-13.
- Markiewicz, E., K. Tilgner, N. Barker, M. van de Wetering, H. Clevers, M. Dorobek, I. Hausmanowa-Petrusewicz, F.C. Ramaekers, J.L. Broers, W.M. Blankesteijn, G. Salpingidou, R.G. Wilson, J.A. Ellis, and C.J. Hutchison. 2006. The inner nuclear membrane protein emerin regulates beta-catenin activity by restricting its accumulation in the nucleus. *Embo J* 25:3275-85.
- Maro, B., M.H. Johnson, S.J. Pickering, and G. Flach. 1984. Changes in actin distribution during fertilization of the mouse egg. *J Embryol Exp Morphol* 81:211-37.
- Marques, S., A.C. Borges, A.C. Silva, S. Freitas, M. Cordenonsi, and J.A. Belo. 2004. The activity of the Nodal antagonist Cerl-2 in the mouse node is required for correct L/R body axis. *Genes Dev* 18:2342-7.
- Marson, A., R. Foreman, B. Chevalier, S. Bilodeau, M. Kahn, R.A. Young, and R. Jaenisch. 2008. Wnt signaling promotes reprogramming of somatic cells to pluripotency. *Cell Stem Cell* 3:132-5.
- Martin, G.R. 1975. Teratocarcinomas as a model system for the study of embryogenesis and neoplasia. *Cell* 5:229-43.
- Martin, G.R. 1981. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78:7634-8.
- Martinez, Y., F. Bena, S. Gimelli, D. Tirefort, M. Dubois-Dauphin, K.H. Krause, and O. Preynat-Seauve. 2012. Cellular diversity within embryonic stem cells: pluripotent clonal sublines show distinct differentiation potential. *J Cell Mol Med* 16:456-67.
- Marvin, M.J., G. Di Rocco, A. Gardiner, S.M. Bush, and A.B. Lassar. 2001. Inhibition of Wnt activity induces heart formation from posterior mesoderm. *Genes Dev* 15:316-27.

BIBLIOGRAPHIE

- Maske, C.P., M.S. Hollinshead, N.C. Higbee, M.O. Bergo, S.G. Young, and D.J. Vaux. 2003. A carboxyl-terminal interaction of lamin B1 is dependent on the CAAX endoprotease Rce1 and carboxymethylation. *J Cell Biol* 162:1223-32.
- Massague, J. 2000. How cells read TGF-beta signals. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1:169-78.
- Matsui, H., K. Ikeda, K. Nakatani, M. Sakabe, T. Yamagishi, T. Nakanishi, and Y. Nakajima. 2005. Induction of initial cardiomyocyte alpha-actin--smooth muscle alpha-actin--in cultured avian pregastrula epiblast: a role for nodal and BMP antagonist. *Dev Dyn* 233:1419-29.
- Mattout, A., M. Goldberg, Y. Tzur, A. Margalit, and Y. Gruenbaum. 2007. Specific and conserved sequences in *D. melanogaster* and *C. elegans* lamins and histone H2A mediate the attachment of lamins to chromosomes. *J Cell Sci* 120:77-85.
- McCulloch, E.A., and J.E. Till. 1960. The radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells, determined by quantitative marrow transplantation into irradiated mice. *Radiat Res* 13:115-25.
- McCulloch, E.A., and J.E. Till. 2005. Perspectives on the properties of stem cells. *Nat Med* 11:1026-8.
- McDonald, O.G., H. Wu, W. Timp, A. Doi, and A.P. Feinberg. 2012. Genome-scale epigenetic reprogramming during epithelial-to-mesenchymal transition. *Nat Struct Mol Biol* 18:867-74.
- McKeon, F.D., M.W. Kirschner, and D. Caput. 1986. Homologies in both primary and secondary structure between nuclear envelope and intermediate filament proteins. *Nature* 319:463-8.
- Meaburn, K.J., E. Cabuy, G. Bonne, N. Levy, G.E. Morris, G. Novelli, I.R. Kill, and J.M. Bridger. 2007. Primary laminopathy fibroblasts display altered genome organization and apoptosis. *Aging Cell* 6:139-53.
- Meissner, A., T.S. Mikkelsen, H. Gu, M. Wernig, J. Hanna, A. Sivachenko, X. Zhang, B.E. Bernstein, C. Nusbaum, D.B. Jaffe, A. Gnirke, R. Jaenisch, and E.S. Lander. 2008. Genome-scale DNA methylation maps of pluripotent and differentiated cells. *Nature* 454:766-70.
- Melcer, S., Y. Gruenbaum, and G. Krohne. 2007. Invertebrate lamins. *Exp Cell Res* 313:2157-66.
- Melcer, S., H. Hezroni, E. Rand, M. Nissim-Rafinia, A. Skoultchi, C.L. Stewart, M. Bustin, and E. Meshorer. 2012. Histone modifications and lamin A regulate chromatin protein dynamics in early embryonic stem cell differentiation. *Nat Commun* 3:910.
- Melcon, G., S. Kozlov, D.A. Cutler, T. Sullivan, L. Hernandez, P. Zhao, S. Mitchell, G. Nader, M. Bakay, J.N. Rottman, E.P. Hoffman, and C.L. Stewart. 2006. Loss of emerin at the nuclear envelope disrupts the Rb1/E2F and MyoD pathways during muscle regeneration. *Hum Mol Genet* 15:637-51.
- Merideth, M.A., L.B. Gordon, S. Clauss, V. Sachdev, A.C. Smith, M.B. Perry, C.C. Brewer, C. Zalewski, H.J. Kim, B. Solomon, B.P. Brooks, L.H. Gerber, M.L. Turner, D.L. Domingo, T.C. Hart, J. Graf, J.C. Reynolds, A. Gropman, J.A. Yanovski, M. Gerhard-Herman, F.S. Collins, E.G. Nabel, R.O. Cannon, 3rd, W.A. Gahl, and W.J. Inrone. 2008. Phenotype and course of Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *N Engl J Med* 358:592-604.
- Meshorer, E., D. Yellajoshula, E. George, P.J. Scambler, D.T. Brown, and T. Misteli. 2006. Hyperdynamic plasticity of chromatin proteins in pluripotent embryonic stem cells. *Dev Cell* 10:105-16.

BIBLIOGRAPHIE

- Mesnard, D., M. Guzman-Ayala, and D.B. Constam. 2006. Nodal specifies embryonic visceral endoderm and sustains pluripotent cells in the epiblast before overt axial patterning. *Development* 133:2497-505.
- Messing, A., and M. Brenner. 2003. GFAP: functional implications gleaned from studies of genetically engineered mice. *Glia* 43:87-90.
- Mikkelsen, T.S., J. Hanna, X. Zhang, M. Ku, M. Wernig, P. Schorderet, B.E. Bernstein, R. Jaenisch, E.S. Lander, and A. Meissner. 2008. Dissecting direct reprogramming through integrative genomic analysis. *Nature* 454:49-55.
- Mishina, Y., A. Suzuki, N. Ueno, and R.R. Behringer. 1995. Bmpr encodes a type I bone morphogenetic protein receptor that is essential for gastrulation during mouse embryogenesis. *Genes Dev* 9:3027-37.
- Mishina, Y., M.C. Hanks, S. Miura, M.D. Tallquist, and R.R. Behringer. 2002. Generation of Bmpr/Alk3 conditional knockout mice. *Genesis* 32:69-72.
- Mislow, J.M., J.M. Holaska, M.S. Kim, K.K. Lee, M. Segura-Totten, K.L. Wilson, and E.M. McNally. 2002. Nesprin-1alpha self-associates and binds directly to emerin and lamin A in vitro. *FEBS Lett* 525:135-40.
- Mitsui, K., Y. Tokuzawa, H. Itoh, K. Segawa, M. Murakami, K. Takahashi, M. Maruyama, M. Maeda, and S. Yamanaka. 2003. The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell* 113:631-42.
- Moir, R.D., M. Montag-Lowy, and R.D. Goldman. 1994. Dynamic properties of nuclear lamins: lamin B is associated with sites of DNA replication. *J Cell Biol* 125:1201-12.
- Moir, R.D., T.P. Spann, H. Herrmann, and R.D. Goldman. 2000. Disruption of nuclear lamin organization blocks the elongation phase of DNA replication. *J Cell Biol* 149:1179-92.
- Molkentin, J.D., Q. Lin, S.A. Duncan, and E.N. Olson. 1997. Requirement of the transcription factor GATA4 for heart tube formation and ventral morphogenesis. *Genes Dev* 11:1061-72.
- Montes de Oca, R., P.R. Andreassen, and K.L. Wilson. 2011. Barrier-to-Autointegration Factor influences specific histone modifications. *Nucleus* 2:580-90.
- Moretti, A., M. Bellin, A. Welling, C.B. Jung, J.T. Lam, L. Bott-Flugel, T. Dorn, A. Goedel, C. Hohnke, F. Hofmann, M. Seyfarth, D. Sinnecker, A. Schomig, and K.L. Laugwitz. 2010. Patient-specific induced pluripotent stem-cell models for long-QT syndrome. *N Engl J Med* 363:1397-409.
- Mori, A.D., Y. Zhu, I. Vahora, B. Nieman, K. Koshiba-Takeuchi, L. Davidson, A. Pizard, J.G. Seidman, C.E. Seidman, X.J. Chen, R.M. Henkelman, and B.G. Bruneau. 2006. Tbx5-dependent rheostatic control of cardiac gene expression and morphogenesis. *Dev Biol* 297:566-86.
- Mou, H., R. Zhao, R. Sherwood, T. Ahfeldt, A. Lapey, J. Wain, L. Sicilian, K. Izvolsky, K. Musunuru, C. Cowan, and J. Rajagopal. 2012. Generation of multipotent lung and airway progenitors from mouse ESCs and patient-specific cystic fibrosis iPSCs. *Cell Stem Cell* 10:385-97.
- Mounkes, L.C., S.V. Kozlov, J.N. Rottman, and C.L. Stewart. 2005. Expression of an LMNA-N195K variant of A-type lamins results in cardiac conduction defects and death in mice. *Hum Mol Genet* 14:2167-80.
- Muchir, A., J. Shan, G. Bonne, S.E. Lehnart, and H.J. Worman. 2009. Inhibition of extracellular signal-regulated kinase signaling to prevent cardiomyopathy caused by mutation in the gene encoding A-type lamins. *Hum Mol Genet* 18:241-7.

BIBLIOGRAPHIE

- Muchir, A., P. Pavlidis, V. Decostre, A.J. Herron, T. Arimura, G. Bonne, and H.J. Worman. 2007. Activation of MAPK pathways links LMNA mutations to cardiomyopathy in Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *J Clin Invest* 117:1282-93.
- Muchir, A., W. Wu, J.C. Choi, S. Iwata, J. Morrow, S. Homma, and H.J. Worman. 2012a. Abnormal p38alpha mitogen-activated protein kinase signaling in dilated cardiomyopathy caused by lamin A/C gene mutation. *Hum Mol Genet* 21:4325-33.
- Muchir, A., S.A. Reilly, W. Wu, S. Iwata, S. Homma, G. Bonne, and H.J. Worman. 2012b. Treatment with selumetinib preserves cardiac function and improves survival in cardiomyopathy caused by mutation in the lamin A/C gene. *Cardiovasc Res* 93:311-9.
- Mummery, C., D. Ward-van Oostwaard, P. Doevendans, R. Spijker, S. van den Brink, R. Hassink, M. van der Heyden, T. Opthof, M. Pera, A.B. de la Riviere, R. Passier, and L. Tertoolen. 2003. Differentiation of human embryonic stem cells to cardiomyocytes: role of coculture with visceral endoderm-like cells. *Circulation* 107:2733-40.
- Mummery, C.L., J. Zhang, E.S. Ng, D.A. Elliott, A.G. Elefanty, and T.J. Kamp. 2012. Differentiation of human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells to cardiomyocytes: a methods overview. *Circ Res* 111:344-58.
- Muralikrishna, B., J. Dhawan, N. Rangaraj, and V.K. Parnaik. 2001. Distinct changes in intranuclear lamin A/C organization during myoblast differentiation. *J Cell Sci* 114:4001-11.
- Naetar, N., B. Korbei, S. Kozlov, M.A. Kerényi, D. Dorner, R. Kral, I. Gotic, P. Fuchs, T.V. Cohen, R. Bittner, C.L. Stewart, and R. Foisner. 2008. Loss of nucleoplasmic LAP2alpha-lamin A complexes causes erythroid and epidermal progenitor hyperproliferation. *Nat Cell Biol* 10:1341-8.
- Nagano, A., R. Koga, M. Ogawa, Y. Kurano, J. Kawada, R. Okada, Y.K. Hayashi, T. Tsukahara, and K. Arahata. 1996. Emerin deficiency at the nuclear membrane in patients with Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Nat Genet* 12:254-9.
- Naito, A.T., I. Shiojima, H. Akazawa, K. Hidaka, T. Morisaki, A. Kikuchi, and I. Komuro. 2006. Developmental stage-specific biphasic roles of Wnt/beta-catenin signaling in cardiomyogenesis and hematopoiesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:19812-7.
- Nakagawa, M., M. Koyanagi, K. Tanabe, K. Takahashi, T. Ichisaka, T. Aoi, K. Okita, Y. Mochizuki, N. Takizawa, and S. Yamanaka. 2008. Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat Biotechnol* 26:101-6.
- Nascone, N., and M. Mercola. 1995. An inductive role for the endoderm in *Xenopus* cardiogenesis. *Development* 121:515-23.
- Nelson, T.J., A. Martinez-Fernandez, S. Yamada, A.A. Mael, A. Terzic, and Y. Ikeda. 2009. Induced pluripotent reprogramming from promiscuous human stemness related factors. *Clin Transl Sci* 2:118-26.
- Neumuller, R.A., and J.A. Knoblich. 2009. Dividing cellular asymmetry: asymmetric cell division and its implications for stem cells and cancer. *Genes Dev* 23:2675-99.
- Nichols, J., and A. Smith. 2009. Naive and primed pluripotent states. *Cell Stem Cell* 4:487-92.
- Nichols, J., B. Zevnik, K. Anastasiadis, H. Niwa, D. Klewe-Nebenius, I. Chambers, H. Scholer, and A. Smith. 1998. Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell* 95:379-91.

BIBLIOGRAPHIE

- Nielsen, S.J., R. Schneider, U.M. Bauer, A.J. Bannister, A. Morrison, D. O'Carroll, R. Firestein, M. Cleary, T. Jenuwein, R.E. Herrera, and T. Kouzarides. 2001. Rb targets histone H3 methylation and HP1 to promoters. *Nature* 412:561-5.
- Nigg, E.A. 1992. Assembly and cell cycle dynamics of the nuclear lamina. *Semin Cell Biol* 3:245-53.
- Nijmeijer, R.M., J.W. Leeuwis, A. DeLisio, C.L. Mummery, and S.M. Chuva de Sousa Lopes. 2009. Visceral endoderm induces specification of cardiomyocytes in mice. *Stem Cell Res* 3:170-8.
- Nishioka, N., S. Yamamoto, H. Kiyonari, H. Sato, A. Sawada, M. Ota, K. Nakao, and H. Sasaki. 2008. Tead4 is required for specification of trophectoderm in pre-implantation mouse embryos. *Mech Dev* 125:270-83.
- Niwa, H. 2007. How is pluripotency determined and maintained? *Development* 134:635-46.
- Niwa, H., J. Miyazaki, and A.G. Smith. 2000. Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat Genet* 24:372-6.
- Niwa, H., Y. Toyooka, D. Shimosato, D. Strumpf, K. Takahashi, R. Yagi, and J. Rossant. 2005. Interaction between Oct3/4 and Cdx2 determines trophectoderm differentiation. *Cell* 123:917-29.
- Okita, K., T. Ichisaka, and S. Yamanaka. 2007. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* 448:313-7.
- Olins, A.L., and D.E. Olins. 2004. Cytoskeletal influences on nuclear shape in granulocytic HL-60 cells. *BMC Cell Biol* 5:30.
- Onder, T.T., and G.Q. Daley. 2012. New lessons learned from disease modeling with induced pluripotent stem cells. *Curr Opin Genet Dev*.
- Osafune, K., L. Caron, M. Borowiak, R.J. Martinez, C.S. Fitz-Gerald, Y. Sato, C.A. Cowan, K.R. Chien, and D.A. Melton. 2008. Marked differences in differentiation propensity among human embryonic stem cell lines. *Nat Biotechnol* 26:313-5.
- Ostlund, C., G. Bonne, K. Schwartz, and H.J. Worman. 2001. Properties of lamin A mutants found in Emery-Dreifuss muscular dystrophy, cardiomyopathy and Dunnigan-type partial lipodystrophy. *J Cell Sci* 114:4435-45.
- Ostlund, C., E.S. Folker, J.C. Choi, E.R. Gomes, G.G. Gundersen, and H.J. Worman. 2009. Dynamics and molecular interactions of linker of nucleoskeleton and cytoskeleton (LINC) complex proteins. *J Cell Sci* 122:4099-108.
- Ottaviani, A., S. Rival-Gervier, A. Boussouar, A.M. Foerster, D. Rondier, S. Sacconi, C. Desnuelle, E. Gilson, and F. Magdinier. 2009a. The D4Z4 macrosatellite repeat acts as a CTCF and A-type lamins-dependent insulator in facio-scapulo-humeral dystrophy. *PLoS Genet* 5:e1000394.
- Ottaviani, A., C. Schluth-Bolard, S. Rival-Gervier, A. Boussouar, D. Rondier, A.M. Foerster, J. Morere, S. Bauwens, S. Gazzo, E. Callet-Bauchu, E. Gilson, and F. Magdinier. 2009b. Identification of a perinuclear positioning element in human subtelomeres that requires A-type lamins and CTCF. *Embo J* 28:2428-36.
- Ozaki, T., M. Saijo, K. Murakami, H. Enomoto, Y. Taya, and S. Sakiyama. 1994. Complex formation between lamin A and the retinoblastoma gene product: identification of the domain on lamin A required for its interaction. *Oncogene* 9:2649-53.
- Paddy, M.R., A.S. Belmont, H. Saumweber, D.A. Agard, and J.W. Sedat. 1990. Interphase

BIBLIOGRAPHIE

- nuclear envelope lamins form a discontinuous network that interacts with only a fraction of the chromatin in the nuclear periphery. *Cell* 62:89-106.
- Paige, S.L., T. Osugi, O.K. Afanasiev, L. Pabon, H. Reinecke, and C.E. Murry. 2012. Endogenous Wnt/beta-catenin signaling is required for cardiac differentiation in human embryonic stem cells. *PLoS One* 5:e11134.
- Pajerowski, J.D., K.N. Dahl, F.L. Zhong, P.J. Sammak, and D.E. Discher. 2007. Physical plasticity of the nucleus in stem cell differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:15619-24.
- Pallari, H.M., and J.E. Eriksson. 2006. Intermediate filaments as signaling platforms. *Sci STKE* 2006:pe53.
- Pandur, P., M. Lasche, L.M. Eisenberg, and M. Kuhl. 2002. Wnt-11 activation of a non-canonical Wnt signalling pathway is required for cardiogenesis. *Nature* 418:636-41.
- Papadimou, E., C. Menard, C. Grey, and M. Puceat. 2005. Interplay between the retinoblastoma protein and LEK1 specifies stem cells toward the cardiac lineage. *Embo J* 24:1750-61.
- Pappas, G.D. 1956a. The fine structure of the nuclear envelope of *Amoeba proteus*. *J Biophys Biochem Cytol* 2:431-4.
- Pappas, G.D. 1956b. Helical structures in the nucleus of *Amoeba proteus*. *J Biophys Biochem Cytol* 2:221-2.
- Park, I.H., R. Zhao, J.A. West, A. Yabuuchi, H. Huo, T.A. Ince, P.H. Lerou, M.W. Lensch, and G.Q. Daley. 2008. Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. *Nature* 451:141-6.
- Parry, D.A., J.F. Conway, and P.M. Steinert. 1986. Structural studies on lamin. Similarities and differences between lamin and intermediate-filament proteins. *Biochem J* 238:305-8.
- Pendas, A.M., Z. Zhou, J. Cadinanos, J.M. Freije, J. Wang, K. Hultenby, A. Astudillo, A. Wernerson, F. Rodriguez, K. Tryggvason, and C. Lopez-Otin. 2002. Defective prelamin A processing and muscular and adipocyte alterations in *Zmpste24* metalloproteinase-deficient mice. *Nat Genet* 31:94-9.
- Pera, M.F., and P.P. Tam. 2010. Extrinsic regulation of pluripotent stem cells. *Nature* 465:713-20.
- Perez-Terzic, C., A. Behfar, A. Mery, J.M. van Deursen, A. Terzic, and M. Puceat. 2003. Structural adaptation of the nuclear pore complex in stem cell-derived cardiomyocytes. *Circ Res* 92:444-52.
- Pfaffl, M.W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29:e45.
- Plusa, B., A. Piliszek, S. Frankenberg, J. Artus, and A.K. Hadjantonakis. 2008. Distinct sequential cell behaviours direct primitive endoderm formation in the mouse blastocyst. *Development* 135:3081-91.
- Prall, O.W., M.K. Menon, M.J. Solloway, Y. Watanabe, S. Zaffran, F. Bajolle, C. Biben, J.J. McBride, B.R. Robertson, H. Chaulet, F.A. Stennard, N. Wise, D. Schaft, O. Wolstein, M.B. Furtado, H. Shiratori, K.R. Chien, H. Hamada, B.L. Black, Y. Saga, E.J. Robertson, M.E. Buckingham, and R.P. Harvey. 2007. An *Nkx2-5/Bmp2/Smad1* negative feedback loop controls heart progenitor specification and proliferation. *Cell* 128:947-59.
- Puceat, M. 2007. TGFbeta in the differentiation of embryonic stem cells. *Cardiovasc Res* 74:256-61.
- Quijano-Roy, S., B. Mbieleu, C.G. Bonnemann, P.Y. Jeannot, J. Colomer, N.F. Clarke, J.M. Cuisset, H. Roper, L. De Meirleir, A.

BIBLIOGRAPHIE

- D'Amico, R. Ben Yaou, A. Nascimento, A. Barois, L. Demay, E. Bertini, A. Ferreira, C.A. Sewry, N.B. Romero, M. Ryan, F. Muntoni, P. Guicheney, P. Richard, G. Bonne, and B. Estournet. 2008. De novo LMNA mutations cause a new form of congenital muscular dystrophy. *Ann Neurol* 64:177-86.
- Raffaele Di Barletta, M., E. Ricci, G. Galluzzi, P. Tonali, M. Mora, L. Morandi, A. Romorini, T. Voit, K.H. Orstavik, L. Merlini, C. Trevisan, V. Biancalana, I. Housmanowa-Petrusewicz, S. Bione, R. Ricotti, K. Schwartz, G. Bonne, and D. Toniolo. 2000. Different mutations in the LMNA gene cause autosomal dominant and autosomal recessive Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Am J Hum Genet* 66:1407-12.
- Ralston, A., and J. Rossant. 2008. Cdx2 acts downstream of cell polarization to cell-autonomously promote trophoblast fate in the early mouse embryo. *Dev Biol* 313:614-29.
- Ramos, F.J., S.C. Chen, M.G. Garelick, D.F. Dai, C.Y. Liao, K.H. Schreiber, V.L. Mackay, E.H. An, R. Strong, W.C. Ladiges, P.S. Rabinovitch, M. Kaerberlein, and B.K. Kennedy. 2011. Rapamycin Reverses Elevated mTORC1 Signaling in Lamin A/C-Deficient Mice, Rescues Cardiac and Skeletal Muscle Function, and Extends Survival. *Sci Transl Med* 4:144ra103.
- Rao, L., D. Perez, and E. White. 1996. Lamin proteolysis facilitates nuclear events during apoptosis. *J Cell Biol* 135:1441-55.
- Rauner, M., W. Sipos, C. Goettsch, A. Wutzl, R. Foisner, P. Pietschmann, and L.C. Hofbauer. 2009. Inhibition of lamin A/C attenuates osteoblast differentiation and enhances RANKL-dependent osteoclastogenesis. *J Bone Miner Res* 24:78-86.
- Renou, L., S. Stora, R.B. Yaou, M. Volk, M. Sinkovec, L. Demay, P. Richard, B. Peterlin, and G. Bonne. 2008. Heart-hand syndrome of Slovenian type: a new kind of laminopathy. *J Med Genet* 45:666-71.
- Rober, R.A., K. Weber, and M. Osborn. 1989. Differential timing of nuclear lamin A/C expression in the various organs of the mouse embryo and the young animal: a developmental study. *Development* 105:365-78.
- Robinton, D.A., and G.Q. Daley. 2012. The promise of induced pluripotent stem cells in research and therapy. *Nature* 481:295-305.
- Rochais, F., K. Mesbah, and R.G. Kelly. 2009. Signaling pathways controlling second heart field development. *Circ Res* 104:933-42.
- Roche, E., P. Sepulcre, J.A. Reig, A. Santana, and B. Soria. 2005. Ectodermal commitment of insulin-producing cells derived from mouse embryonic stem cells. *Faseb J* 19:1341-3.
- Rohwedel, J., V. Maltsev, E. Bober, H.H. Arnold, J. Hescheler, and A.M. Wobus. 1994. Muscle cell differentiation of embryonic stem cells reflects myogenesis in vivo: developmentally regulated expression of myogenic determination genes and functional expression of ionic currents. *Dev Biol* 164:87-101.
- Rones, M.S., K.A. McLaughlin, M. Raffin, and M. Mercola. 2000. Serrate and Notch specify cell fates in the heart field by suppressing cardiomyogenesis. *Development* 127:3865-76.
- Rossant, J., and P.P. Tam. 2004. Emerging asymmetry and embryonic patterning in early mouse development. *Dev Cell* 7:155-64.
- Rossant, J., C. Chazaud, and Y. Yamanaka. 2003. Lineage allocation and asymmetries in the early mouse embryo. *Philos Trans R Soc*

BIBLIOGRAPHIE

- Lond B Biol Sci 358:1341-8; discussion 1349.
- Rout, M.P., J.D. Aitchison, A. Suprpto, K. Hjertaas, Y. Zhao, and B.T. Chait. 2000. The yeast nuclear pore complex: composition, architecture, and transport mechanism. *J Cell Biol* 148:635-51.
- Rowland, L.P., M. Fetell, M. Olarte, A. Hays, N. Singh, and F.E. Wanat. 1979. Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Ann Neurol* 5:111-7.
- Rusinol, A.E., and M.S. Sinensky. 2006. Farnesylated lamins, progeroid syndromes and farnesyl transferase inhibitors. *J Cell Sci* 119:3265-72.
- Sabatelli, P., G. Lattanzi, A. Ognibene, M. Columbaro, C. Capanni, L. Merlini, N.M. Maraldi, and S. Squarzone. 2001. Nuclear alterations in autosomal-dominant Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Muscle Nerve* 24:826-9.
- Saga, Y., S. Miyagawa-Tomita, A. Takagi, S. Kitajima, J. Miyazaki, and T. Inoue. 1999. MesP1 is expressed in the heart precursor cells and required for the formation of a single heart tube. *Development* 126:3437-47.
- Santos, F., B. Hendrich, W. Reik, and W. Dean. 2002. Dynamic reprogramming of DNA methylation in the early mouse embryo. *Dev Biol* 241:172-82.
- Scaffidi, P., and T. Misteli. 2005. Reversal of the cellular phenotype in the premature aging disease Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Nat Med* 11:440-5.
- Schneider, V.A., and M. Mercola. 2001. Wnt antagonism initiates cardiogenesis in *Xenopus laevis*. *Genes Dev* 15:304-15.
- Segura-Totten, M., A.K. Kowalski, R. Craigie, and K.L. Wilson. 2002. Barrier-to-autointegration factor: major roles in chromatin decondensation and nuclear assembly. *J Cell Biol* 158:475-85.
- Seki, T., S. Yuasa, M. Oda, T. Egashira, K. Yae, D. Kusumoto, H. Nakata, S. Tohyama, H. Hashimoto, M. Kodaira, Y. Okada, H. Seimiya, N. Fusaki, M. Hasegawa, and K. Fukuda. 2010. Generation of induced pluripotent stem cells from human terminally differentiated circulating T cells. *Cell Stem Cell* 7:11-4.
- Shimi, T., T. Koujin, M. Segura-Totten, K.L. Wilson, T. Haraguchi, and Y. Hiraoka. 2004. Dynamic interaction between BAF and emerin revealed by FRAP, FLIP, and FRET analyses in living HeLa cells. *J Struct Biol* 147:31-41.
- Shimi, T., K. Pflieger, S. Kojima, C.G. Pack, I. Solovei, A.E. Goldman, S.A. Adam, D.K. Shumaker, M. Kinjo, T. Cremer, and R.D. Goldman. 2008. The A- and B-type nuclear lamin networks: microdomains involved in chromatin organization and transcription. *Genes Dev* 22:3409-21.
- Shirayoshi, Y., T.S. Okada, and M. Takeichi. 1983. The calcium-dependent cell-cell adhesion system regulates inner cell mass formation and cell surface polarization in early mouse development. *Cell* 35:631-8.
- Silva, J., J. Nichols, T.W. Theunissen, G. Guo, A.L. van Oosten, O. Barrandon, J. Wray, S. Yamanaka, I. Chambers, and A. Smith. 2009. Nanog is the gateway to the pluripotent ground state. *Cell* 138:722-37.
- Sinkovec, M., D. Petrovic, M. Volk, and B. Peterlin. 2005. Familial progressive sinoatrial and atrioventricular conduction disease of adult onset with sudden death, dilated cardiomyopathy, and brachydactyly. A new type of heart-hand syndrome? *Clin Genet* 68:155-60.
- Solnica-Krezel, L., and D.S. Sepich. 2012. Gastrulation: Making and Shaping Germ Layers. *Annu Rev Cell Dev Biol*.

BIBLIOGRAPHIE

- Solter, D., and B.B. Knowles. 1978. Monoclonal antibody defining a stage-specific mouse embryonic antigen (SSEA-1). *Proc Natl Acad Sci U S A* 75:5565-9.
- Song, S., A. Landsbury, R. Dahm, Y. Liu, Q. Zhang, and R.A. Quinlan. 2009. Functions of the intermediate filament cytoskeleton in the eye lens. *J Clin Invest* 119:1837-48.
- Spann, T.P., A.E. Goldman, C. Wang, S. Huang, and R.D. Goldman. 2002. Alteration of nuclear lamin organization inhibits RNA polymerase II-dependent transcription. *J Cell Biol* 156:603-8.
- Srivastava, D. 2006. Making or breaking the heart: from lineage determination to morphogenesis. *Cell* 126:1037-48.
- Stadtfeld, M., M. Nagaya, J. Utikal, G. Weir, and K. Hochedlinger. 2008. Induced pluripotent stem cells generated without viral integration. *Science* 322:945-9.
- Stefanovic, S., and M. Puceat. 2007. Oct-3/4: not just a gatekeeper of pluripotency for embryonic stem cell, a cell fate instructor through a gene dosage effect. *Cell Cycle* 6:8-10.
- Stefanovic, S., N. Abboud, S. Desilets, D. Nury, C. Cowan, and M. Puceat. 2009. Interplay of Oct4 with Sox2 and Sox17: a molecular switch from stem cell pluripotency to specifying a cardiac fate. *J Cell Biol* 186:665-73.
- Stewart, C., and B. Burke. 1987. Teratocarcinoma stem cells and early mouse embryos contain only a single major lamin polypeptide closely resembling lamin B. *Cell* 51:383-92.
- Sugi, Y., and J. Lough. 1995. Activin-A and FGF-2 mimic the inductive effects of anterior endoderm on terminal cardiac myogenesis in vitro. *Dev Biol* 168:567-74.
- Sullivan, T., D. Escalante-Alcalde, H. Bhatt, M. Anver, N. Bhat, K. Nagashima, C.L. Stewart, and B. Burke. 1999. Loss of A-type lamin expression compromises nuclear envelope integrity leading to muscular dystrophy. *J Cell Biol* 147:913-20.
- Sun, X., E.N. Meyers, M. Lewandoski, and G.R. Martin. 1999. Targeted disruption of Fgf8 causes failure of cell migration in the gastrulating mouse embryo. *Genes Dev* 13:1834-46.
- Sun, Y., X. Liang, N. Najafi, M. Cass, L. Lin, C.L. Cai, J. Chen, and S.M. Evans. 2007. Islet 1 is expressed in distinct cardiovascular lineages, including pacemaker and coronary vascular cells. *Dev Biol* 304:286-96.
- Surani, M.A. 1999. Reprogramming a somatic nucleus by trans-modification activity in germ cells. *Semin Cell Dev Biol* 10:273-7.
- Surani, M.A. 2007. Germ cells: the eternal link between generations. *C R Biol* 330:474-8.
- Suzuki, Y., H. Yang, and R. Craigie. 2004. LAP2alpha and BAF collaborate to organize the Moloney murine leukemia virus preintegration complex. *Embo J* 23:4670-8.
- Tada, S., T. Era, C. Furusawa, H. Sakurai, S. Nishikawa, M. Kinoshita, K. Nakao, T. Chiba, and S. Nishikawa. 2005. Characterization of mesendoderm: a diverging point of the definitive endoderm and mesoderm in embryonic stem cell differentiation culture. *Development* 132:4363-74.
- Takahashi, K., and S. Yamanaka. 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126:663-76.
- Takahashi, K., K. Tanabe, M. Ohnuki, M. Narita, T. Ichisaka, K. Tomoda, and S. Yamanaka. 2007. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131:861-72.

BIBLIOGRAPHIE

- Takata, H., S. Uchiyama, N. Nakamura, S. Nakashima, S. Kobayashi, T. Sone, S. Kimura, S. Lahmers, H. Granzier, S. Labeit, S. Matsunaga, and K. Fukui. 2007. A comparative proteome analysis of human metaphase chromosomes isolated from two different cell lines reveals a set of conserved chromosome-associated proteins. *Genes Cells* 12:269-84.
- Takenaga, M., M. Fukumoto, and Y. Hori. 2007. Regulated Nodal signaling promotes differentiation of the definitive endoderm and mesoderm from ES cells. *J Cell Sci* 120:2078-90.
- Takeuchi, J.K., and B.G. Bruneau. 2009. Directed transdifferentiation of mouse mesoderm to heart tissue by defined factors. *Nature* 459:708-11.
- Tam, P.P., M. Parameswaran, S.J. Kinder, and R.P. Weinberger. 1997. The allocation of epiblast cells to the embryonic heart and other mesodermal lineages: the role of ingression and tissue movement during gastrulation. *Development* 124:1631-42.
- Tam, P.P., P.L. Khoo, S.L. Lewis, H. Bildsoe, N. Wong, T.E. Tsang, J.M. Gad, and L. Robb. 2007. Sequential allocation and global pattern of movement of the definitive endoderm in the mouse embryo during gastrulation. *Development* 134:251-60.
- Tam PPL, S.G. 1999. Cardiac fate map, lineage, allocation, morphogenic movement and cell commitment. *Heart Development*:3-18.
- Tanaka, M., Z. Chen, S. Bartunkova, N. Yamasaki, and S. Izumo. 1999. The cardiac homeobox gene *Csx/Nkx2.5* lies genetically upstream of multiple genes essential for heart development. *Development* 126:1269-80.
- Taniura, H., C. Glass, and L. Gerace. 1995. A chromatin binding site in the tail domain of nuclear lamins that interacts with core histones. *J Cell Biol* 131:33-44.
- Taylor, M.R., P.R. Fain, G. Sinagra, M.L. Robinson, A.D. Robertson, E. Carniel, A. Di Lenarda, T.J. Bohlmeier, D.A. Ferguson, G.L. Brodsky, M.M. Boucek, J. Lascor, A.C. Moss, W.L. Li, G.L. Stetler, F. Muntoni, M.R. Bristow, and L. Mestroni. 2003. Natural history of dilated cardiomyopathy due to lamin A/C gene mutations. *J Am Coll Cardiol* 41:771-80.
- Terami, H., K. Hidaka, T. Katsumata, A. Iio, and T. Morisaki. 2004. Wnt11 facilitates embryonic stem cell differentiation to Nkx2.5-positive cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 325:968-75.
- Tesar, P.J., J.G. Chenoweth, F.A. Brook, T.J. Davies, E.P. Evans, D.L. Mack, R.L. Gardner, and R.D. McKay. 2007. New cell lines from mouse epiblast share defining features with human embryonic stem cells. *Nature* 448:196-9.
- Thiery, J.P., H. Acloque, R.Y. Huang, and M.A. Nieto. 2009. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* 139:871-90.
- Thomas, K.R., and M.R. Capecchi. 1987. Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell* 51:503-12.
- Thomas, P.Q., A. Brown, and R.S. Beddington. 1998. Hex: a homeobox gene revealing peri-implantation asymmetry in the mouse embryo and an early transient marker of endothelial cell precursors. *Development* 125:85-94.
- Thomson, J.A., J. Itskovitz-Eldor, S.S. Shapiro, M.A. Waknitz, J.J. Swiergiel, V.S. Marshall, and J.M. Jones. 1998. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282:1145-7.
- Till, J.E., and E. McCulloch. 1961. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Res* 14:213-22.

BIBLIOGRAPHIE

- Tzur, Y.B., K.L. Wilson, and Y. Gruenbaum. 2006. SUN-domain proteins: 'Velcro' that links the nucleoskeleton to the cytoskeleton. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7:782-8.
- Uitto, J., G. Richard, and J.A. McGrath. 2007. Diseases of epidermal keratins and their linker proteins. *Exp Cell Res* 313:1995-2009.
- Van Berlo, J.H., J.W. Voncken, N. Kubben, J.L. Broers, R. Duisters, R.E. van Leeuwen, H.J. Crijns, F.C. Ramaekers, C.J. Hutchison, and Y.M. Pinto. 2005. A-type lamins are essential for TGF-beta1 induced PP2A to dephosphorylate transcription factors. *Hum Mol Genet* 14:2839-49.
- Van Vliet, P., S.M. Wu, S. Zaffran, and M. Puceat. 2012. Early cardiac development: a view from stem cells to embryos. *Cardiovasc Res*.
- van Wijk, B., A.F. Moorman, and M.J. van den Hoff. 2007. Role of bone morphogenetic proteins in cardiac differentiation. *Cardiovasc Res* 74:244-55.
- Vassar, R., P.A. Coulombe, L. Degenstein, K. Albers, and E. Fuchs. 1991. Mutant keratin expression in transgenic mice causes marked abnormalities resembling a human genetic skin disease. *Cell* 64:365-80.
- Vergnes, L., M. Peterfy, M.O. Bergo, S.G. Young, and K. Reue. 2004. Lamin B1 is required for mouse development and nuclear integrity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:10428-33.
- Verstraeten, V.L., J.L. Broers, F.C. Ramaekers, and M.A. van Steensel. 2007. The nuclear envelope, a key structure in cellular integrity and gene expression. *Curr Med Chem* 14:1231-48.
- Vigouroux, C. 2005. [Laminopathies: lipodystrophies, insulin resistance, syndromes of accelerated ageing... and others]. *Ann Endocrinol (Paris)* 66:270-8.
- Vigouroux, C., M. Auclair, E. Dubosclard, M. Pouchelet, J. Capeau, J.C. Courvalin, and B. Buendia. 2001. Nuclear envelope disorganization in fibroblasts from lipodystrophic patients with heterozygous R482Q/W mutations in the lamin A/C gene. *J Cell Sci* 114:4459-68.
- Vincent, S.D., and M.E. Buckingham. 2010. How to make a heart: the origin and regulation of cardiac progenitor cells. *Curr Top Dev Biol* 90:1-41.
- Vlcek, S., and R. Foisner. 2007. A-type lamin networks in light of laminopathic diseases. *Biochim Biophys Acta* 1773:661-74.
- Voeltz, G.K., M.M. Rolls, and T.A. Rapoport. 2002. Structural organization of the endoplasmic reticulum. *EMBO Rep* 3:944-50.
- Wang, Y., H. Zhang, Y. Chen, Y. Sun, F. Yang, W. Yu, J. Liang, L. Sun, X. Yang, L. Shi, R. Li, Y. Li, Y. Zhang, Q. Li, X. Yi, and Y. Shang. 2009. LSD1 is a subunit of the NuRD complex and targets the metastasis programs in breast cancer. *Cell* 138:660-72.
- Warren, L., P.D. Manos, T. Ahfeldt, Y.H. Loh, H. Li, F. Lau, W. Ebina, P.K. Mandal, Z.D. Smith, A. Meissner, G.Q. Daley, A.S. Brack, J.J. Collins, C. Cowan, T.M. Schlaeger, and D.J. Rossi. 2010. Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA. *Cell Stem Cell* 7:618-30.
- Watanabe, Y., H. Kokubo, S. Miyagawa-Tomita, M. Endo, K. Igarashi, K. Aisaki, J. Kanno, and Y. Saga. 2006. Activation of Notch1 signaling in cardiogenic mesoderm induces abnormal heart morphogenesis in mouse. *Development* 133:1625-34.
- Wernig, M., A. Meissner, R. Foreman, T. Brambrink, M. Ku, K. Hochedlinger, B.E. Bernstein, and R. Jaenisch. 2007. In vitro reprogramming of fibroblasts into a

BIBLIOGRAPHIE

- pluripotent ES-cell-like state. *Nature* 448:318-24.
- Wharton, K., and R. Derynck. 2009. TGFbeta family signaling: novel insights in development and disease. *Development* 136:3691-7.
- Wheeler, M.A., J.D. Davies, Q. Zhang, L.J. Emerson, J. Hunt, C.M. Shanahan, and J.A. Ellis. 2007. Distinct functional domains in nesprin-1alpha and nesprin-2beta bind directly to emerin and both interactions are disrupted in X-linked Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Exp Cell Res* 313:2845-57.
- Whitfield, A.G. 1961. Familial cardiomyopathy. *Q J Med* 30:119-34.
- Wiesel, N., A. Mattout, S. Melcer, N. Melamed-Book, H. Herrmann, O. Medalia, U. Aebi, and Y. Gruenbaum. 2008. Laminopathic mutations interfere with the assembly, localization, and dynamics of nuclear lamins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:180-5.
- Wilkinson, D.G., S. Bhatt, and B.G. Herrmann. 1990. Expression pattern of the mouse T gene and its role in mesoderm formation. *Nature* 343:657-9.
- Williams, M., C. Burdsal, A. Periasamy, M. Lewandoski, and A. Sutherland. 2012. Mouse primitive streak forms in situ by initiation of epithelial to mesenchymal transition without migration of a cell population. *Dev Dyn* 241:270-83.
- Woltjen, K., I.P. Michael, P. Mohseni, R. Desai, M. Mileikovsky, R. Hamalainen, R. Cowling, W. Wang, P. Liu, M. Gertsenstein, K. Kaji, H.K. Sung, and A. Nagy. 2009. piggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nature* 458:766-70.
- Worman, H.J., and G. Bonne. 2007. "Laminopathies": a wide spectrum of human diseases. *Exp Cell Res* 313:2121-33.
- Worman, H.J., C. Ostlund, and Y. Wang. 2010. Diseases of the nuclear envelope. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2:a000760.
- Worman, H.J., L.G. Fong, A. Muchir, and S.G. Young. 2009. Laminopathies and the long strange trip from basic cell biology to therapy. *J Clin Invest* 119:1825-36.
- Wu, W., A. Muchir, J. Shan, G. Bonne, and H.J. Worman. 2010. 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.
- Yagi, R., M.J. Kohn, I. Karavanova, K.J. Kaneko, D. Vullhorst, M.L. DePamphilis, and A. Buonanno. 2007. Transcription factor TEAD4 specifies the trophoderm lineage at the beginning of mammalian development. *Development* 134:3827-36.
- Yamanaka, S. 2010. Patient-specific pluripotent stem cells become even more accessible. *Cell Stem Cell* 7:1-2.
- Yamanaka, S., and H.M. Blau. 2010. Nuclear reprogramming to a pluripotent state by three approaches. *Nature* 465:704-12.
- Yang, L., M.H. Soonpaa, E.D. Adler, T.K. Roepke, S.J. Kattman, M. Kennedy, E. Henckaerts, K. Bonham, G.W. Abbott, R.M. Linden, L.J. Field, and G.M. Keller. 2008. Human cardiovascular progenitor cells develop from a KDR+ embryonic-stem-cell-derived population. *Nature* 453:524-8.
- Yasuhiko, Y., S. Kitajima, Y. Takahashi, M. Oginuma, H. Kagiwada, J. Kanno, and Y. Saga. 2008. Functional importance of evolutionally conserved Tbx6 binding sites in the presomitic mesoderm-specific enhancer of Mesp2. *Development* 135:3511-9.

BIBLIOGRAPHIE

- Yatskievych, T.A., A.N. Ladd, and P.B. Antin. 1997. Induction of cardiac myogenesis in avian pregastrula epiblast: the role of the hypoblast and activin. *Development* 124:2561-70.
- Ye, Q., and H.J. Worman. 1995. Protein-protein interactions between human nuclear lamins expressed in yeast. *Exp Cell Res* 219:292-8.
- Yoshida, Y., and S. Yamanaka. 2010. Recent stem cell advances: induced pluripotent stem cells for disease modeling and stem cell-based regeneration. *Circulation* 122:80-7.
- Young, J., L. Morbois-Trabut, B. Couzinet, O. Lascols, E. Dion, V. Bereziat, B. Feve, I. Richard, J. Capeau, P. Chanson, and C. Vigouroux. 2005. Type A insulin resistance syndrome revealing a novel lamin A mutation. *Diabetes* 54:1873-8.
- Young, L.W., J.F. Radebaugh, P. Rubin, J.A. Sensenbrenner, G. Fiorelli, and V.A. McKusick. 1971. New syndrome manifested by mandibular hypoplasia, acroosteolysis, stiff joints and cutaneous atrophy (mandibuloacral dysplasia) in two unrelated boys. *Birth Defects Orig Artic Ser* 7:291-7.
- Yu, J., M.A. Vodyanik, K. Smuga-Otto, J. Antosiewicz-Bourget, J.L. Frane, S. Tian, J. Nie, G.A. Jonsdottir, V. Ruotti, R. Stewart, Slukvin, II, and J.A. Thomson. 2007. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 318:1917-20.
- Zeineddine, D., E. Papadimou, K. Chebli, M. Gineste, J. Liu, C. Grey, S. Thurig, A. Behfar, V.A. Wallace, I.S. Skerjanc, and M. Puceat. 2006. Oct-3/4 dose dependently regulates specification of embryonic stem cells toward a cardiac lineage and early heart development. *Dev Cell* 11:535-46.
- Zhang, J., Q. Lian, G. Zhu, F. Zhou, L. Sui, C. Tan, R.A. Mutalif, R. Navasankari, Y. Zhang, H.F. Tse, C.L. Stewart, and A. Colman. 2011. A human iPSC model of Hutchinson Gilford Progeria reveals vascular smooth muscle and mesenchymal stem cell defects. *Cell Stem Cell* 8:31-45.
- Zhang, X.M., M. Ramalho-Santos, and A.P. McMahon. 2001. Smoothed mutants reveal redundant roles for Shh and Ihh signaling including regulation of L/R symmetry by the mouse node. *Cell* 106:781-92.
- Zhao, B., X. Ye, J. Yu, L. Li, W. Li, S. Li, J. Yu, J.D. Lin, C.Y. Wang, A.M. Chinnaiyan, Z.C. Lai, and K.L. Guan. 2008. TEAD mediates YAP-dependent gene induction and growth control. *Genes Dev* 22:1962-71.
- Zheng, R., R. Ghirlando, M.S. Lee, K. Mizuuchi, M. Krause, and R. Craigie. 2000. Barrier-to-autointegration factor (BAF) bridges DNA in a discrete, higher-order nucleoprotein complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:8997-9002.
- Zhou, H., S. Wu, J.Y. Joo, S. Zhu, D.W. Han, T. Lin, S. Trauger, G. Bien, S. Yao, Y. Zhu, G. Siuzdak, H.R. Scholer, L. Duan, and S. Ding. 2009. Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins. *Cell Stem Cell* 4:381-4.
- Zuo, B., J. Yang, F. Wang, L. Wang¹, Y. Yin, J. Dan, N. Liu¹, and L. Liu¹. 2012. Influences of lamin A levels on induction of pluripotent stem cells.

RESUME

Modélisation d'une laminopathie à partir de cellules souches pluripotentes : Etude phénotypique, génétique et recherche de cibles thérapeutiques

Les laminopathies regroupent des maladies rare dues à des mutations sur le gène *Lmna*, codant pour les lamines nucléaires A et C. Parmi des centaines de mutations identifiées jusqu'alors, la mutation *Lmna*^{+H222P} est responsable de la Dystrophie Musculaire d'Emery Dreifuss Autosomale Dominante (DMED-AD). Les patients atteints par DMED-AD souffrent d'une dystrophie et d'une cardiomyopathie. J'ai étudié tout particulièrement l'effet et la fonction de la mutation *Lmna*^{+H222P} au niveau du développement cardiaque en utilisant des cellules souches embryonnaires murines (CSEm) ainsi que des cellules souches humaines induites à la pluripotence (hiPS) sauvages et porteuses de la mutation *Lmna*^{+H222P}. Un défaut dans la cardiogenèse est retrouvé dans les corps embryoïdes (CE) dérivés des CSEm et dans les hiPS dont la différenciation est induite par le BMP2. En effet, dans les cellules différenciées porteuses de la mutation *Lmna*^{+H222P}, on observe une expression des gènes mésodermiques et cardiaques (ex : *brachyury*, *MesP1*, *Nkx2.5*, *Mef2c*, *Isl1*...) déficiente. Néanmoins, la formation du mésendoderme ne semble pas affectée dans ces cellules. De plus, des défauts de contraction dûs à une désorganisation de la structure sarcomérique est retrouvée dans les CEs dérivés des CSEm *Lmna*^{+H222P}. Mes travaux de thèse ont donc permis de mettre en place un modèle murin et humain de cellules souches pluripotentes pour laminopathies. Ces cellules pourront plus tard être utilisées afin de tester des médicaments permettant de trouver des traitements pour les personnes atteintes de la DMED-AD.

Mots clés: Laminopathies, lamine, cellules souches pluripotentes, cardiogenèse, coeur.

ABSTRACT

Modelisation of a laminopathy from pluripotent stem cells: Phenotypic and genotypic study, search for new therapeutic targets.

Laminopathies are rare genetic disorders caused by mutations in *Lmna* which encodes nuclear lamins A/C. Among hundreds of mutations identified so far, *Lmna*^{+H222P} leads to an Autosomal Dominant Emery-Dreifuss Muscular Dystrophy (AD-EDMD). AD-EDMD patients suffer of both muscle dystrophy and cardiomyopathy. Herein, we investigated the effects of *Lmna*^{+H222P} in cardiac development and function using wild type and mutated mouse embryonic stem cells (mESC) and human induced pluripotent stem cells (hiPS). *Lmna*^{+H222P} impairs cardiogenesis of both mESC and hiPSC. Expression of mesodermal and cardiac genes (i.e., *brachyury*, *MesP1*, *Nkx2.5*, *Mef2c*, *Isl1*...) in mESC derived embryoid bodies (mEBs) and in BMP2-induced cardiac progenitors from hiPCs was deficient in mutated cells. Nevertheless, the formation of mesendoderm was not affected in cells carrying *Lmna*^{+H222P} mutation. Cell contractility was impaired in mutated mEBs which correlated with a poor sarcomeric network visualised by cell immunostaining. Thus, my thesis revealed that human and murine pluripotent stem cells can serve as cellular model for laminopathies. These cells could be used for drug screening in order to test pharmacological approach to relieve symptoms of AD-EDMD.

Keywords: Laminopathy, lamin, pluripotent stem cells, cardiogenesis, heart.